

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1992

Thèse n° 251

**ACTIVITE SUR LES LIPOXYGENASES DE CERTAINES
MOLECULES
A CYCLE IMIDAZOLE OU THIAZOLE
UTILISEES EN PARASITOLOGIE**

**THESE
POUR LE
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et Soutenue publiquement le 23 Novembre 1992

par

Jean-Claude CRANSAC

Né le 13 Juillet 1967 à Limoges (Haute-Vienne)

Examineurs de la thèse

Monsieur BENEYTOUT - Professeur - Président
Monsieur DREYFUSS - Maître de Conférences - Juge
Madame DURUPT - Pharmacien - Juge

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

- 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
OUDART 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

A Monsieur BENEYTOUT,

Professeur des Universités de Biochimie,

ma profonde gratitude d'avoir bien voulu être mon maître de thèse,
ses conseils avisés et indulgents, et sa constante disponibilité
m'ont permis de réaliser ce travail, qu'il en soit ici remercié

A Monsieur DREYFUSS,

Maître de Conférences de Parasitologie,

mes remerciements d'avoir accepté de juger ce travail ;
ma gratitude pour son enseignement théorique et pratique de qualité

A Madame DURUPT,

Pharmacien,

maître de stage de 6^{ème} année, que je remercie chaleureusement
d'avoir accepté de participer à ce jury, ses qualités humaines,
sa conception de l'exercice de la profession de pharmacien,
sont pour moi un exemple.

A Tout le personnel du laboratoire de biochimie, mes remerciements
pour l'aide qu'il m'a apporté

A Mario, Sandrine, mon amical remerciement pour leur aide logistique
plus particulièrement informatique

A mes Parents,

A ma Grand-Mère,

A Mes Soeurs et Beau-Frère,

A Mes Amis d'hier, d'aujourd'hui, et de demain

PLAN**INTRODUCTION****PREMIERE PARTIE : LES LIPOXYGENASES ANIMALES****I - Définition générale****II - Substrats des lipoxygénases animales****2.1. Généralités**

2.1.1. Les acides gras polyinsaturés

2.1.2. Remarques

2.2. L'acide arachidonique

2.2.1. Structure

2.2.2. Origine

2.2.3. Vers la synthèse des eicosanoïdes

III - Voies métaboliques

3.1. Introduction régio et stéréospécificité

3.2. Voie de la 15-lipoxygénase

3.2.1. A partir de l'acide arachidonique

a) Activité LTA₄ synthétasique/oxygénasique

b) Activité hydroperoxydasique

c) Propriété de 12-lipoxygénase

3.2.2. A partir d'autres acides gras

3.2.3. Activité sur les membranes biologiques

3.3. Voie de la 12-lipoxygénase (n-9 lipoxygénase)

3.3.1. A partir de l'acide arachidonique

3.3.2. A partir d'autres acides gras

3.4. Voie de la 5-lipoxygénase - voie des leucotriènes

- 3.4.1. A partir de l'acide arachidonique
- 3.4.2. A partir d'autres acides gras
- 3.4.3. Autres voies formant des leucotriènes
- 3.4.4. Métabolisme transcellulaire du LTA₄
- 3.5. Interactions entre les différentes voies jusqu'aux lipoxines
 - 3.5.1. Dérivés di et tri-hydroxylés
 - 3.5.2. Les lipoxines

IV - Régulation des réactions lipoxygénasiques

- 4.1. Par la libération d'acide arachidonique
 - 4.1.1. Mécanismes enzymatiques
 - 4.1.2. Stimulation - inhibition
- 4.2. Par les métabolites : les eicosanoïdes
 - 4.2.1. Introduction, points communs des lipoxygénases
 - 4.2.2. Pour la 15-lipoxygénase
 - a) Action des métabolites - "Self inactivation"
 - b) Substrats suicides
 - c) Remarque
 - 4.2.3. Pour la 12-lipoxygénase
 - 4.2.4. Pour la 5-lipoxygénase
 - a) Rôle du calcium et de l'ATP
 - b) La FLAP ou Five-Lipoxygenase Activating Protein
 - c) Action des métabolites
 - d) Influence des substrats

V - Relations Structure-Activité des lipoxygénases

- 5.1. Abords de biologie moléculaire : Structure protéinique
 - 5.1.1. 15-Lipoxygénase
 - a) Humaine
 - b) Chez le lapin
 - c) Remarque

5.1.2. 12-lipoxygénase

a) Humaine

b) Porcine

c) Remarque

5.1.3. 5-lipoxygénase

5.2. Régiospécificité des réactions lipoxygénasiques

5.2.1. Unique ou double spécificité de position

5.2.2. Un déterminant essentiel pour la spécificité de position

5.3. Le fer non hémique des lipoxygénases

5.3.1. Rôle dans la dioxygénation

VI - Propriétés des lipoxygénases, de leurs métabolites

6.1. La 15-lipoxygénase

6.1.1. Sur les membranes biologiques - Maturation des érythrocytes

6.1.2. Les LDL

6.1.3. Autres propriétés

a) Au niveau des voies aériennes supérieures

b) Au niveau inflammation-immunité

c) Au niveau de la sphère génitale

6.2. La 12-lipoxygénase

6.2.1. Inflammation - cas du psoriasis

6.2.2. Immunité

6.2.3. Aggrégation plaquettaire

6.2.4. Activité sécrétoire

6.2.5. Cancérologie

6.3. La 5-lipoxygénase

6.3.1. Dans l'inflammation

a) Processus inflammatoire

b) Rôle du LTB₄

c) Rôle des cystéinyls leucotriènes : LTC₄ LTD₄ LTE₄

d) Pathologie allergique

e) Autres maladies inflammatoires

6.3.2. Système cardiovasculaire

6.3.3. Système nerveux central

6.3.4. Autres

a) Au niveau du rein

b) Au niveau gastrique

6.3.5. Récepteurs des Leucotriènes

6.4. Les lipoxines

6.4.1. Inflammation

6.4.2. Immunité cellulaire

6.4.3. Autres

a) Au niveau rénal

b) Protéine kinase C

6.5. Remarque

VII - Inhibition

7.1. Classification des inhibiteurs des lipoxygénases

7.1.1. Les substances "Redox"

7.1.2. Les antagonistes compétitifs des récepteurs aux lipoxygénases

7.1.3. Les analogues de substrat

7.2. Influence de la diététique

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION

I - Matériels

1.1. L'enzyme

1.2. Le substrat

1.3. Les produits testés

1.3.1. Molécules thérapeutiques à cycle imidazole

1.3.2. Molécules à visée molluscicide à cycle thiazole

1.4. Tampon utilisé

1.5. Spectrophotomètre

II - Méthodes

2.1. Réalisation du témoin

2.1.1. Composition

2.1.2. Mesure spectrophotométrique de l'activité témoin

a) En mode SCAN

b) En mode TIME-DRIVE

2.2. Etude de l'action des différents produits

2.2.1. Préparation de gammes de dilution

2.2.2. Mesures spectrophotométriques

2.3. Mesure de l'activité inhibitrice

III - Résultats

3.1. Les molécules thérapeutiques

3.1.1. Kétoconazole

3.1.2. Métronidazole

3.1.3. Lévamisolé

3.2. BNT et dérivés

3.2.1. BNT

3.2.2. Dérivés bromés

3.2.3. Dérivés chlorés

3.2.4. Dérivés fluorés

3.2.5. Pourcentage d'inhibition de l'enzyme

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

I - Intérêt des molécules médicamenteuses en fonction de leur action sur la lipoxygénase

1.1. Kétoconazole

1.1.1. Spécialités

1.1.2. Caractéristiques pharmacologiques

- a) Mode d'action
- b) Spectre antifongique
- c) Activité leishmanicide
- d) Pharmacocinétique

1.1.3. Indications thérapeutiques posologies

- a) Mycoses
- b) Leishmaniose
- c) Posologies - durée de traitement

1.1.4. Interactions enzymatiques et conséquences

1.2. Lévamisole

1.2.1. Spécialités

- a) Mode d'action
- b) Pharmacocinétique

1.2.3. Indications thérapeutiques - posologies

- a) Comme anthelminthique
- b) Comme immunostimulant

1.2.4. Conséquences de l'interaction lévamisole-lipoxygénase

1.3. Métronidazole

1.3.1. Spécialités

1.3.2. Caractéristiques pharmacologiques

- a) Mode d'action
- b) Spectre d'activité
- c) Pharmacocinétique

1.3.3. Indications et posologies

- a) Comme anti-bactérien
- b) Comme anti-parasitaire
- c) Posologies

1.3.4. Métronidazole et activité sur la lipoxygénase

II - Inhibition de la lipoxygénase par le BNT et ses dérivés halogénés

2.1. Introduction

2.2. Influence de la nature des halogènes

2.3. Influence de l'emplacement des halogènes

CONCLUSION

INTRODUCTION

Les lipoxygénases sont des enzymes ubiquitaires qui participent au métabolisme des acides gras polyinsaturés.

L'acide arachidonique, acide gras majoritaire dans les cellules animales est le substrat de deux enzymes principales la cyclooxygénase et la lipoxygénase :

- la première catalyse la formation de prostaglandines, thromboxanes, prostacyclines dont les effets biologiques multiples sont inhibés par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ils sont utilisés en thérapeutique comme antalgiques, antipyrétiques, antiinflammatoires mais leur emploi peut être limité ou contre indiqué par l'existence d'allergie, par leur effet ulcérogène, leur effet anti-agrégant.

- La deuxième catalyse la formation d'hydroperoxydes d'acides gras, de leucotriènes, de lipoxines qui sont des molécules ayant un rôle prépondérant dans diverses atteintes physiopathologiques : inflammation, allergie, maladies métaboliques, cancer,... Le développement d'inhibiteurs de la lipoxygénase permettrait donc de créer une nouvelle classe de médicaments anti-inflammatoires, antalgiques,... différents des AINS, et ou pourrait ouvrir une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement de certaines maladies comme l'asthme, l'athérosclérose, le cancer...

C'est pourquoi l'étude des lipoxygénases mobilisent de nombreux chercheurs dans le but de mieux connaître les mécanismes biochimiques des étapes de l'activité lipoxygénasique, leur régulation par des phases d'activation et d'inhibition, de déterminer les propriétés complexes des métabolites des lipoxygénases et de découvrir des molécules inhibitrices pouvant donner lieu à des applications thérapeutiques.

Nous présenterons tout d'abord à partir d'études bibliographiques les lipoxygénases animales, leurs substrats, les voies métaboliques, leur régulation, les produits formés et leurs propriétés, les différents types d'inhibiteurs.

Puis nous discuterons à partir de mesures réalisées sur le modèle d'expérimentation qu'est la lipoxygénase de soja, de l'intérêt de l'activité anti-lipoxygénasique de différents produits utilisés en parasitologie :

- médicaments anti-parasitaires : kétoconazole, lévamisole, métronidazole qui inhibent plus ou moins fortement les lipoxygénases.

- molécules à structure chimique simple déjà évaluées comme molluscicides pour lesquelles nous avons essayé de déterminer des relations structure-activité dans le cadre de cette inhibition.

PREMIERE PARTIE
LES LIPOXYGENASES ANIMALES

I - DEFINITION GENERALE

Les lipoxygénases sont des enzymes qui catalysent la dioxygénation stéréospécifique, du système *cis,cis*-1,4 pentadiène des acides gras polyinsaturés, produisant ainsi des hydroperoxydes (dérivé-1 hydroperoxy-2,4 *trans,cis*).

Ces enzymes sont très largement répandues, aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. On les retrouve chez les végétaux supérieurs : soja, pomme de terre, maïs, pois, lupin...; chez les végétaux inférieurs : algue verte, algue bleu-vert (ANDRIANARISON R. et coll., 1991) ; chez les invertébrés : crabe, barnacle, échinoderme (HAMPSON A.J. et coll., 1992) ; chez les poissons (TOCHER D.R. et coll., 1991) et chez les mammifères : rat, porc, chien, lapin, homme, ...

Elles se différencient par la position spécifique où elles effectuent l'insertion d'oxygène sur l'acide gras polydésaturé. On distingue ainsi chez les mammifères la 5-, 12-, 15-arachidonate lipoxygénase (HAMBERG M., 1984) mais elles présentent toutes des points communs par leur cinétique, leur activation par les hydroperoxydes, leur inactivation irréversible pendant le déroulement de la réaction (SCHEWE T. et coll., 1986).

L'intérêt que suscite les lipoxygénases animales, résulte des propriétés physiologiques, souvent néfastes, des produits qui se forment à la suite de la cascade enzymatique dont elles sont les premières enzymes. Ces métabolites : hydroperoxydes d'acide gras, leucotriènes, et autres lipoxines sont des médiateurs de l'inflammation, de réaction d'anaphylaxie, agissent sur les muscles lisses, les vaisseaux sanguins, les leucocytes et les cellules épithéliales (FOGH K., 1990). Les lipoxygénases sont donc des cibles potentielles pour des inhibiteurs à visée thérapeutique anti-allergique, anti-inflammatoire entre autre.

II - SUBSTRATS DES LIPOXYGENASES ANIMALES

2.1. Généralités

2.1.1. Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras ayant une unité cis,cis-1,4 pentadiène, même s'ils sont sous forme d'esters méthyliques, ou inclus dans des molécules complexes : triglycérides, diglycérides, phospholipides (SCHEWE T. et coll., 1986), ou dans les membranes biologiques pour la lipoxygénase réticulocytaire sont connus comme étant des substrats naturels des lipoxygénases. La similitude des produits formés (dérivés hydroperoxydes) à partir des acides gras libres et de différentes sortes de membranes biologiques suggère qu'il n'y a pas de différence essentielle dans le mécanisme d'oxydation des acides gras polyénoïques qu'ils soient libres ou estérifiés (KUHN H. et coll., 1990a).

Les acides gras sont principalement ingérés sous forme de triglycérides et de phospholipides, ils contribuent pour 35 à 40 % à la production d'énergie apportée par l'alimentation quotidienne. Ce sont des acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés avec des chaînes carbonées de 4 à 22 carbones. En ce qui concerne les acides gras polyinsaturés, ils fournissent 5 à 6 % de l'énergie alimentaire.

A côté de leur utilisation comme combustible, les acides gras alimentaires vont former :

- Les graisses de stockage, principalement dans les adipocytes, riches en triglycérides à faible taux de remaniement.
- Les lipides structuraux : phospholipides et esters de cholestérol, parties intégrantes des biomembranes ; les acides gras insaturés sont souvent présents sur le carbone 2 des phospholipides.

Il y a 4 familles d'acides gras polyinsaturés qui dérivent des acides gras précurseurs que sont :

- l'acide linoléique (--> série n-6 des acides gras)
- l'acide α linoléique (--> série n-3 des acides gras)
- l'acide oléique (--> série n-9 des acides gras)
- l'acide palmitoléique (--> série n-7 des acides gras)

Les acides gras linoléique et α linoléique sont dits acides gras essentiels car ils ne peuvent être synthétisés par l'organisme humain et doivent être fournis par l'alimentation végétale ; en effet c'est seulement au niveau des chloroplastes des algues et des végétaux que la désaturation des acides gras a lieu en direction du CH_3 terminal (Δ_{12} , et Δ_{15} désaturases) ; chez les animaux la désaturation se fait vers le groupement carboxyle ($\Delta_6, \Delta_5, \Delta_4$ désaturases) (Figure 1) (FICHER S., 1989).

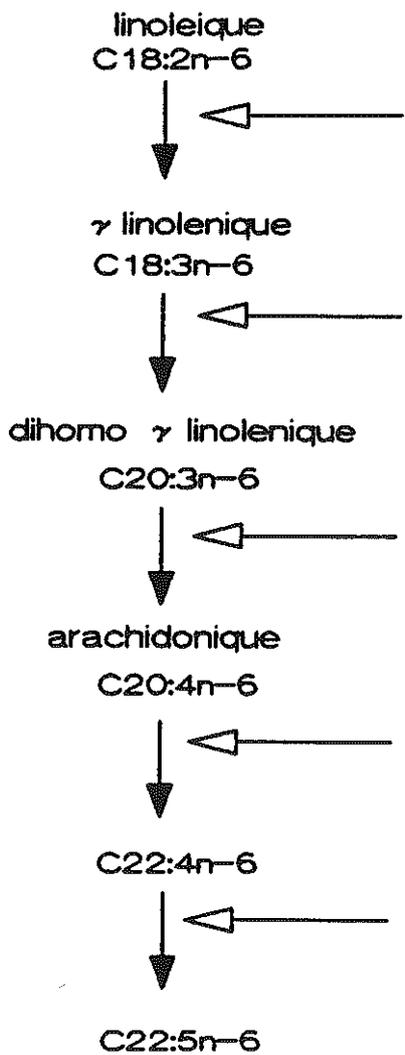
Les acides gras polyinsaturés, substrat des lipoxgénases les plus rencontrés sont :

- l'acide linoléique (Acide octadécadiène cis 9, cis 12 oïque)
- l'acide α linoléique (Acide octadécatriène cis 8, cis 11, cis 14 oïque)
- l'acide dihomogamma linoléique ou DGLA (Acide eicosatriène cis 8, cis 11, cis 14 oïque)
- l'acide arachidonique (Acide eicosatétraène cis 5, cis 8, cis 11, cis 14 oïque)
- l'acide eicosapentaène cis 5, cis 8, cis 11, cis 14, cis 17 oïque ou EPA.

Ils possèdent tous des affinités variables vis à vis de l'enzyme (CHABLE-RABINOVITCH H. et coll., 1988).

Les eicosanoïdes définis par Corey en 1980 comme étant les métabolites d'oxygénation enzymatique d'acides gras à 20 atomes de carbone, voient dans les trois derniers acides gras cités leurs précurseurs.

Acide gras de la Serie n-6


 Δ_6 Desaturase

Elongation

 Δ_5 Desaturase

Elongation

 Δ_4 Desaturase

Acide gras de la Serie n-3

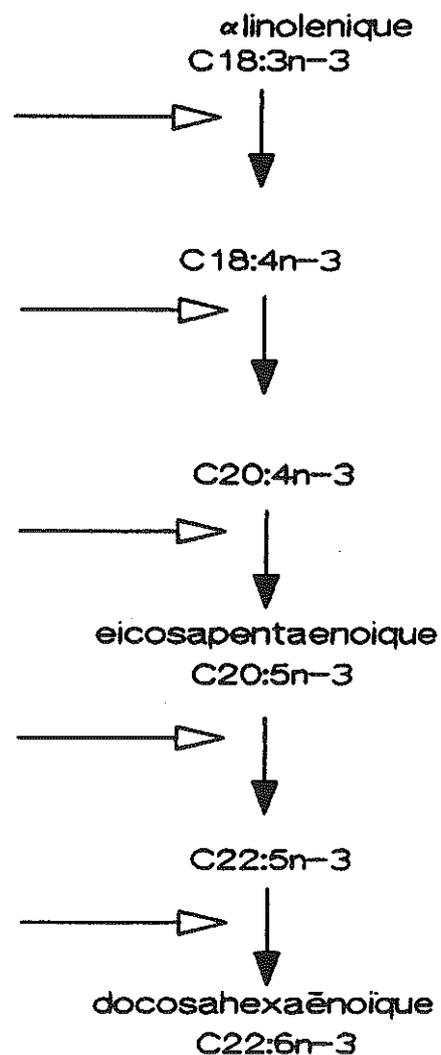


Fig. 1 - Métabolisation des acides gras insaturés
par les désaturases animales

2.1.2. Remarques

Certaines substances ne contenant pas la structure cis,cis-1,4 pentadiène peuvent être métabolisées par la lipoxygénase de soja, enzyme proche de la 15-lipoxygénase animale.

On connaît la cooxydation du carotène catalysée par la lipoxygénase par l'intermédiaire de la production de radicaux libres.

De même les acides gras céto sont des substrats pour la lipoxygénase de soja qui exerce une activité oxygénasique et hydroperoxydasique (KUHNS H. et coll., 1991a).

L'aldrine (hexachloro-hexahydro-diméthanonaphtalène utilisé comme antifatulant) subit une époxydation, couplée à l'oxydation de l'acide linoléique, par la lipoxygénase de soja (NAIDU A.K. et coll., 1991).

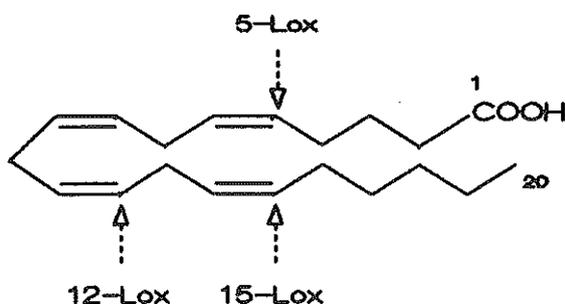
Le 2 aminofluorène (Substance supposée carcinogène et tératogène) est métabolisé par la lipoxygénase de soja (ROY S.K. et coll., 1991).

...

L'équivalent n'a pas été démontré pour les lipoxygénases animales.

2.2. L'acide arachidonique

2.2.1. Structure chimique



Positions d'insertion de dioxygène
par les lipoxygénases sur l'acide arachidonique

Acide gras polyinsaturé majoritaire dans les cellules animales, il possède 20 atomes de carbone (acide eicosanoïque) et quatre doubles liaisons conjuguées en position cis dont la numérotation est déterminée par rapport au COOH terminal (C_1 ou C_ω) en 5,8,11 et 14 ; sa dénomination est donc acide 5,8,11,14 cis eicosatétraénoïque.

2.2.2. Origine

Les cellules animales ne peuvent le synthétiser directement elles sont soumises à son faible apport exogène et surtout à l'apport en acide linoléique son précurseur (Figure 2). L'acide arachidonique est un constituant habituel des phospholipides des membranes cellulaires, réticuloplasmiques, sa concentration en forme libre dans la plupart des cellules animales est très faible. L'acide arachidonique est le substrat naturel des lipoxygénases animales c'est après l'action des phospholipases membranaires qu'il est libéré : phospholipase A2, phospholipase A1 suivie d'une lysophospholipase, ou phospholipase C couplée à une diglycéride lipase. La phospholipase A2 paraît être la voie la plus simple, la plus habituelle, la plus logique l'acide arachidonique estérifiant la position 2 du glycérol dans les phospholipides.

L'activation des phospholipases se fait par stimulation (les signaux sont encore mal connus) d'un récepteur situé à la surface de la cellule et est accompagnée par une mobilisation de calcium.

2.2.3. Vers la synthèse des eicosanoïdes

Une fois libéré, l'acide arachidonique peut être métabolisé en eicosanoïdes aux rôles physiologiques et physiopathologiques importants :

- les leucotriènes, les lipoxines, les acides hydroxyeicosatétraénoïques issus de l'action de la lipoxygénase
- les prostaglandines, thromboxanes et protacyclines issus de la voie de la cyclooxygénase

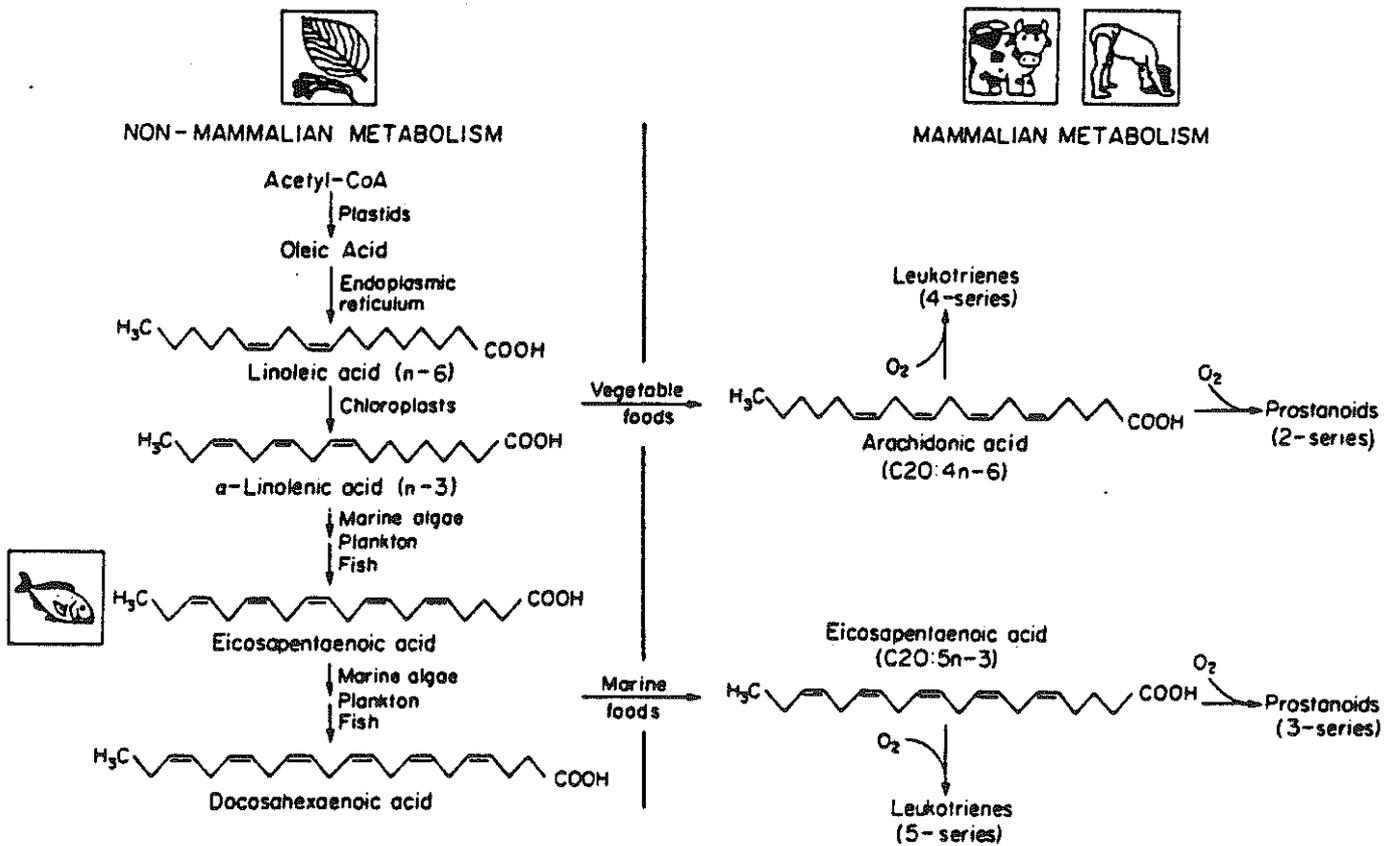


Fig. 2 - Origine et métabolisme des acides gras polyinsaturés

- les acides époxyeicosatriénoïques, acides époxyeicosatétraénoïques issus de l'action de la monooxygénase cytochrome P450 dépendante (= époxydase) (MALCOLM K. et coll., 1990)

III - VOIES METABOLIQUES

3.1. Introduction - régio et stéréospécificité

Une grande variété de produits peut se former à partir de réactions d'oxygénation du système cis,cis-1,4-pentadiène catalysées par la lipoxygénase (Figure 3).

Cette oxygénation enzymatique d'acides gras insaturés est stéréospécifique et concomitante avec le départ stéréosélectif d'un proton H^+ par rupture homolytique d'une liaison C-H permettant la formation d'un hydroperoxyde et entraînant le déplacement d'une liaison éthylénique : dérivé-1 hydroperoxy-2,4 trans,cis. Cette stéréospécificité entraîne l'apparition d'un centre chiral à l'origine d'isomérisation de position et d'isomérisation optique ; la régio et stéréospécificité de la réaction diminue avec une baisse de concentration en oxygène du milieu.

On peut ainsi retrouver des composés oxygénés avec des groupements hydroperoxy en position 5,8,9,11,12 ou 15 à partir de l'acide arachidonique. Ces acides hydroperoxy peuvent être réduits enzymatiquement, presque immédiatement, donnant les acides hydroxylés correspondants beaucoup plus stables (GRANSTRÖM E. et coll., 1987). Mais toutes les lipoxygénases capables de réaliser ces oxygénations n'existent pas dans les cellules des mammifères ; on retrouve en fait la 15-lipoxygénase, la 12-lipoxygénase et la 5-lipoxygénase (Tableau I).

L'activité des lipoxygénases dépend de conditions telles que la concentration en substrat, le temps de latence de la réaction, la température, le pH. Ces lipoxygénases diffèrent sur deux points essentiels :

- le site d'abstraction du premier hydrogène et la stéréospécificité d'insertion de dioxygène
- la direction du changement de la double liaison du premier radical conduisant au 1-hydroperoxy-2,4-trans-cis pentadiène.

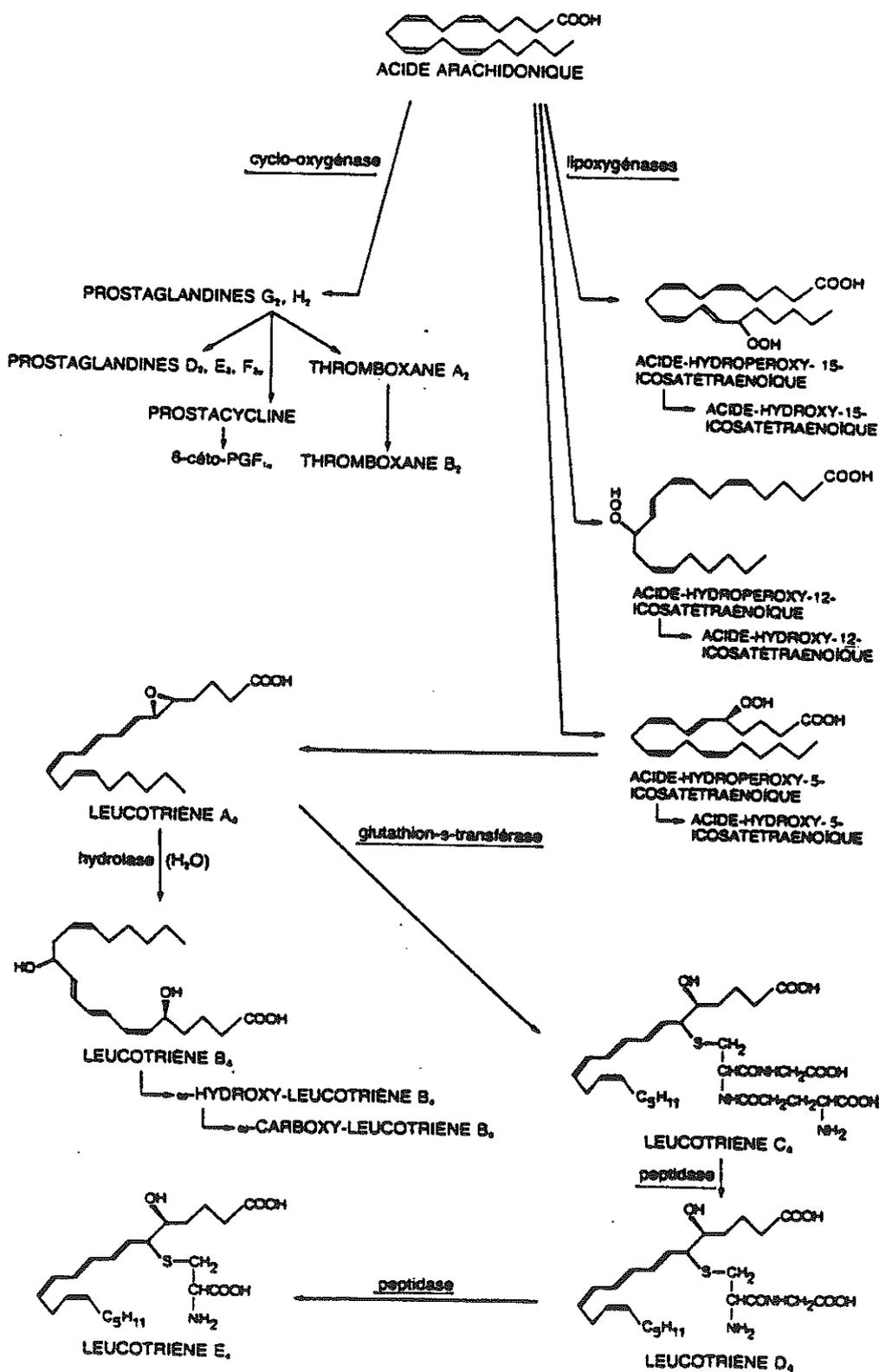


Fig. 3 - Métabolisation de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase et les lipoxygénases

TYPE DE CELLULES	LIPOXYGENASES	METABOLITES
<i>Neutrophiles</i>	5-LO (15-LO)	5-HETE ; LTB ₄ ; (LTC ₄) ; 20-OH-LTB ₄ ; 20-COOH-LTB ₄ (15 HETE)
<i>Eosinophiles</i>	15-LO 5-LO	15-HETE ; 5,15-diHETE ; 8,15-diHETE ; 14,15-diHETEs (LTB ₄) ; LTC ₄
<i>Monocytes</i>	5-LO	5-HETE ; LTB ₄ ; LTC ₄
<i>Macrophages</i>	5-LO 12-LO 15-LO	5-HETE ; LTB ₄ ; LTC ₄ 12-HETE 15-HETE
<i>Mastocytes</i>	5-LO	LTC ₄ ; LTD ₄
<i>Lymphocytes T</i>	15-LO (5-LO)	15-HETE (LTB ₄)
<i>Plaquettes</i>	12-LO (15-LO)	12-HETE (15-HETE ; 8,5-diHETEs ; 14,15-diHETEs)
<i>Kératinocytes</i>	12-LO 15-LO 5-LO	12-HETE 15-HETE (5-HETE ; LTB ₄)
<i>Cellule endothéliale</i>	15-LO	15-HETE
<i>Cellule épithéliale de la trachée et du poumon</i>	15-LO	15-HETE
D'après (Fogh K., 1990)		
<i>Cellule du glomérule</i>	12-LO 15-LO	12-HETE (Sraer J. et al., 1983) 15-HETE (Campbell W.B. et al., 1990)
<i>Cellule du système nerveux central</i> <i>astroglie du rat</i> <i>cellule pituitaire du porc</i>	12-LO	12-HETE (Petroni A. et al., 1990) (Ueda N. et al., 1990)
<i>Réticulocyte de lapin</i>	15-LO 12-LO	15-HETE ; 8,15-diHETEs ; 5,15-diHETEs 14,15-diHETEs ; (14,15-LTA ₄) ; (Ford Hutchinson A.W. et al., 1991a) (12-HETE) (Kuhn H. et al., 1990a)
<i>Cellule épithéliale ciliée du porc</i>	12-LO (5-LO)	12-HETE ; (5,12-diHETE) (5-HETE) (Sakamoto S. et al., 1991)

Tableau 1 : Répartition des activités lipoxigénasiques dans les cellules (enzymes et métabolites entre parenthèses correspondant à une voie mineure).

3.2. Voie de la 15-lipoxygénase

La 15-lipoxygénase est en quantité notable dans les réticulocytes, les cellules épithéliales des voies aériennes, les éosinophiles. C'est la première lipoxygénase à avoir été cristallisée à partir des réticulocytes de lapin par SLOANE et BROWNER en 1981. On parle aussi de n-6 lipoxygénase car elle aboutit à la formation de dérivés n-6 hydroperoxy.

3.2.1. A partir de l'acide arachidonique

L'étape initiale est l'oxygénation en C₁₅ de l'acide arachidonique qui entraîne la formation de 15-HPETE (acide hydroperoxyeicosatétraénoïque) par départ d'un hydrogène en C₁₃ : c'est l'étape limitante de la réaction. Le 15-HPETE peut être réduit par la glutathion peroxydase en 15-HETE.

a) Activité LTB₄ synthétasique/oxygénasique

Le 15-HPETE peut ensuite être métabolisé en époxyde et en différents dérivés di et tri-hydroxylés. Ainsi la 15-lipoxygénase doit subir un second cycle d'oxydoréduction pour produire l'époxyde 14,15 leucotriène A₄ (14,15 LTA₄) (FORD-HUTCHINSON A.W., 1991a), le mécanisme impliqué est le départ de l'hydrogène du C₁₀ et une rupture homolytique de la liaison 0-0 du 15-HPETE : ce type de réaction doit être considéré comme une combinaison de l'activité oxygénasique et hydroperoxydasique de l'enzyme (KUHN H. et coll., 1990b).

Le 14,15 LTA₄ peut être ensuite hydroxylé en deux isomères de 14,15 di-HETE (14,15 LTB₄) et deux isomères de 8,15 di-HETE (8,15 LTB₄)

La voie oxygénasique de la 15-lipoxygénase, par orientation inverse du substrat le 15-HPETE par rapport au site actif de l'enzyme, conduit au 5,15 di-H(P)ETE et plusieurs isomères 8,15 di-HPETE. Si le 15 HETE est utilisé comme substrat il se forme en majorité du 14,15 di-

HETE et en plus faible quantité le 5,15 di-HETE, les proportions sont inversées si le substrat est l'ester méthylique du 15-HETE.

b) Activité hydroperoxydasique

Enfin (KUHN H. et coll., 1990b) signalent l'existence d'une voie hydroperoxydasique qui met en jeu la rupture homolytique de la liaison O-O du 15-HPETE, pour former des dérivés époxyhydroxylés, des cétydiènes, des courtes chaînes d'aldehydes et de pentanes, cette voie ne se produit qu'en anaérobie ou lorsque la concentration en oxygène du milieu est faible.

c) Propriété de 12-lipoxygénase

A côté de la formation de 15-HPETE par la 15-lipoxygénase celle-ci peut aussi produire de l'acide 12-hydroperoxyeicosatétraénoïque : 12-HPETE alors le départ du proton H^+ de l'acide arachidonique se fait non pas en C_{13} mais en C_{10} , cette dioxygénation est mineure en comparaison de la 15-dioxygénation, le rapport étant de 9 contre 1 pour le 15-HPETE (FORD-HUTCHINSON A.W., 1991a).

3.2.2. A partir d'autres acides gras

- L'acide linoléique est un autre substrat important de la 15-lipoxygénase, il est métabolisé en acide 13-hydroperoxy-9,11-cis,trans-octodécadiénoïque 13-HPOD majoritairement et en 9-hydroperoxy-10,12-cis,trans-octodécadiénoïque 9-HPOD.

- L'acide di-homo-gamma-linolénique DGLA et l'acide eicosapentaénoïque EPA sont transformés en leurs dérivés 15-hydroperoxy respectifs.

3.2.3. Activité sur les membranes biologiques

La 15-lipoxygénase est apparemment la seule lipoxygénase capable de s'attaquer aux membranes biologiques en l'absence d'hydrolyse préalable par les phospholipases.

Cette réaction semble, comme pour les acides polyenoïques libres, dépendre de la température et être stéréospécifique (MURRAY J.J. et coll., 1988). Ainsi la lipoxygénase réticulocytaire est capable d'oxygéner les membranes mitochondriales et les produits majoritairement formés sont le 15-HETE et le 13-HOD. Cette réaction a pour conséquence l'inactivation d'enzymes situées de part et d'autre de la membrane mitochondriale (WIESNER R. et coll., 1990). L'étude plus large de (KUHN et coll., 1990a) a montré que la lipoxygénase n'attaquait pas seulement les membranes mitochondriales (du foie de rat) mais aussi les particules submitochondriales (de coeur de boeuf), les membranes endoplasmiques (du foie de rat), et les membranes plasmiques des érythrocytes. Les métabolites qui se forment en plus grande quantité sont le 15-H(P)ETE, le 13-H(P)OD, le 9-H(P)OD, l'acide 17-hydro(peroxy)-4 cis,7 cis,10 cis,13 cis,15 trans,19 cis-docosahexanoïque, et deux isomères acides hydro(peroxy) octadécadienoïques.

Ces réactions consomment plus d'oxygène qu'attendu, pour la formation de dérivés hydroperoxy, ceci pourrait être dû à la décomposition des produits de l'oxygénation primaire ou bien à la modification oxydative des membranes protéiniques qui les rendraient plus sensibles à la dégradation protéolytique.

3.3. Voie de la 12-lipoxygénase (n-9 lipoxygénase)

La présence d'activité 12-lipoxygénasique est mise en évidence dans les neutrophiles, les macrophages, les muscles lisses vasculaires, l'endothélium vasculaire, les erythrocytes et surtout les plaquettes (SPECTOR A.A. et coll., 1988). Au niveau des plaquettes et des cellules

glomérulaires, la 12-lipoxygénase est répartie équitablement entre le cytosole et la membrane cellulaire, une faible fraction se situe dans les microsomes (SRAER J. et coll., 1983).

3.3.1. A partir de l'acide arachidonique

L'étape initiale est la formation d'acide 12-hydroperoxyeicosatétraénoïque : 12-HPETE ; c'est la première réaction de type lipoxygénasique à avoir été mise en évidence, par HAMBERG et SAMUELSSON en 1974 (dans les plaquettes).

Le 12-HPETE est ensuite réduit en 12-HETE (acide hydroxylé) par une glutathion peroxydase.

Le 12-HETE peut être métabolisé par ω hydroxylation au niveau des leucocytes conduisant au 12,20 di-HETE (WONG Y.K. et coll., 1985). Enfin la 12-lipoxygénase par activité hydroperoxydasique (lors d'une faible concentration en oxygène) convertit le 12-HPETE en hépoxylines (PACE-ASCIK C.R. et coll., 1985).

3.3.2. A partir d'autres acides gras

La 12-lipoxygénase peut avoir comme substrats le DGLA et l'EPA, l'oxygénation se fera préférentiellement en position n-9.

3.4. Voie de la 5-lipoxygénase - voie des leucotriènes

La 5-lipoxygénase se situe principalement dans les mastocytes, les polynucléaires (basophiles, neutrophiles, éosinophiles), les kératinocytes, les monocytes et macrophages (TOREL J. et coll., 1985).

3.4.1. A partir de l'acide arachidonique

La formation de leucotriènes issus de la voie de la 5-lipoxygénase a été décrite pour la première fois par (BORGEAT P. et SAMUELSSON B., 1979), le terme de leucotriène provient de leucocytes, cellules à partir desquelles ils ont été isolés, et de triènes, caractéristique structurale c'est-à-dire trois doubles liaisons conjuguées.

Les leucotriènes issus de l'acide arachidonique sont constitués d'une chaîne insaturée (quatre doubles liaisons = série 4 des leucotriènes) de 20 atomes de carbone et portent deux substituants polaires dont une fonction hydroxyle.

La 5-lipoxygénase catalyse la formation d'un composé hydroperoxy relativement instable le 5-HPETE, qui peut être réduit en 5-HETE par action d'une peroxidase glutathion dépendante, ou bien converti par deshydratation par une nouvelle action de la 5-lipoxygénase en un autre dérivé instable un epoxide : le leucotriène A₄ (LTA₄) (acide 5(S)-trans-5,6-oxido-7,9-trans-11,14-cis eicosatétraénoïque) : réactions initiales dans la synthèse des leucotriènes.

Le LTA₄ molécule clé de la voie des leucotriènes dont la demi-vie n'est que de 3 à 5 minutes à température et pH physiologiques, est métabolisé :

- d'une part en une substance pro-inflammatoire di-HETE : le LTB₄ par la leucotriène A₄ hydrolase

- d'autre part par une glutathion-S-transférase (ou LTC₄ synthétase) en LTC₄ (il y a addition de glutathion qui se lie à l'acide gras par une liaison sulfoéther) (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990).

- enfin le LTA₄ peut aussi être hydroxylés non enzymatiquement pour donner le 5,6 diHETE, le 6-trans LTB₄ et le 12-epi-6-trans LTB₄ (BORGEAT P. et coll., 1983).

Le LTC₄ est rapidement métabolisé en LTD₄ par le clivage d'acide glutamique réalisé par une gamma-glutamyl transférase microsomiale membranaire spécifique (GGTP).

Le LTD₄, à son tour, est converti en LTE₄ par perte d'un résidu glycinyil sous l'action de dipeptidase membranaire spécifique (FORD-HUTCHINSON A.W., 1991b). Enfin, le LTE₄ peut

être métabolisé en LTF_4 , par addition de gamma-glutamyl sous l'action de GGTP (SAMUELSSON B., 1983) mais il n'est pas encore démontré que cette dernière étape se produise *in vivo* (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990).

Les leucotriènes sont dégradés par des métabolismes oxydatifs ce qui entraîne la perte de leur activité biologique : le LTB_4 est métabolisé par une hydrolase P_{450} en 20-hydroxy LTB_4 puis en 20-CHO LTB_4 et enfin en 20-COOH LTB_4 . Les LTC_4 , LTD_4 et LTE_4 sont métabolisés en leurs dérivés sulfoxides respectifs et dans l'environnement extracellulaire des neutrophiles et éosinophiles activés, en 6-trans diastéréoisomères du LTB_4 (LEWIS R.A. et coll., 1991).

3.4.2. A partir d'autres acides gras

La 5-lipoxygénase métabolise d'autres acides gras à 20 carbones en leucotriènes, mais ceux-ci sont moins actifs.

L'acide eicosatriène cis-5,8,11-oïque peut conduire à la série 3 des leucotriènes par la même cascade enzymatique que précédemment, ils possèdent trois doubles liaisons la 14 en moins par rapport à la série 4 : ce sont les LTA_3 , LTB_3 , ... (LTA_3 semble être un substrat médiocre mais un puissant inhibiteur de la LTA_4 hydrolase).

A partir de l'EPA il peut se former la série 5 des leucotriènes (5 doubles liaisons, la 17 en plus par rapport à la série 4) : LTA_5 , LTB_5 , ...

Le DGLA ne peut donner de leucotriènes par manque de la double liaison en 5,6 (FOGH K., 1990).

Remarque : c'est par l'action de la 5-lipoxygénase porcine leucocytaire sur le 13-HPOD en présence d'inhibiteurs lipoxygénasiques que (RIENDEAU D. et coll., 1991) ont montré que cette enzyme possédait une activité hydroperoxydasique.

3.4.3. Autres voies formant des leucotriènes

La voie de la 15-lipoxygénase, comme vu précédemment, peut former à partir de l'acide arachidonique le 14,15-LTB₄ et le 8,15 di-HETE c'est à dire le 8,15 LTB₄

Mais c'est aussi par l'action de la 12-lipoxygénase qu'il y a formation de leucotriènes : on peut obtenir le 11,12 LTA₄ et par hydrolyse les 11,12 LTB₄ et 5,12 LTA₄ (SAMUELSSON B., 1983).

On ne connaît jusqu'à maintenant aucune activité biologique à ces leucotriènes issus de la 12- ou 15-lipoxygénase, au contraire des leucotriènes issus de la 5-lipoxygénase, que l'on a identifié comme constituants actifs de la "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" en ce qui concerne les peptides ou cystéinyl-leucotriènes que sont les LTC₄, LTD₄, LTE₄. Leurs effets biologiques tels que bronchoconstriction, augmentation de la perméabilité vasculaire, chimiotactisme dans les réactions inflammatoires et d'anaphylaxie... sont bien connus.

3.4.4. Métabolisme transcellulaire du LTA₄

Alors que la 5-lipoxygénase est presque uniquement présente dans les cellules leucocytaires, la LTA₄ hydrolase est très largement distribuée. Ainsi la métabolisation du LTA₄ par la LTA₄ hydrolase, époxyde hydrolase spécifique, se produit soit dans la cellule originelle où le LTA₄ est synthétisé par la voie de la 5-lipoxygénase, soit dans une cellule autre (érythrocyte, cellule endothéliale, lymphocyte) après avoir quitté sa cellule d'origine. Dans l'espace extracellulaire le LTA₄ aura pu subir une hydrolyse non enzymatique mais la présence d'albumine le stabilise et permet son transfert.

Il en est de même pour la formation de LTC₄, la LTC₄ synthétase étant présente dans un grand nombre de cellules diverses, le LTA₄ est métabolisé par la LTC₄ synthétase de sa cellule originelle ou d'une cellule différente (mastocyte, cellule endothéliale, cellule vasculaire lisse) (LINDGREEN J.A. et coll., 1990).

Le contrôle de la synthèse des leucotriènes n'est donc pas exclusivement limité aux cellules possédant une activité 5-lipoxygénasique et dans ce contexte de métabolisme transcellulaire, la LTA₄ hydrolase et la LTC₄ synthétase présentent un intérêt thérapeutique pour une interruption sélective de la cascade de la 5-lipoxygénase (LEWIS R.A. et coll., 1990) (Figure 4).

3.5. Interactions entre les différentes voies jusqu'aux lipoxines

De même qu'il y a interaction entre la voie de la 5-lipoxygénase, la LTA₄ hydrolase, la LTC₄ synthétase de différentes cellules qui traduit le métabolisme transcellulaire du LTA₄, il existe des interactions entre les 5,12,15-lipoxygénases.

3.5.1. Dérivés di et tri-hydroxylés

On a montré que lors d'incubation entre plaquettes (riches en 12-lipoxygénase) et polynucléaires (riches en 15-lipoxygénase) en présence d'acide arachidonique il y avait formation de 12 et 15-HETE mais aussi de di-HETE générés par la voie de la 15-lipoxygénase. L'incubation de 12-HETE avec une suspension des polynucléaires neutrophiles conduit à la formation de 12,20-diHETE par ω oxydation. Ceci montre qu'il existe pour les métabolites issus des différentes lipoxygénases un métabolisme transcellulaire (WONG P.Y.K. et coll., 1985).

C'est pourquoi il peut se former le 5,12-diHETE via l'interaction entre la 12-lipoxygénase plaquettaire et le 5-lipoxygénase granulocytaire et le 5,15 diHETE par réactions successives de l'acide arachidonique avec les 15 et 5-lipoxygénases leucocytaires... (BORGEAT P. et coll., 1983).

Plusieurs dérivés acides trihydroxyeicosatétraénoïques (THETE) résultant de l'action de plusieurs lipoxygénases ont été découverts : le 8,9,12 et 10,11,12-THETE au niveau des plaquettes, le 8,10,12-HETE au niveau du poumon (GRANSTROM E. et coll., 1987).

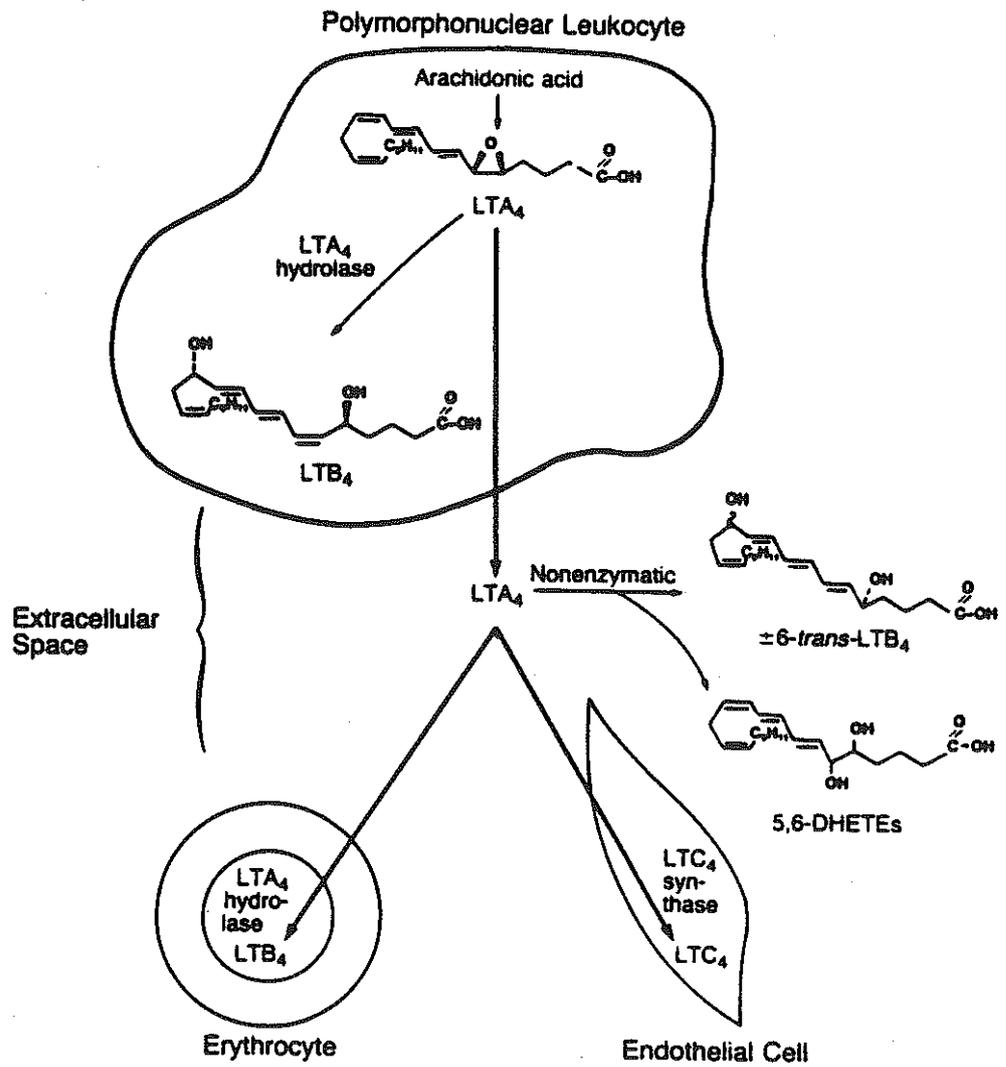
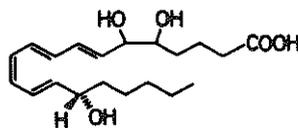
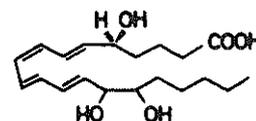


Fig. 4 - Métabolisme transcellulaire du LTA₄

3.5.2. Les lipoxines



Lipoxin A (LX-A)



Lipoxin B (LX-B)

Ce sont des dérivés trihydroxylés de l'acide arachidonique ou de l'acide eicosapentaénoïque qui possèdent quatre doubles liaisons conjuguées comme caractéristiques. Les deux principales lipoxines possédant une activité biologique sont des isomères : la lipoxine A (acide 5S,6R,15S-trihydroxy-7,9,13-trans-11-cis-eicosatétraénoïque) et la lipoxine B (acide 5S,14R,15S-trihydroxy-6,10,12-trans-8-cis-eicosatétraénoïque). De nombreuses voies conduisant *in vitro* à la formation de lipoxines ont été démontrées ; il apparaît aujourd'hui que la voie empruntée pour leur biosynthèse dépend du type de cellule et du substrat présent (SERHAN C.N. et coll., 1990).

La synthèse de lipoxines a lieu lors de l'incubation de suspensions de leucocytes avec le 15-H(P)ETE (FITZSIMMONS J.B. et coll., 1985), et à partir d'acide arachidonique mis en présence avec des granulocytes (activité 5-lipoxygénasique) et des cellules du tissu respiratoire (activité 15-lipoxygénasique) ; elle met donc en jeu la 5 et la 15-lipoxygénase. De même on retrouve des lipoxines, majoritairement lipoxine B, dans les réticulocytes, synthétisées à partir de 15 HETE par double lipoxygénation (FORD HUTCHINSON A.W., 1991a) (KUHN H. et coll., 1990b). La synthèse de lipoxines passe :

- par la formation d'un dérivé époxyde intermédiaire : le 5,6- ou 14,15-époxyde à partir de 15-H(P)ETE, l'époxyde subissant ensuite une hydrolyse.
- par l'introduction d'un groupement hydroxyle via la réaction de trois lipoxygénases séparées.
- par la conversion du LTA₄ en époxyde intermédiaire, mise en évidence dans les plaquettes.

Les plaquettes humaines synthétisent les lipoxines, majoritairement la LXA₄, par deux voies :

- soit directement à partir du LTA₄, il y a hydroxylation dépendant de la 12-lipoxygénase en C₁₅, menant à la formation d'un dérivé époxyde instable le 15,14-LTA₄, puis par hydrolyse aux lipoxines

- soit à partir du 5,6-diHETE ((métabolite du LTA₄ par voie non enzymatique ou bien par action d'une époxyde hydrolase cytosolique - hépatique (HAEGGSTROM J.Z., 1990) / c'est aussi un métabolite dérivant de l'activité 6 oxygénasique de la 5-lipoxygénase des leucocytes chez le porc sur le 5-HETE)) par une 15 lipoxygénation suivie d'hydrolyse (TORNHAMRE S. et coll., 1992).

IV - REGULATION DES REACTIONS LIPOXYGENASIQUES

4.1. Par la libération d'acide arachidonique

4.1.1. Mécanismes enzymatiques

La formation de l'ensemble des métabolites précédemment vus peut être contrôlée par la libération de leurs acides gras précurseurs à partir des lipides membranaires par intervention de phospholipases. Cette régulation est d'autant plus importante pour la 5-lipoxygénase leucocytaire humaine qu'aucune oxygénation directe des membranes lipidiques n'a été démontrée à l'inverse de la 15 arachidonate lipoxygénase qui métabolise directement les phospholipides (KUHN H. et coll., 1990a). La 12-lipoxygénase n'a pas montré non plus d'affinité particulière vis à vis des lipides membranaires. L'activation de la phospholipase A2 (CRASTES DE PAULET A., 1983) résulte d'une réponse cellulaire à des stimuli déclenchés par un traumatisme, l'aggrégation plaquettaire, les réactions inflammatoires aiguës... Ces stimuli, recueillis par un récepteur situé à la surface de la cellule, sont encore mal connus, ils correspondent à différentes hormones, neuromédiateurs parmi lesquels le collagène, la thrombine, la bradykinine, l'angiotensine II (SAMUELSSON B., 1983).

L'élément premier de la réponse cellulaire est l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ cytoplasmique par activation du métabolisme du phosphatidyl inositol qui pourrait jouer un rôle d'amorce dans ce processus. Le métabolisme du phosphatidyl inositol se fait par l'action d'une phospholipase C spécifique, qui libère un diglycéride et l'inositol phosphate. Les diglycérides

activent d'une part une protéine kinase Ca^{2+} -phospholipo-dépendante qui pourrait phosphoryler la lipomoduline, et d'autre part sont convertis en acides phosphatidiques qui se comportent comme des ionophores calciques.

Cette mobilisation de calcium fait qu'il y a formation d'un complexe calcique avec une protéine cytosolique la calmoduline capable d'activer un grand nombre d'enzymes Ca^{2+} dépendantes en particulier la protéine kinase Ca^{2+} dépendante et la PLA2.

La PLA2 "au repos" est sous forme d'un complexe inactif lipomoduline-calcium-phospholipase A2. C'est la phosphorylation de la lipomoduline (grâce aux protéines kinases Ca^{2+} -phospholipodépendante) qui libèrerait la PLA2 du complexe inactif permettant ainsi l'accès du calcium au site catalytique de la PLA2 d'où l'activation de cette enzyme.

L'action antiinflammatoire des glucocorticoïdes résulterait de l'inactivation de la phospholipase A2 par induction de la synthèse de lipomoduline au niveau de l'étape moléculaire de transcription (HIRATA F., 1985).

4.1.2. Stimulation - inhibition

L'utilisation du ionophore calcique A 23187, dans le domaine expérimental, pour stimuler la voie des eicosanoïdes s'explique donc par le fait qu'il entraîne une augmentation de la concentration cytoplasmique calcique conduisant à une activation des phospholipases Ca^{2+} dépendantes responsables de la libération d'acide arachidonique à partir de la membrane cellulaire (BORGEAT P. et SAMUELSSON B., 1979). Les cellules n'ayant pas de récepteurs à l' A 23187, il doit être considéré comme un stimulus non physiologique. A l'inverse un certain nombre d'autres stimuli tels que la N-formyl-méthionyl-phénylalanine (FMLP) et la bradykinine interfèrent avec des récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire qui conduit à la transduction d'un signal à travers la membrane avec pour conséquence une augmentation du calcium intracellulaire ; cette activation semble être associée à la mise en jeu du système des protéines kinases C (FOGH K., 1990).

La libération d'acide arachidonique par les phospholipases est aussi stimulée par la présence dans la cellule d'ATP et indirectement par le NADPH qui augmente le flux calcique (STEWART A., 1985).

Certains acides gras hautement insaturés sont de puissants inhibiteurs de la phospholipase A2, l'inhibition augmentant avec le taux d'insaturation de ces acides. L'acide arachidonique est un inhibiteur compétitif de l'enzyme, aucun analogue contenant des liaisons acétyléniques ne l'inhibe alors que l'analogue diméthyl diène de l'acide arachidonique est un puissant inhibiteur (DENNIS A.E., 1990).

La régulation physiologique de la formation des eicosanoïdes n'est pas entièrement connue. On ne sait si leur biosynthèse quotidienne résulte d'une libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides continuellement stimulée et régulée à bas niveau, ou bien, si elle se produit par intervalles. Mais dans les situations pathologiques comme un choc septique, un traumatisme, etc..., la cascade enzymatique de l'acide arachidonique devient explosive (FISHER S., 1989).

4.2. Par les métabolites : les eicosanoïdes

4.2.1. Introduction - points communs des lipoxygénases

Des études cinétiques ont permis de dégager pour les différentes lipoxygénases des points communs : il existe une phase d'activation obligatoire de l'enzyme par son produit l'hydroperoxyde d'acide gras. L'activation étant due, en partie, à l'oxydation directe du site actif de l'enzyme par le groupement hydroperoxyde ; c'est pourquoi lorsque expérimentalement on utilise des substrats purs pour mesurer l'activité lipoxygénasique, il existe une phase de latence correspondant au temps de formation d'une quantité suffisante de dérivé hydroperoxyde (SCHEWE T. et coll., 1986).

La lipoxygénase de réticulocyte possède un certain nombre de caractéristiques qui s'appliquent aussi aux autres lipoxygénases (LUDWIG P. et coll., 1987) :

- elle présente une sensibilité à l'oxygène
- l'abstraction de l'hydrogène est l'étape limitante de la réaction
- l'enzyme est soumise à une autoinactivation due à une forte concentration en hydroperoxyde formé
- il existerait un seul site de fixation pour le substrat et le produit
- lors d'une faible concentration en oxygène, le substrat en excès exerce une action inhibitrice et les lipoxygénases se comportent comme des dioxygénases et des hydroperoxydases.

4.2.2. Pour la 15-lipoxygénase

Les données de la littérature sont contradictoires en ce qui concerne l'état d'activation de la 15-lipoxygénase dans les cellules.

En effet, pour (MORITA E. et coll., 1987), (SIGAL E. et coll., 1988) la 15-lipoxygénase serait sous forme active et ne nécessiterait que la présence de substrat pour la formation des eicosanoïdes ; (BORGEAT P. et SAMUELSSON B., 1979) pensent qu'elle serait dans un état quasi-inactif dans les polynucléaires du sang périphérique puisque ces cellules ne métabolisent qu'une faible quantité d'acide arachidonique exogène en 15-HETE. (VANDERHOEK J.Y. et coll., 1985) (NICHOLS R.C. et coll., 1990) voient la 15-lipoxygénase des polynucléaires sous forme inactive ou "inaccessible" qui nécessite une étape d'activation pour métaboliser l'acide arachidonique endogène ou exogène.

a) Action des métabolites et "self-inactivation"

Les HETEs endogènes et, en particulier, le 15-HETE lui-même, et le 5-HETE, sont des activateurs de la 15-lipoxygénase. D'une manière générale l'inhibition de la 5-lipoxygénase et l'augmentation de la formation de 15-HETE sont étroitement liées, les médicaments qui inhibent la 5 activent la 15-lipoxygénase. Le 15-HETE est un puissant inhibiteur de la 5-lipoxygénase et

c'est cette caractéristique inhibitrice qui est probablement responsable de l'activation de sa propre formation par la voie de la 15-lipoxygénase (FOGH K., 1990).

Les hydroperoxydes formés lors de réactions lipoxygénasiques sont responsables d'une modification de l'enzyme qui a catalysé leur synthèse : on parle d'auto-inactivation ou de "self-inactivation". Ce phénomène a été montré sur différentes lipoxygénases végétales et sur la lipoxygénase de réticulocyte en utilisant comme substrat l'acide linoléique, le produit l'acide 13 hydroperoxylinoléique (13 HPOD) interagissant avec l'enzyme.

Pour des températures supérieures à 20°C, la "self-inactivation" de la lipoxygénase de réticulocyte est indépendante du type de substrat (SCHEWE T. et coll., 1986). Cette inactivation s'accompagnerait de la formation d'un groupement sulfoxide au niveau d'une molécule de méthionine, particulièrement sensible à l'oxygène, composant la lipoxygénase. La conversion d'un résidu méthionine hydrophobe en un sulfoxide hydrophile serait à l'origine du changement irréversible de conformation du site actif de la 15-lipoxygénase de réticulocyte entraînant son inactivation (RAPOPORT S. et coll., 1984). Cette caractéristique d'autoinactivation a aussi été observée au niveau de la lipoxygénase plaquettaire (12-lipoxygénase) et de la cyclooxygénase plaquettaire (LAPETINA E.G. et CUATRECASA P., 1979), ce qui montre la nature "suicidaire" des réactions dioxygénasiques du métabolisme de l'acide arachidonique dans les cellules animales. (NGUYEN T. et coll., 1991) va à l'encontre de la théorie de self-inactivation par formation de groupement méthionine sulfoxide, pour la 5-lipoxygénase en effet le remplacement de l'acide aminé méthionine par un autre a peu d'effet sur l'inactivation de l'enzyme.

b) Substrats suicides

Les analogues structuraux des substrats naturels des lipoxygénases, qui possèdent des groupements acétyléniques sont des inhibiteurs des réactions lipoxygénasiques ; en particulier l'acide 5,8,11,14 eicosatétraénoïque (ETYA), l'analogue acétyléné de l'acide arachidonique. L'ETYA inhibe la lipoxygénase en agissant comme substrat en effet il est transformé en produit plus polaire et par compétition au niveau du site de fixation du substrat de l'enzyme l'acide

linoléique a un effet protecteur sur l'inactivation par l'ETYA ; l'ETYA est dit substrat suicide et au cours de cette inactivation il y a utilisation d'oxygène et formation d'une mole de méthionine sulfoxide par mole d'enzyme.

La sensibilité des différentes lipoxygénases à l'ETYA est variable, d'autres acides gras acétyléniques agissent aussi sur la 15 et 12-lipoxygénase. dans tous les cas il apparait que l'inhibition des lipoxygénases par des substrats suicides, ou par "self-inactivation" avec des substrats physiologiques, procède selon les mêmes mécanismes (SCHEWE T. et coll., 1986).

c) Remarque

Certains anti-inflammatoires non stéroïdiens : l'ibuprofène, l'indométacine sont des activateurs de la voie de la 15-lipoxygénase (VANDERHOEK J.Y. et coll., 1985).

La 15-lipoxygénase semble aussi soumise à des mécanismes de contrôle post-transcriptionnel lors de la différenciation cellulaire : les réticulocytes immatures possédant l'ARN messenger de la 15-lipoxygénase sans l'exprimer en protéine 15-lipoxygénase alors que les réticulocytes matures contiennent l'ARNm et la protéine 15-lipoxygénase. Ceci suggère qu'il existerait une protéine régulatrice qui réprimerait la traduction de l'ARNm 15-lipoxygénase, la synthèse de 15-lipoxygénase ne pouvant être réalisée qu'après un certain stade de différenciation cellulaire. Les études sur l'expression des gènes codant pour les lipoxygénases n'en sont qu'à leur début (SIGAL E., 1991).

L'induction de l'enzyme, au niveau de l'ARNm 15-lipoxygénase, chez les monocytes sanguins, qui permet aux macrophages qu'ils deviendront d'exprimer la 15-lipoxygénase, est stimulée par l'interleukine 4 (IL-4 interleukine peptide qui permet l'interaction entre les cellules du système immunitaire) et est inhibée par l'interféron γ et l'hydrocortisone.

(interféron : médiateur augmentant la résistance cellulaire aux infections virales en modifiant le métabolisme cellulaire, interféron γ : produit par les lymphocytes activés a de nombreux effets comme modulateur des réponses immunitaires).

IL-4 et interféron γ pourraient être des régulateurs physiologiques de l'expression de la lipoxygénase et ceci suggère le lien important qui existe entre les fonctions de la 15-lipoxygénase et la réponse inflammatoire immune dans l'athérosclérose comme pour d'autres désordres (CONRAD D.J. et coll., 1992).

4.2.3. Pour la 12-lipoxygénase

La 12-lipoxygénase qui se situe au niveau membranaire serait sous forme active.

Elle est activée par son propre métabolite obtenu à partir de l'acide arachidonique : le 12-HPETE, son dérivé réduit le 12-HETE est inactif. D'autres HPETEs stimulent la 12-lipoxygénase mais dans des proportions moindres, la spécificité isomérique du 12-HPETE étant nécessaire.

Les (endo)peroxydes intermédiaires formés par la voie de la cyclooxygénase à partir des acides gras pourraient aussi activer la 12-lipoxygénase plaquettaire (VANDERHOEK J.Y. et BAILEY J.M., 1985).

Le 15-HPETE et 15-HETE inhibent la 12-lipoxygénase plaquettaire (VANDERHOEK J.Y. et coll., 1980), et elle est soumise aussi au phénomène de "self-inactivation".

Enfin l'analogue de substrat, l'ETYA, substrat suicide, inhibe à peu près également la 12-lipoxygénase et le cyclooxygénase (PALMER et SALMON, 1985).

4.2.4. Pour la 5-lipoxygénase

a) Rôle du calcium et de l'ATP

Le calcium joue un rôle essentiel dans l'activation de la 5-lipoxygénase. Ceci est mis en évidence par l'augmentation de la formation de 5-HETE en présence d'acide arachidonique et d'ionophore calcique A 23187 au niveau des polynucléaires ; d'autres cations divalents tels que Cu^{2+} ou Fe^{2+} sont inefficaces (VANDERHOEK J.Y. et BAILEY J.M., 1985). Dans les

mêmes conditions il y a accroissement de la synthèse de leucotriènes. Le Ca^{2+} stimule donc l'activité lipoxygénasique proprement dite mais aussi l'activité de LTA_4 synthétase de la 5-lipoxygénase : la 5-lipoxygénase est calcium-dépendante.

Ce n'est que pour de fortes concentration en acide arachidonique, en dessous de pH 8, que l'activité de la 5-lipoxygénase est indépendante de la présence de calcium. L'activité serait en rapport avec l'état physicochimique du substrat : l'ion arachidonate en solution ne peut être métabolisé qu'en présence de calcium (qui, peut être, se fixerait au groupement carboxyle) alors que l'acide arachidonique libre, non chargé, ou les micelles d'acide arachidonique ne nécessitent pas la présence de calcium (la concentration micellaire dépend aussi du pH) .

L'activité maximale 5-lipoxygénasique demande la présence de calcium mais aussi d'ATP (adenosine triphosphate) (WONG A. et coll., 1990).

Le calcium joue en plus un rôle dans la translocation de la 5-lipoxygénase du cytosole au compartiment membranaire ce qui est nécessaire pour son activité métabolique : synthèse de 5-HPETE et de leucotriènes.

b) La FLAP ou Five-Lipoxygenase Activating Protein

Dans les cellules à l'état de repos la 5-lipoxygénase (étudiée dans les leucocytes humains du sang périphérique, les cellules leucémiques basophiles du rat RBL-1, les cellules HL 60 traitées par le diméthylsulfoxyde) est localisée uniquement dans le cytosole. Hors son substrat, l'acide arachidonique, est généré à partir des phospholipides dans la membrane cellulaire.

C'est en étudiant un puissant inhibiteur de la formation des leucotriènes le MK 886 qui est efficace *in vivo* et sur des cellules intactes *in vitro* mais pas sur la 5-lipoxygénase purifiée, que l'on a démontré que cette inhibition était due à l'empêchement de la translocation de la 5-lipoxygénase du cytosole sur un site particulier membranaire, le MK 886 se fixant avec une haute affinité sur une cible protéinique spécifique. Cette cible, protéine isolée de 18 kilodaltons, a été nommée FLAP : Five-Lipoxygenase Activating Protein, elle est présente dans la membrane des leucocytes (SIGAL E., 1991).

La 5-lipoxygénase et la FLAP sont nécessaires ensemble pour la biosynthèse cellulaire des leucotriènes, le mécanisme hypothétique d'activation est le suivant (Figure 5) : la stimulation d'un récepteur membranaire entraîne une augmentation significative du calcium intracellulaire activant la 5-lipoxygénase (ainsi que les phospholipases). Ceci aboutit par un mécanisme inconnu à la translocation de l'enzyme jusqu'à la FLAP. Un complexe stable, au niveau de la membrane, est ainsi formé entre la 5-lipoxygénase activée, la FLAP, et éventuellement d'autres acteurs de la voie des leucotriènes (LTA₄ hydrolase, phospholipase A₂). Ce complexe régulerait l'interaction de l'enzyme avec son substrat. La 5-lipoxygénase subirait ensuite une inactivation associée à un "changement suicide" laissant une enzyme insensible liée à la protéine membranaire FLAP (FORD HUTCHINSON A.W., 1991c).

Récemment d'autres données dans la régulation de l'activité de la 5-lipoxygénase ont été apportées. Dans les macrophages alvéolaires, à l'inverse des macrophages péritonéaux et des leucocytes, à l'état de repos, la majorité de l'activité enzymatique et de la protéine 5-lipoxygénase se retrouve au niveau de la fraction membranaire. De plus cette 5-lipoxygénase possède une plus grande activité par molécule et son association à la membrane se fait indépendamment de l'augmentation du calcium intracellulaire (l'hypothèse serait alors l'intervention de la protéine kinase C) et sur un site membranaire, autre que la FLAP, supposé de nature lipidique (COFFEY M. et coll., 1992).

c) Action des métabolites

Le 12-HPETE stimule l'activité de la 5-lipoxygénase (rôle des plaquettes dans le développement des réactions allergiques et inflammatoires), le 12-HETE est inactif (BORGÉAT P. et coll., 1983).

Le 15-HPETE inhibe, d'une façon marquée, l'activité de la 5-lipoxygénase selon la concentration et le temps de contact. Cette inhibition, qui suit une cinétique d'ordre 1, n'est pas due à une inhibition compétitive d'un produit de réarrangement ou de décomposition chimique du

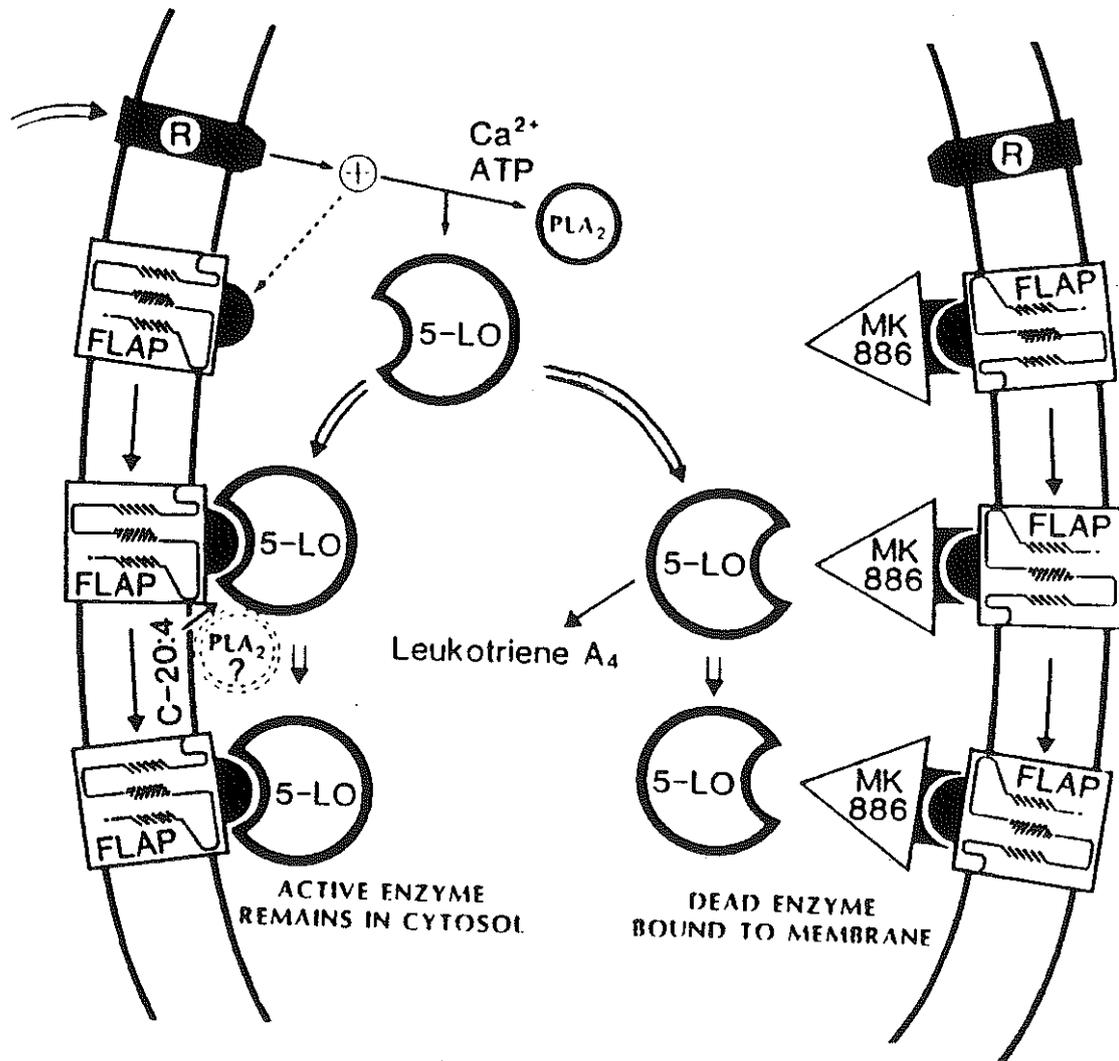


Fig. 5 - Activation de la 5-lipoxygénase par la protéine membranaire FLAP

15-HPETE, le 15-HPETE agirait vraisemblablement sur le site actif de la 5-lipoxygénase (CASHMAN J.R. et coll., 1988).

Le 15-HETE inhibe la 5-lipoxygénase comme d'autres acides gras 15-hydroxy (à partir de DGLA et EPA) (FOGH K., 1990).

d) Influence des substrats

L'acide eicosatriénoïque et l'EPA peuvent entrer en compétition avec l'acide arachidonique au niveau du site de fixation du substrat de la 5-lipoxygénase entraînant une diminution de synthèse d'eicosanoïdes issus de l'acide arachidonique. A côté de cette inhibition compétitive de substrats, un autre mécanisme est évoqué : (PETERS-GOLDEN M. et SHELLY C., 1988). ont montré que des acides gras (comme l'acide linoléique et l'acide eicosatriénoïque) peuvent être à l'origine d'une déplétion en ATP dans les cellules diminuant par là même l'activité de la 5-lipoxygénase qui est ATP-dépendante.

V - RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DES LIPOXYGENASES

5.1. Abords de biologie moléculaire : structure protéinique

La structure des lipoxygénases ne peut être étudiée qu'après isolement de celles-ci : extraction, purification, caractérisation par des anticorps monoclonaux du type de lipoxygénases.

La structure primaire protéinique, c'est à dire la séquence des acides aminés constitutifs de la lipoxygénase, est déduite à partir de la succession des nucléotides du brin d'ADN codant obtenu par clonage. En général, les méthodes de clonage s'appuient sur l'isolement de la protéine et l'utilisation de "sondes" constituées d'anticorps ou d'oligonucléotides pour mettre à jour le brin d'ADN codant.

5.1.1. La 15-lipoxygénase (FORD HUTCHINSON A.W., 1991a)

a) Humaine

La structure primaire de la 15-lipoxygénase, déduite à partir du clonage réalisé sur des réticulocytes humains, montre un polypeptide de 661 acides aminés de masse moléculaire 74 600 daltons. Cette chaîne polypeptidique est marquée dans son ensemble, par un caractère hydrophile en accord avec sa localisation cytosolique. Une zone hydrophobe existe au centre de la protéine (comme dans le cadre de la 5-lipoxygénase). Aucun site pour l'ATP, la fixation de calcium, une glycosylation n'a été identifié.

b) Chez le lapin

La 15-lipoxygénase des réticulocytes de lapin est proche de celle de l'homme car elles ont en commun 81 % de l'ensemble de la séquence en acides aminés. Sa masse moléculaire est de 78 000 daltons, elle possède un point isoélectrique à 5,5 , et comme l'humaine un atome de fer par molécule.

c) Remarque

La biologie moléculaire fait apparaître que chez l'homme et les autres mammifères il existe un seul type de 15-lipoxygénase alors que plusieurs isoenzymes ont été rapportées chez les 15-lipoxygénases végétales comme pour les 12-lipoxygénases des mammifères.

5.1.2 La 12-lipoxygénase

a) Humaine

Après clonage du fragment d'ADN de cellules leucémiques érythrocytaires, on en déduit que la 12-lipoxygénase est formée d'une séquence de 663 acides aminés pour une masse moléculaire de 75 513 daltons. Par comparaison avec d'autres lipoxygénases, elle possède respectivement 41,5 %, 65,3 % et 65,4 % d'acides aminés identiques avec la 5-lipoxygénase humaine, la 15-lipoxygénase humaine et la 12-lipoxygénase porcine. Une succession d'acides aminés riches en histidine, a été proposée comme site actif des lipoxygénases, on la retrouve aussi dans la structure polypeptidique de la 12-lipoxygénase humaine. De plus, un court enchaînement contenant histidine et cystéine, pouvant être le lieu de fixation de l'atome métallique présent dans les molécules de lipoxygénase, est commun aux 15-lipoxygénases et à la 12-lipoxygénase humaine à l'exception de la dernière histidine remplacée par l'asparagine (YOSHIMOTO T. et coll., 1990).

b) Porcine

Structure étudiée sur la base de la fraction d'ADN isolée à partir des leucocytes, elle est composée de 661 acides aminés pour une masse moléculaire de 74 911 daltons et présente une séquence polypeptidique identique à 86 % avec la 15-lipoxygénase humaine et à 41 % avec la 5-lipoxygénase (SIGAL E., 1991).

c) Remarque

Il est établi que la 12-lipoxygénase existe dans une même espèce sous différentes sortes d'isoenzymes : on différencierait un type plaquettaire et un type leucocytaire selon leur spécificité de substrat et leur réactivité aux anticorps (TAKAHASHI Y. et coll., 1988).

5.1.3. La 5-lipoxygénase

Le clonage du brin d'ADN, codant pour la 5-lipoxygénase, a été effectué à partir de placenta humain et de cellules HL 60 différenciées par le diméthylsulfoxyde. Ceci a permis d'en déduire la constitution de l'enzyme en acides aminés au nombre de 673 et d'une masse moléculaire de 78 000 daltons. Une zone centrale hydrophobe est vraisemblablement un site d'interaction avec les substrats ou bien de fixation avec la membrane ; les sites de liaisons avec l'ATP et le calcium qui activent la 5-lipoxygénase restent à découvrir. La 5-lipoxygénase humaine est très proche de celle présente chez le rat (93 %) et possède une similitude avec les lipoxygénases végétales (40 %) (SIGAL E., 1991).

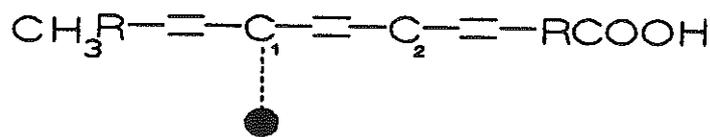
5.2. Régiospécificité des réactions lipoxygénasiques

5.2.1. Unique ou double spécificité de position

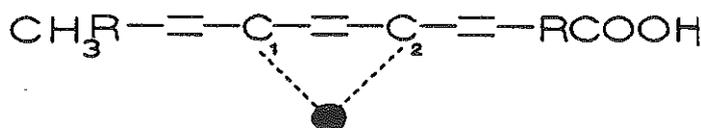
Beaucoup de lipoxygénases catalysent l'oxygénation de l'acide arachidonique selon une position d'insertion d'oxygène et formation d'un hydroperoxyde unique : lipoxygénase de soja, 12-lipoxygénase plaquettaire, 5-lipoxygénase leucocytaire. A l'opposé la particularité de la 15-lipoxygénase réticulocytaire est de pouvoir métaboliser l'acide arachidonique en deux produits : le 15-HPETE et le 12-HPETE selon un rapport de 9 pour 1.

En même temps que l'oxygénation, la réaction lipoxygénasique est marquée par une étape limitante qui est l'abstraction stéréosélective d'hydrogène d'un système de deux méthylènes allyliques (ou système cis, cis-1,4-pentadiène ou liaisons éthyléniques conjuguées). Le départ d'hydrogène résulterait de l'abstraction du proton H^+ après mouvement d'un doublet électronique π de la double liaison ou bien de l'abstraction d'un radical atomique H^\bullet , la dernière hypothèse semble plus probable depuis la récente détection de radicaux peroxylipidiques pendant l'oxygénation d'acide gras polyénoïque par la lipoxygénase de soja ; l'atome métallique non hémérique fixé à l'enzyme jouerait un rôle crucial (KUHNS H. et coll., 1991a).

Le substrat d'une lipoxygénase est dit optimal lorsqu'il est aligné avec le site actif de l'enzyme, un seul des deux groupements méthyléniques allyliques est assez proche de l'accepteur d'hydrogène (●) pour qu'il y ait départ d'hydrogène alors la réaction lipoxygénasique est caractérisée par une vitesse importante et la conversion du substrat se fait en un unique produit chiral il y a une unique spécificité de position pour la lipoxygénase.



Si le substrat est lié à l'enzyme de telle sorte que l'accepteur d'hydrogène se situe entre deux différents groupements méthyléniques allyliques alors par rapport à précédemment, un premier groupement est plus éloigné de l'accepteur d'hydrogène de l'enzyme ceci correspond à une sorte d'empêchement stérique au départ de l'hydrogène et il y a diminution du taux d'oxygénation du substrat. De plus le groupement méthylénique allylique adjacent dans la chaîne de l'acide gras se trouve, pour sa part, être situé plus près de l'accepteur d'hydrogène et la réaction avec le second centre pro-chiral (C_2) est possible. Il y aura formation de deux hydroperoxydes d'acides gras différents : on parle de double spécificité de position pour la lipoxygénase.



Ceci explique la formation de 15-HPETE et 12-HPETE par la lipoxygénase de réticulocyte à partir de l'acide arachidonique qui n'est pas un substrat optimal pour cette enzyme. De même il y a double spécificité de position avec la lipoxygénase de soja qui métabolise le 15-HPETE en 5,15 di-HPETE et 8,15 di-HPETE et avec la 12-lipoxygénase utilisant le DGLA comme substrat. (Figure 6a)

Le taux relatif de formation de métabolites à spécificité de position d'hydroperoxyde différente n'est pas liée à la seule distance entre méthylènes et accepteur d'hydrogène au moment où la réaction se produit mais aussi aux "difficultés" d'atteindre un alignement approprié pour le substrat ("passer par le trou de serrure").

Il existe deux autres mécanismes pour l'apparition de deux produits différents dans une réaction lipoxygénasique :

- il se forme un pourcentage mineur d'un produit racémique ((S)(R)HPETE) par l'abstraction d'hydrogène à partir d'un même groupement méthylène allylique par dissociation du radical centré sur le carbone suivie d'une oxygénation non enzymatique (= racémique)

- il peut y avoir renversement de l'orientation du substrat par rapport au site actif de l'enzyme, deux produits chiraux différents peuvent se former par abstraction de l'hydrogène du même groupement méthylène allylique (KUHNS et coll., 1990c).

5.2.2. Un déterminant essentiel pour la spécificité de position

Il n'existe pas de structure tridimensionnelle à haute résolution pour les lipoxygénases et comme elles ne présentent pas de grandes analogies avec d'autres protéines, les modèles habituellement conçus par ordinateur des zones majeures de l'enzyme ne sont pas réalisables. C'est pourquoi (SLOANE D.L. et coll., 1991) ont étudié des parties identiques et variables dans la séquence polypeptidique des lipoxygénases pour localiser des résidus acides aminés essentiels dans le cadre de l'action catalytique et la spécificité de la réaction sur le substrat. On connaît déjà, au niveau de la structure protéinique, les nombreuses similitudes qui existent entre les différentes lipoxygénases, en particulier la 12 et la 15-lipoxygénase et, 4 acides aminés qui sont

Optimal substrate: $\omega 6$
well aligned with
hydrogen acceptor

Non-optimal substrate: $\omega 5$
not well aligned with
hydrogen acceptor

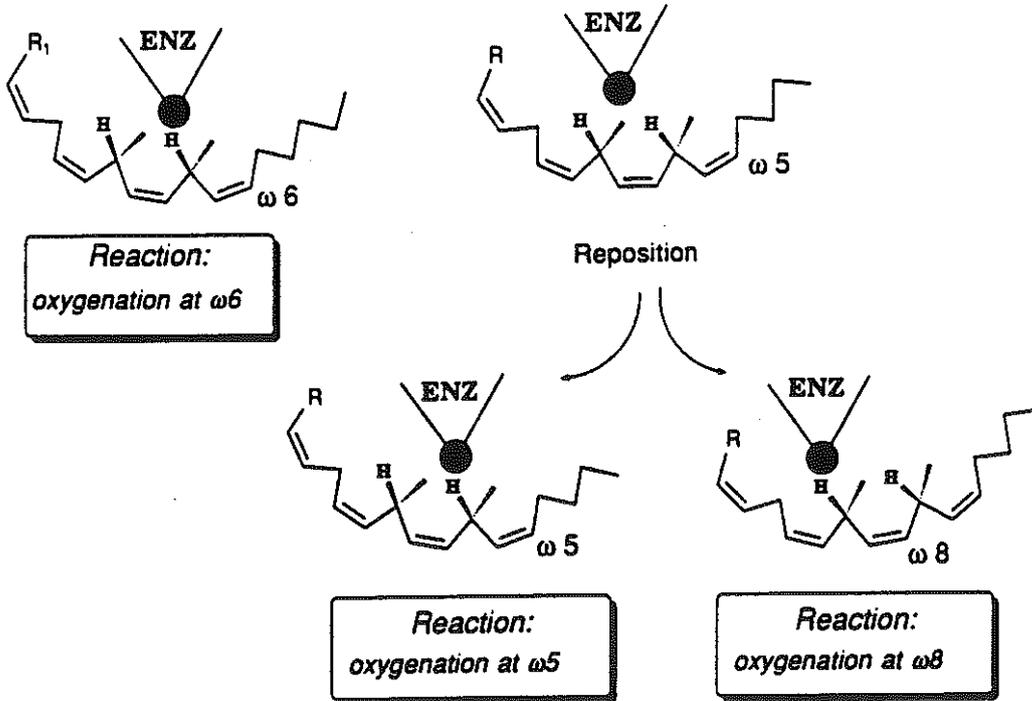
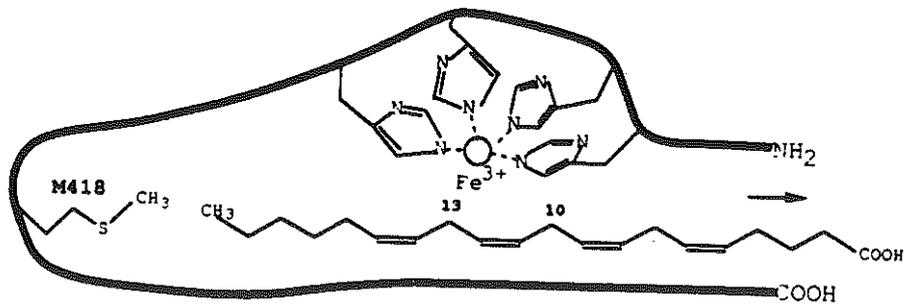
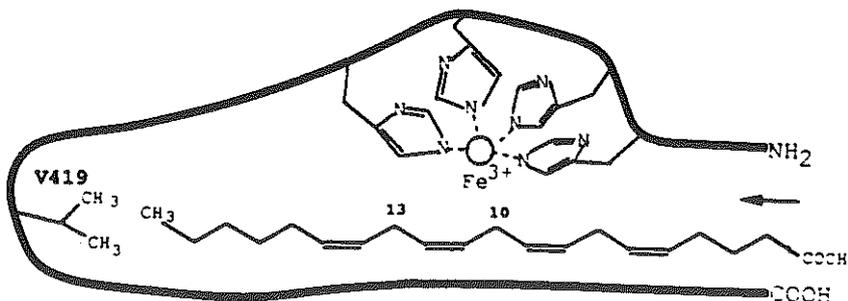


Fig. 6 - Relations Structure-Activité
de la dioxygénation par les lipoxygénases

15-Lipoxygenase



12-Lipoxygenase



constamment présents, (ou un sous groupe de ces acides aminés) et semblent être responsables du positionnement du substrat par rapport au site actif déterminant une 12 ou 15-lipoxygénation.

Les analyses enzymatiques d'une unique, double, triple ou quadruple mutation font apparaître que la Méthionine en position 418 est un déterminant essentiel de la spécificité de position de la 15-lipoxygénase. Lorsque la Met⁴¹⁸ est remplacée par une Valine, sans ou avec d'autres changements, alors l'enzyme catalyse équitablement une 12 et 15-lipoxygénation ; le remplacement par d'autres acides aminés n'entraîne aucune modification de spécificité de position. Ceci suppose que la spécificité de la lipoxygénation est fonction d'un contact entre le substrat et les atomes de la chaîne latérale en position 418, le remplacement de Met par Val se traduit par une réduction du volume de la chaîne latérale de 17 %. On peut noter que l'acide aminé 418 est adjacent à la région contenant les 5 histidines, retrouvées dans toutes les lipoxygénase connues, et considérées comme ayant un rôle important dans la fixation du fer à activité catalytique. En tenant compte de la responsabilité de la Met⁴¹⁸ dans le positionnement du substrat et de la proximité de la zone riche en histidines (SLOANE D.L. et coll., 1991) proposent un modèle d'interaction enzyme-substrat (Figure 6b).

C'est l'acide aminé 418 (Met) dans la 15-lipoxygénase, ou 419 (Val) dans la 12-lipoxygénase, à caractère hydrophobe qui interagit avec l'extrémité méthyle terminale de l'acide gras. Le volume des atomes de la chaîne latérale modifie l'emplacement du substrat et le centre de la réaction puisque ce sont différents carbones des groupements méthylènes qui sont alignés avec le site actif de l'enzyme. Une fixation plus profonde du méthyle terminal déplace le site d'abstraction de l'hydrogène du C₁₃ au C₁₀ de l'acide arachidonique et conduit à une 12-lipoxygénation plutôt qu'à une 15. Enfin les acides aminés adjacents à Met₄₁₈ contribueraient aussi à cette interaction enzyme-substrat.

5.3. Le fer non hémique des lipoxygénases

L'étude de l'environnement métallique des lipoxygénases par résonance paramagnétique électronique (R.P.E.), spectroscopie Mossbauer, spectrométrie d'absorption atomique, montre la

présence d'un atome de fer dans une structure non héminique (à la différence de l'hémoglobine, de la chlorophylle). Cete atome de fer, qui est essentiel pour l'activité enzymatique, diffère d'un point de vue stoechiométrique d'une lipoxygénase à l'autre :

- Les 5 et 12-lipoxygénase porcine leucocytaire possèdent 0,7 à 0,9 atomes de Fe par molécule (KRONECK P.M. et coll., 1991).

- La 15-lipoxygénase réticulocytaire et de soja, 1 atome de Fe par molécule (FORD HUTCHINSON A.W., 1991c).

- La 5-lipoxygénase humaine au moins 1 atome de Fe par molécule (PERCIVAL D., 1991).

A partir du modèle expérimental qu'est la lipoxygénase-1 de soja, par absorption des rayons X, spectrométrie Mossbauer, on a pu préciser la disposition du fer. Celui-ci est lié à 6 ± 1 ligands N et ou O, dont quatre appartiennent probablement à des groupements imidazoles bien connus pour leurs propriétés de chélation (NAVARATMAN S. et coll., 1988). La zone riche en histidines (acide aminé avec un cycle imidazole), retrouvée avec la majorité des lipoxygénases, est supposée être le lieu de fixation de l'atome de fer ; cette séquence aminée est de la forme His-(A.a.)₄-His-(A.a.)₄-His-(A.a.)₁₇-His-(A.a.)₈-His et se retrouve dans la 5-lipoxygénase humaine de la position 363 à 400. Pour mieux connaître la responsabilité de ce site au niveau de l'activité catalytique lipoxygénasique, plusieurs auteurs ont étudié les conséquences de la mutation d'un ou plusieurs acides aminés de cette séquence (FUNK C.D. et coll., 1989) . (NGUYEN T. et coll., 1991) montrent que l'His³⁶³ remplacée par une Sérine n'entraîne pas de perte d'activité enzymatique . Pour (NGUYEN T. et coll.,1991)(ISHII S. et coll., 1992) la conservation d'His³⁶⁸ et d'His³⁷³, à l'inverse, est nécessaire pour le cycle catalytique alors que les autres histidines n'ont pas de rôle crucial (ISHII S. et coll., 1992) conclut, de plus, à l'importance dans cette même zone de la présence d'acide glutamique en position 377, et dans une autre séquence à forte homologie entre les lipoxygénases à la nécessité de la conservation d'histidine en position 55.

5.3.2. Rôle dans la dioxygénation

Deux mécanismes ont été proposés pour la réaction oxgénasique, surtout basée sur l'étude de la lipoxygénase de soja et du réticulocyte, qui mettent en jeu l'atome de fer à l'état d'oxydation ferrique Fe^{3+} .

Le premier : le rôle du fer (Fe^{3+} : oxydant) est d'oxyder le substrat en un radical pentadienyl qui peut réagir directement avec le dioxygène O_2 pour donner un radical peroxy. La réduction du radical peroxy serait due au fer à l'état d'ion ferreux (Fe^{2+}) formant ainsi comme première étape de la réaction lipoxygénasique le produit hydroperoxyde et régénérant par là-même le fer à l'état ferrique. La R.P.E. a permis de caractériser ces deux radicaux d'acide gras intermédiaires liés à la lipoxygénase de soja dans des solutions congelées et des radicaux peroxydes d'acides gras dans des échantillons liquides de lipoxygénase dans les conditions de réaction.

Le second : la déprotonisation du substrat s'accompagne de la formation d'un complexe intermédiaire fer-alkyl. L'insertion d'oxygène se fait au niveau de la liaison carbone-fer, il se forme un complexe peroxyde ferrique (Figure 7) (NELSON M.J., 1991).

Les études actuelles confirmeraient plutôt le premier mécanisme (R.P.E.), dans tous les cas l'ion ferrique est nécessaire à l'activité enzymatique et explique l'inhibition enzymatique exercée par les catéchols, entre autre, au pouvoir réducteur important sur les lipoxygénases qui réduisent Fe^{3+} en Fe^{2+} inactif.

VI - PROPRIETES DES LIPOXYGENASES, DE LEURS METABOLITES

Les métabolites des lipoxygénases, très divers et distribués dans tout l'organisme, sont susceptibles d'exercer un grand nombre d'effets biologiques. Ces propriétés biologiques sont étudiées *in vitro* et ou *in vivo* avec l'aide bien souvent d'inhibiteurs des lipoxygénases qui permettent de les mettre à jour. (Tableau II)

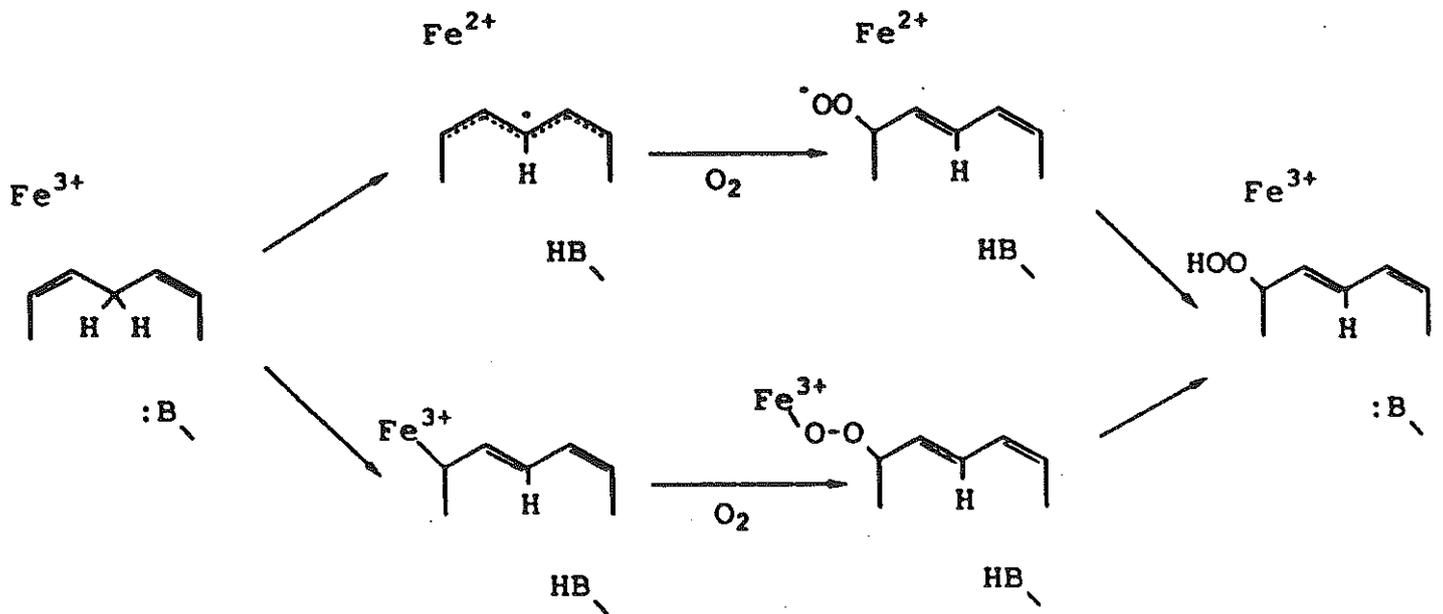


Fig. 7 - Mécanismes d'hydroperoxydation par les lipoxygénases faisant intervenir l'atome de Fer et l'accepteur d'hydrogène

Métabolites des lipoxygénases	Propriétés biologiques
15-HETE, 13-HODE	- Inhibition de la 5-lipoxygénase
15-HETE	- Inhibition de la 12-lipoxygénase - Inhibition du chimiotactisme des neutrophiles induit par le LTB4
15-HETE, LTB4	- Stimulation des lymphocytes cellules T suppressives - Inhibition des cellules T "helper"
12-HETE - 5-HETE, LTB4	- Migration leucocytaire (chimiotactisme et chimiocinétique)
12-HETE - 5 H(P)ETE - LTB4	- Augmentation de la libération d'histamine par les basophiles
12-HETE, LTB4, LTC4, LTD4	- Augmentation de la synthèse d'ADN (kératinocytes humains)
12-HETE, LTB4	* Microabcès intraépidermiques * Hyperprolifération épidermique
LTB4	- Aggrégation - Formation de superoxyde - Dégranulation, libération lysozyme et β -glucuronidase - Adhésion leucocyte / endothélium * Chimiotactisme
LTB4, LTC4, LTD4	* Effet biphasique (hypertension-hypotension) sur la pression artérielle * Eruption papuleuse et érythémateuse * Augmentation de la perméabilité vasculaire * Modification rythme et fréquence cardiaque
LTC4	- Excitation des cellules de Purkinje
LTC4, LTC4	- Contraction des muscles lisses * Vasodilatation

Tableau II - Effets biologiques principaux des produits des lipoxygénases (* = in vivo) d'après (FOGH K., 1990) et (SIROIS P. et BORGEAT P., 1988).

6.1. La 15-lipoxygénase

6.1.1. Sur les membranes biologiques-maturation des érythrocytes

La lipoxygénase réticulocytaire est capable de réaliser l'oxygénation des membranes mitochondriales directement selon un mécanisme calcium-dépendant mais non soumis à l'action de phospholipases, ainsi plus de 50 % des groupements acyls gras polyinsaturés sont oxygénés quand l'intérieur de la membrane mitochondriale est accessible à l'enzyme (GARY F. et coll., 1985). Les produits formés en plus grande quantité sont 15-HETE et 13-HODE. L'oxygénation de cette membrane entraîne un changement drastique dans la structure et la fonction de la mitochondrie : modification des propriétés électroniques passives de la membrane, destruction des groupements fer-soufre, inhibition d'enzymes de la chaîne respiratoire (NADH et succinate oxydase, cytochrome oxydase) et de la monoamine oxydase. Ceci serait due à une décomposition secondaire des hydroperoxydes formés par la lipoxygénase, catalysée par des métaux de transition de la membrane (groupement fer-soufre) ou par la lipoxygénase elle-même (WIESNER R. et coll., 1990).

De même la lipoxygénase peut oxygéner les acides gras polyénoïques de membranes biologiques diverses : membrane endoplasmique, particules submitochondriales, membrane plasmique érythrocytaire. La modification oxydative de toutes ces membranes protéiques pendant la réaction lipoxygénasique dans les réticulocytes contribuerait à les fragiliser, les rendre plus sensibles aux dégradations protéolytiques. Ainsi la lipoxygénase de réticulocyte n'est pas seulement responsable de la décomposition des mitochondries mais aussi interviendrait dans la reconstruction, la modification des organites cellulaires, des membranes plasmiques en rapport avec le processus de maturation des érythrocytes (dégradation complète des mitochondries, des ribosomes, altération substantielle de la membrane cellulaire, synthèse d'hémoglobine, perte du noyau) (KUHN et coll., 1990a). Le rôle des produits de la 15-lipoxygénase dans la différenciation des cellules érythrocytaires a aussi été démontré par (POSTOAK D. et coll., 1990) à un autre niveau, en effet le 15-HETE et 15-HPETE dans les cellules érythrocytaires leucémiques "Friend"

provoquent une augmentation de la synthèse d'ADN des cellules se différenciant mais non de celles proliférant.

On peut envisager aussi que pour d'autres cellules ayant une activité 15-lipoxygénase un tel réarrangement membranaire peut avoir lieu en relation pour les éosinophiles et les cellules épithéliales respiratoires avec une libération de granules de sécrétion ou une production de mucus.

6.1.2. Les LDL

Les lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoprotein) ou L.D.L. peuvent être oxydées par des cellules endothéliales cultivées, des ions cuivriques, des groupements thiols (SPARROW C.P. et coll., 1988), des macrophages péritoneaux de souris (RAUKIN S.M. et coll., 1991). Cette oxydation entraîne une augmentation de leur "captage" par les macrophages ; ce processus peut être relié à la formation de cellules spumeuses dérivées des macrophages qui sont présentes précocément au niveau des lésions d'athérosclérose.

Les LDL natives, captées grâce à des récepteurs cellulaires à leurs apoprotéines apo B/E, ne sont pas des donneurs effectifs de cholestérol pour la formation des cellules spumeuses *in vitro*, mais ce sont les L.D.L. oxydées ou L.D.L. acétylées (acétylation d'un résidu lysine) qui sont à l'origine de la formation des cellules spumeuses via leur captage par des récepteurs d'acétyl LDL (ou "scavenger receptor") des macrophages (SPARROW C.P. et coll., 1988). On retrouve aussi des lipoprotéines oxydées dans le plasma de personnes ou d'animaux diabétiques.

Le mécanisme d'oxydation des LDL est donc à explorer dans le but de comprendre comment un composant plasmatique normal devient un médiateur potentiel de lésions tissulaires. De nombreux auteurs ont montré que le mécanisme d'oxydation des LDL pouvait être médié par la 15-lipoxygénase (CATHCART M.K. et coll., 1991) (RAUKIN S.M. et coll., 1991) (SPARROW C.P. et coll., 1988)... mais le processus n'est pas vraiment connu. Les hydroperoxydes d'acides gras formés dans les LDL par action de la 15-lipoxygénase, produits instables, oxydèrent l'apo B générant des épitopes reconnus par le récepteur des macrophages. Cette oxydation par les hydroperoxydes lipidiques serait directe ou par la formation d'un anion

superoxyde (radical atomique oxygène) : mécanisme de cooxydation des lipoxigénase bien connu sur le carotène et autres molécules organiques (SPARROW C.P. et coll., 1988). L'hypothèse de formation d'hydroperoxyde d'acide gras par la 15-lipoxigénase dans les LDL pourrait être confirmée par l'oxygénation d'esters de cholestérol contenant des acides gras polyénoïques par la lipoxigénase réticulocytaire ; ces ester de cholestérol sont des constituants des LDL (BELKNER J. et coll., 1991). Mais en fait le niveau auquel la 15-lipoxigénase des macrophages agit n'est pas clair : est-ce directement sur la surface phospholipidique des LDL ou bien indirectement par la formation intracellulaire de produits d'oxygénation suivie d'un "transfert" aux LDL (FORD HUTCHINSON A.N. et coll., 1991a). Certains auteurs contestent l'intervention de lipoxigénases dans la modification oxydative des LDL (SPARROW C.P. et coll., 1992) (simple rôle de cooxydation non dirigée vers les LDL).

La 15-lipoxigénase pourrait donc être, à travers son inhibition, une nouvelle voie de recherche dans la prévention de l'athérosclérose.

6.1.3. Autres propriétés

a) Au niveau des voies aériennes supérieures

Le 15-HETE, dérivé par réduction de l'hydroperoxyde d'acide arachidonique le 15-HPETE composé instable formé par la 15-lipoxigénase, est présent non seulement au niveau des cellules épithéliales bronchiques mais aussi des cellules épithéliales nasales.

La formation de 15-HETE est augmentée chez les patients asthmatiques. La libération de 15-HETE bronchique s'accroît après l'exposition à un allergène pulmonaire chez l'homme (FORD HUTCHINSON A.N., 1991a) de même au niveau des sécrétions nasales après exposition à un antigène nasal (RAMIS I. et coll., 1991). Le rôle du 15-HETE n'est pas vraiment connu au niveau O.R.L. : modulation de la production de mucus, de sécrétions, bronchoconstriction, potentialisation de la libération cellulaire de médiateurs induite par les allergènes ?

b) Au niveau inflammation-immunité

Le 15-HETE n'a pas de capacité pro-inflammatoire au contraire, *in vitro* il inhibe la formation de 12-HETE et de LTB₄, et plus spécifiquement l'effet chimiotactique du LTB₄ (attraction des cellules leucocytes, macrophages... sur le site de l'inflammation), il peut être considéré comme un régulateur du processus inflammatoire induit par le LTB₄

Ainsi dans le psoriasis, pathologie dermatologique inflammatoire chronique marquée par un hyperprolifération cellulaire, le 15-HETE et le 13-HODE issus des leucocytes infiltrés sont présents à des concentrations biologiquement actives et jouent un rôle anti-inflammatoire (FOGH K., 1990) ; de même l'administration en continu de 15-HETE chez un chien atteint d'arthrite induite par les carragénanes, entraîne une réduction significative de la production de LTB₄, des signes cliniques et de la migration des neutrophiles démontrant *in vivo* les effets anti-inflammatoires du 15-HETE (FOGH K. et coll., 1989).

Le 15-HETE affecte aussi certaines fonctions des lymphocytes T, le 15-HETE, qui est le métabolite principal de la lipoxygénase des lymphocytes T, inhiberait leur prolifération stimulée par la non-différenciation ; le 15-HETE et 15-HPETE entraîneraient une inhibition des cellules T "helper" (sous population de cellules T qui perversent aider au développement de cellules cytotoxiques ou coopérer avec les cellules B pour la production d'anticorps. Les cellules helper reconnaissent l'antigène en association avec les molécules de classe II du CMH) et une stimulation des cellules T "suppressives" (sous population de cellule T qui diminuent les réponses d'autres cellules T ou cellules B. La suppression peut être spécifique de l'antigène ,spécifique de l'idiotypé ou non spécifique) (GUALDE N., 1985).

c) Au niveau de la sphère génitale

Le 15-HETE jouerait un rôle dans la réactivité de l'acrosome des spermatozoïdes des mammifères : la membrane acrosomiale fusionnant avec la membrane plasmique libre des

enzymes protéolytiques, par exocytose, nécessaire à la pénétration du spermatozoïde jusqu'à l'ovocyte ; une inhibition par des inhibiteurs non spécifiques de la lipoxygénase de la formation de 15-HETE est associée à une inhibition de la réaction acrosomiale, cette inhibition est prévenue par l'apport de 15-HETE ou 15-HPETE (LAX Y. et coll., 1990).

Enfin le 15-HETE, sur les cellules ovariennes de rate, stimule la production de PG E2 (prostaglandine E2) (WANG J. et coll., 1989) qui possède des propriétés ocytociques.

6.2. La 12-lipoxygénase

6.2.1. Inflammation - cas du psoriasis

Le 12-HETE, molécule pro-inflammatoire, partage quelques propriétés avec le LTB4 selon une intensité moindre : stimulation de la synthèse d'ADN, chimiotactisme et chimiocinétiq (mobilité non orientée des cellules) vis à vis des neutrophiles et éosinophiles. L'énantiomère 12(R)-HETE est plus actif que le 12(S)-HETE. Au niveau de l'affection inflammatoire psoriasique, le 12-HETE provient des kératinocytes et voit sa formation augmentée par rapport à une peau normale avec des concentrations importantes dans les lésions des plaques chroniques et les lésions aiguës. Le 12-HETE est capable d'induire inflammation cutanée et la prolifération des kératinocytes *in vivo*. L'application cutanée locale de 12-HETE aboutit à une peau érythémateuse et indurée avec invasion par les neutrophiles et les leucocytes mononucléaires (FOGH K., 1990). Le 12-HETE jouerait un rôle important dans l'accumulation extravasculaire des neutrophiles et dans le maintien de l'affection psoriasique (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990).

6.2.2. Immunité

Le 12-HETE augmente l'expression des récepteurs C3b des neutrophiles, éosinophiles, phagocytes (récepteurs pour le fragment C3b du complément permettant l'adhérence immunitaire des phagocytes sur toute particule revêtues de C3b suivie ensuite d'une phagocytose de cette particule virale, bactérienne, autre...) et augmente la libération d'enzymes lysosomiales (WONG P.Y.K. et coll., 1988).

6.2.3. Aggrégation plaquettaire

Le 12-HPETE inhiberait l'aggrégation plaquettaire en modulant l'activité proaggrégante des endoperoxydes : prostaglandines et Thromboxane A₂.

Le produit de la 12-lipoxygénase de l'acide gras C_{20:3}(n-9) potentialise l'aggrégation plaquettaire à faibles concentrations, l'inhibe à fortes concentrations (LAGARDE M. et coll., 1985).

6.2.4. Activité sécrétoire

Le 12-HETE jouerait un rôle crucial au niveau des îlots pancréatiques, des cellules de la zone glomérulée adrénaliennne (SPECTOR A.A. et coll., 1988) le 12 (S) inhibe la libération basale d'insuline induite par le glucose alors que l'hépoixiline, dérivé du 12-HETE par activité hydroperoxydasique, et le LTC₄ l'activent. Le glucose favorisant la formation d'eicosanoïdes dans les îlots de Langerhans, l'inhibition par les métabolites lipoxygénasiques de la sécrétion d'insuline induite par le glucose suggère l'existence d'un rétrocontrôle négatif (NATHAN M.H. et PECK S.D., 1990).

12-HETE, au niveau des cellules ovariennes de rate, stimule la production de PG E₂ (prostaglandine E₂) et de Progestérone. Les métabolites des lipoxygénases de l'acide

arachidonique seraient des médiateurs possibles pour la production d'hormone dans différentes glandes endocrines, ils entraînent ainsi au niveau de la tige pituitaire une augmentation de la libération de prolactine (15-HETE) et de LH (leucotriènes) (WANG J. et coll., 1989).

6.2.5. Cancérologie

Il existerait un lien entre la synthèse de 12(S)-HETE et le développement de métastases, le 12(S)-HETE augmentant l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales à la matrice subendothéliale et la fibronectine. Cet effet est corrélé à l'expression à la surface cellulaire d'un récepteur "integrin" Gp IIb/IIIa.

Les récepteurs "integrin" sont des médiateurs des interactions matrice extracellulaire/cellule et cellule/cellule. Des méthodes biochimiques et immuno-cytochimiques ont mis en évidence sur la surface plaquettaire des récepteurs "integrin" α IIb β 3 au niveau des plaques d'adhésion focale, et dans la région périnucléaire des cellules métastatiques B16a d'un mélanome murin. Le 12(S)HETE participerait à la régulation de l'expression de ce récepteur à la surface des cellules de carcinome et de mélanome (HONN K.V. et coll., 1988) (CHOPRA H. et coll., 1991).

(HERBERTSSON H. et HAMMARSTRÖM S., 1992) ont mis en évidence au niveau de cellules de carcinome pulmonaire de Lewis un site de fixation pour le 12(S)-HETE ayant les caractéristiques d'un récepteur.

6.3. La 5-lipoxygénase

Les leucotriènes peuvent être produits par différents types de cellules : polynucléaires, monocytes-macrophages, mastocytes, kératinocytes. Les basophiles et mastocytes qui libèrent des

quantités importantes de leucotriènes représentent des modèles expérimentaux intéressants. La libération des leucotriènes s'effectue lors de diverses réactions d'hypersensibilité comme l'anaphylaxie, l'asthme, l'allergie, ainsi que dans l'inflammation ; leur action n'étant pas isolée mais liée à la libération d'autres métabolites tels que les produits de la cyclooxygénase (TOREL J. et coll., 1985). Le LTB_4 a pour principale cible les leucocytes alors que les peptido-leucotriènes affectent surtout les muscles lisses et autres cellules contractiles (SAMUELSSON B. et coll., 1987).

6.3.1. Dans l'Inflammation

a) *Processus inflammatoire*

Le processus inflammatoire est une réaction de défense à une lésion ou stimulation cellulaire excessive ou anormale. Son origine peut être un traumatisme, une brûlure, la pénétration d'agents pathogènes ou d'autoantigènes (induisant la formation d'autoanticorps) ; ses signes cliniques au niveau cutané sont rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur.

La réponse immune inflammatoire implique des cellules participant en partie à la réponse immune ; les lymphocytes T réactifs : T4 "helper", T8 "suppressor", la production de médiateurs cellulaires les cytokines (interleukine, TNF : tumor necrosis factor, TGF : transforming growth factor...). Ces cytokines suivant les étapes d'inflammation aiguë ou chronique peuvent conduire à la synthèse d'inhibiteurs ou d'activateurs qui peuvent avoir un effet de rétrocontrôle sur le processus inflammatoire.

Les mécanismes de l'inflammation peuvent être schématisés par la séquence et les manifestations cellulaires et tissulaires suivantes :

- phase vasculaire et plasmatique : la lésion vasculaire initiale (incluant l'endommagement de la cellule endothéliale) est présente dans la réaction d'hypersensibilité mais est aussi impliquée dans des pathologies inflammatoires du tissu conjonctif (sclérodermie, arthrite rhumatoïde). Le stimulus initial a lieu soit directement au niveau de l'endothélium et des cellules

circulantes sanguines, soit au niveau des cellules immunes normalement présentes dans des organes spécifiques. Les conséquences sont une vasoconstriction puis une vasodilatation des microcapillaires par libération des amines vasoactives (histamine, sérotonine, bradykinines), une adhésion plaquettaire et leucocytaire aux cellules endothéliales.

- phase d'exsudation plasmatique et cellulaire : la contraction des cellules endothéliales n'assure plus la continuité de la paroi, ce qui permet l'exsudation plasmatique et la migration extravasculaire des leucocytes. Cette phase est marquée par des phénomènes de chimiotactisme pour les phagocytes, de lyse bactérienne, d'opsonisation facilitant la reconnaissance et la phagocytose, de diapédèse, de stimulation de réponse immunitaire.

- recrutement, différenciation et prolifération cellulaire : il se produit un chimiotactisme, une différenciation du promonocyte en monocyte puis en macrophage (cellule résidente tissulaire), une maturation des lymphocytes B en lymphoblastes et plasmocytes (qui sécrètent les immunoglobulines), et une stimulation des lymphocytes T.

- activation de cellules spécifiques d'organe par des cytokines et libération d'enzymes protéolytiques suivie de la destruction de la matrice cellulaire.

- tentative de régénération et de fibrose.

b) Rôle du LTB_4

Le LTB_4 n'a pas d'effet direct sur le courant sanguin mais il stimule spécifiquement certaines fonctions des leucocytes. La réponse initiale au LTB_4 est une augmentation de l'adhérence leucocytaire à l'endothélium des veinules post-capillaires. Puis la perméabilité microvasculaire augmente, en réponse aux cystéinyl-leucotriènes (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4), par contraction des cellules endothéliales adjacentes entraînant l'élargissement des pores endothéliaux. Il y a ensuite afflux dans le compartiment tissulaire de leucocytes par diapédèse stimulée par les facteurs chimiotactiques (LTB_4 , fragment C5a du complément, f Met Leu Phe). Le LTB_4 a un effet chimiotactique puissant en particulier sur les neutrophiles, un effet chimiocinétique et plus faiblement chimiotactique sur les éosinophiles (LEWIS R.A. et coll., 1990). Les propriétés des

leucotriènes conduisent ainsi à la formation d'oedème, ce qui a été montré chez l'animal et l'homme après application topique ou injection de LTB₄ (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990).

A de fortes concentration le LTB₄ induit une dégranulation des polynucléaires et la sécrétion d'enzymes lysosomiales (TOREL J. et coll., 1985). A de faibles concentration le LTB₄ augmente l'activité cellulaire cytotoxique naturelle, stimule la différenciation des lymphocytes T suppresseurs à partir de leurs précurseurs dépourvus du marqueur (CD8). Le LTB₄ aurait d'autres fonctions immunorégulatrices telles que la stimulation de la sécrétion par les cellules T d'interféron γ (qui augmente la résistance cellulaire aux infections virales) et d'interleukine-2 (qui favorise la prolifération des lymphocytes T) et, par l'intermédiaire d'élaboration d'interférons, l'augmentation de la biosynthèse d'interleukine-1 par les monocytes. Le LTB₄ agit en synergie avec les facteurs stimulants les cellules B comme l'interleukine-2 et -4 et augmente la réplication cellulaire ; les cellules B voient leur production d'immunoglobulines stimulée par le LTB₄ (SAMUELSON B. et CLAEISSON H.E., 1990).

Enfin, la stimulation de la myélopoïèse au niveau de la moelle osseuse pourrait dépendre du LTB₄ (LEWIS R.A. et coll., 1990).

c) Rôle des cystéinyl-leucotriènes : LTC₄ LTD₄ LTE₄

Ils sont très étudiés pour leur effet bronchoconstricteur, chez une grande variété d'espèces animales. LTC₄, LTD₄, LTE₄ sont considérablement plus puissants (100 à 1000 fois plus) que l'histamine pour la contraction des muscles lisses respiratoires (SAMUELSON B. et coll., 1987) ; le LTE₄ est caractérisé par un effet faible mais prolongé (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990). Cette action se situe au niveau des lobes pulmonaires, des segments bronchiques et des plus petites voies aériennes du parenchyme respiratoire. LTB₄, LTC₄, LTD₄ favoriseraient aussi la sécrétion de mucus par les voies aériennes (SAMUELSON B. et coll., 1987) (LEWIS R.A. et coll., 1990). Et en effet l'étude de l'inhalation de leucotriènes chez des sujets sains et des sujets asthmatiques a corroboré le fait que LTC₄, LTD₄ sont de puissants inducteurs d'obstruction

respiratoire (SAMUELSSON B. et coll., 1987) : bronchoconstriction, production de mucus et oedème.

Les peptides leucotriènes agissent aussi sur la perméabilité et la tonicité vasculaire. Ils augmentent la perméabilité microvasculaire au niveau respiratoire, comme ailleurs, en agissant directement sur des cellules endothéliales des veinules des post-capillaires. La fuite de plasma induite par LTC₄ et ses métabolites est généralement précédée d'une constriction artériolaire (SAMUELSON B. et coll., 1987). Les leucotriènes C₄ et D₄ ont un effet constricteur sur divers vaisseaux grands ou petits de différentes espèces, on peut observer parfois une réponse vasodilatatrice. L'activité constrictrice de LTC₄ a été montrée diminuant *in vivo* lors de doses répétées (tachyphylaxie) (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990).

D'une manière générale les leucotriènes sont de puissants stimulants des muscles lisses intestinaux, de la trachée, des bronches, du parenchyme pulmonaire...

Enfin les cystéinyls leucotriènes, avec le LTB₄ agissent comme des facteurs de croissance et ou de différenciations cellulaires *in vitro* : LTC₄ et LTD₄ participeraient à l'expansion de colonies myéloïdes en réponse à un facteur de stimulation (C.S.F. : colony stimulating factor) ; LTC₄ et LTD₄ induisent la prolifération de cellules épithéliales glomérulaires et, lorsque la synthèse basale de prostaglandines est inhibée, la prolifération des fibroblastes (LEWIS R.A. et coll., 1990).

d) Pathologie allergique

Depuis la description de la S.R.S-A. (slow reacting substance of anaphylaxis) qui est produite lors de l'exposition d'un poumon sensibilisé à un antigène, les leucotriènes jouent un rôle dans les réactions allergiques respiratoires où interviennent les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles.

Ainsi on retrouve dans les sécrétion nasales de patients atteints d'une rhinite allergique, dans les sécrétions lacrymales en cas de conjonctivite allergique, la présence de LTC₄, LTD₄, LTE₄ ; de même au niveau du sérum lors d'une réaction anaphylactique aiguë à l'indométacine . Chez des patients asthmatiques, LTC₄ et LTD₄ sont présents dans le plasma et au niveau du

liquide bronchoalvéolaire obtenu par lavage. En rapprochant cela des propriétés pharmacologiques des leucotriènes sur les voies respiratoires, on peut supposer que les leucotriènes sont d'importants médiateurs de l'asthme. La diminution du débit expiratoire, signe clinique de l'asthme, est notable après l'inhalation d'aérosols de cystéinyl-leucotriènes, ceux-ci affectant les voies respiratoires centrales et périphériques alors que l'histamine touche plus les voies périphériques (LEWIS R.A. et coll., 1990).

e) Autres maladies inflammatoires

Les leucotriènes pourraient avoir un rôle substantiel dans la pathogénèse de diverses maladies inflammatoires où ils sont présents, leur importance restant à prouver (migration leucocytaire, oedème...).

Ainsi on a identifié le LTC₄ au niveau des sécrétions bronchiques lors de syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte, d'hypertension pulmonaire néonatale ; on a mis en évidence le LTB₄ au niveau du liquide articulaire en cas de goutte, d'arthrite rhumatoïde, au niveau de la muqueuse intestinale et de sécrétions rectales dans des maladies digestives inflammatoires (colite ulcéraire, maladie de Crohn) (LEWIS R.A. et coll., 1990). Enfin LTB₄, LTC₄ et LTD₄ sont retrouvés au niveau des lésions cutanées de psoriasis ; LTB₄ et de fortes concentrations de LTC₄ et LTD₄ augmentent la synthèse d'ADN de kératinocytes épidermiques cultivés ce qui peut être relié à l'hyperprolifération épidermique du psoriasis (FOGH K. et coll., 1990).

6.3.2. Système cardiovasculaire

Au niveau systémique la réponse vasculaire aux leucotriènes est complexe et varie selon les espèces. Le plus souvent l'injection de LTC₄, LTD₄ est suivie d'une phase hypotensive de longue durée due à une sortie généralisée du plasma du système microvasculaire (hémococoncentration). De plus LTC₄, LTD₄, LTE₄ réduisent la pression sanguine en diminuant la

contractilité cardiaque et le débit coronarien. La phase hypotensive est habituellement précédée d'un effet presseur qui est la conséquence de la constriction artériolaire générale première (SAMUELSSON B. et coll., 1987). Les leucotriènes entraînent, en fait, la réduction de la tension développée par les ventricules qui apparaît être secondaire à la diminution du débit coronarien, le LTC₄ est plus puissant que le LTD₄, son action est plus lente à apparaître mais dure plus longtemps (PIPER P.J. et coll., 1990). Les métabolites de la 5-lipoxygénase pourraient intervenir dans la conduction cardiaque par stimulation de la conductance du potassium résultant de l'activation de récepteurs des canaux potassiques muscariniques cardiaques (NAKAJIMA T. et coll., 1991) et ayant pour conséquence un effet modérateur du rythme cardiaque (chronotrope négatif).

D'après leurs propriétés, leur détection dans un coeur reperfusé après un infarctus, l'effet bénéfique d'inhibiteurs de la 5-lipoxygénase au niveau de l'expérimentation animale, les leucotriènes pourraient participer aux ischémies myocardiques (BRAIN S.D. et WILLIAMS T.J., 1990).

6.3.3. Système nerveux central

La plus grande production de LTC₄ du système nerveux central se fait au niveau de l'hypothalamus et sa distribution est similaire à celle de la LHRH (Luteinising Hormon Releasing Hormon), suggérant un rôle neuroendocrinien pour le LTC₄. En effet le LTC₄ stimule la libération de LH par les cellules pituitaires antérieures chez l'animal selon des caractéristiques différentes de la LHRH. De plus le LTC₄ augmente aussi la sécrétion de LHRH (intervenant dans le cycle menstruel).

Les leucotriènes LTC₄ et LTD₄ sont capables d'exciter des neurones cérébelleux de Purkinje et pourraient avoir un rôle de neuromodulateurs (SAMUELSSON B. et coll., 1987). Enfin dans certaines conditions pathologiques telles qu'ischémie, hémorragie, traumatisme, il y a production de leucotriènes. Le LTC₄, le plus commun des leucotriènes du système nerveux

central, vasoconstricteur et augmentant la perméabilité vasculaire pourrait jouer un rôle dans les œdèmes cérébraux lors d'ischémie cérébrale aiguë (AKTAN S. et coll., 1991).

6.3.4. Autres

a) Au niveau du rein

Le LTD₄ diminue le coefficient d'ultra filtration glomérulaire par réduction du débit plasmatique glomérulaire (augmentation de la résistance de l'artériole efférente) dans les phénomènes inflammatoires, pouvant conduire à l'insuffisance rénale (TAKAHASHI K. et BADR K.F., 1990). De même l'affaiblissement de la fonction hémodynamique rénale, chez l'animal, est associé à l'augmentation de la production de LTB₄ et LTC₄ au niveau de préparations de cortex rénal ; les leucotriènes interviendraient dans les néphrites, les dysfonctionnements rénaux (SPURNEY R.F. et coll., 1991).

b) Au niveau gastrique

La modification de la microcirculation de la muqueuse ou sous muqueuse gastrique serait un des facteurs clés de l'induction de la nécrose gastrique dues aux irritants topiques (éthanol, A.I.N.S., ...). LTC₄ et LTD₄ réduisent le débit vasculaire et entraînent une stase sanguine au niveau de la microcirculation sous muqueuse gastrique chez le rat ressemblant aux effets de l'éthanol ; augmentant de plus la perméabilité vasculaire ils ont été mis en cause dans le processus physiopathologique de diverses atteintes de cette muqueuse. Mais ce ne sont pas les médiateurs principaux de la nécrose tissulaire ulcéreuse, la contribution des différents métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines) et les équilibres entre éléments de protection et éléments agressifs étant essentiels (PESKAR B.M., 1991) (PESKAR B.M., 1990).

6.3.5. Récepteurs des leucotriènes

Les leucotriènes exercent leurs effets biologiques par interaction avec des récepteurs distincts au niveau de différents tissus . En effet les réponses physiologiques qu'ils entraînent sont caractérisées :

- par l'importance de la stéréoisométrie avec une forte préférence pour les composés chiraux naturels tels que l'isomère 5(S),6(R) pour le LTD₄

- par une fixation réversible, saturable des ligands sur un site découvert grâce à des molécules marquées (antagonistes et agonistes) .

L'ensemble confirme la présence de récepteurs membranaires pour LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄ . Une classification est même proposée par (KRELL R.D. et coll.,1990) (Tableau III).

Le récepteur du LTC₄ est appelé pLT1, aucun antagoniste n'a été encore découvert. Les récepteurs pLT2 auraient plutôt pour agonistes les LTD₄ et LTE₄ ; plusieurs antagonistes peuvent se lier à ces récepteurs.

Dans cette classification ne figure pas toutes les localisations où les leucotriènes provoquent une réponse biologique (parenchyme pulmonaire, système cardiovasculaire, appareil digestif, ...) la complexité des cellules et l'insuffisance des connaissances pharmacologiques ne permettant pas pour l'instant de définir des types de récepteurs.

En fonction de l'affinité du LTB₄ pour ses récepteurs on en détermine deux sortes :

- Ia (haute affinité) qui serait à l'origine de l'effet chimiotactique, chimiocinétiq ue et de l'augmentation de l'adhérence cellulaire

- Ib (faible affinité) responsable de la dégranulation et de la production d'anion superoxyde.

Le récepteur du LTB₄ de la membrane du neutrophile est associé à une protéine G liée au GTP (Guanosine Triphosphate) qui régule l'affinité du récepteur pour le ligand et transmet le signal ; de même l'affinité du LTD₄ pour son récepteur dépend du GTP (LEWIS R.A. et coll., 1990), la transmission du signal faisant intervenir des protéines G à l'origine de mobilisation de calcium dans la cellule cible (CROOKE S.T. et coll., 1990).

Récepteur	Localisation tissulaire	Agoniste(s)	Antagoniste(s)
Pour les peptido-leucotriènes pLT1	Muscle lisse de la trachée (cochon d'inde)	LTC4	Aucun actuellement
pLT2a	*	LTD4 / E4	Haute affinité pour FPL 55 712 LY 171, 883 SKF 104, 353 ICI 204, 219
pLT2b	*	LTD4 / E4	Haute affinité pour FPL 55 712
pLT2c	Muscle lisse bronchique (humain)	LTC4 / D4 / E4	FPL 55 712 SKF 104, 353 ICI 204, 219 ...
pLT2d	Pléon (cochon d'inde)	LTD4 / E4	FPL 55 712 LY 171,883
Pour LTB4 la	Polymorphonucléaires	LTB4 (haute affinité)	
lb	*	LTB4 (faible affinité)	

Tableau III - Classification des Récepteurs des Leucotriènes
D'après KRELL R.D., et coll, 1990

6.4. Les lipoxines

Les lipoxines appartiennent à une classe assez nouvelle de métabolites de l'acide arachidonique dont la biosynthèse met en jeu l'interaction de différentes lipoxygénases. La lipoxine A₄ (LXA₄), représentant majeur, présente des propriétés biologiques importantes au niveau inflammatoire, immunologique, rénal,...

6.4.1. Inflammation

La LXA₄, étudiée chez le Hamster (la joue), diminue la vasodilatation et le débit sanguin sans modifier la perméabilité vasculaire ou l'adhésion leucocyte-endothélium. La LXA₄ pourrait être inhibitrice des actions induites par le médiateur de l'inflammation qu'est le LTB₄, bloquant l'extravasion du plasma et la diapédèse des leucocytes dont le LTB₄ est à l'origine. Elle inhibe aussi, *in vitro*, le chimiotactisme des neutrophiles dû au LTB₄ ou au FMLP (HEDQVIST P. et coll., 1990), mais elle augmente la production d'anion superoxyde et est responsable de bronchoconstriction chez l'animal (SAMUELSSON B. et coll., 1987). L'ensemble de ces propriétés fait supposer que la LXA₄ participerait à une régulation basse de l'inflammation.

6.4.2. Immunité cellulaire

LXA et LXB bloquent l'activité des cellules NK (Natural Killer : cellules ayant la capacité intrinsèque de reconnaître et détruire certaines cellules infectées par des virus et certaines cellules tumorales) stéropécifiquement (SAMUELSSON B. et coll., 1987).

6.4.3. Autres

a) Au niveau rénal

LXA₄ provoque une réponse vasodilatatrice, réduit la résistance artérielle afférente entraînant une augmentation du débit plasmatique dans le glomérule, elle entrerait en compétition avec le LTD₄ au niveau de ses récepteurs des cellules mésangiales et induirait une libération de prostaglandines vasodilatrices comme dans le tissu vasculaire et bronchique. LXB₄ est inactive sur le rein (TAKAHASHI K. et BADR K.F., 1990).

b) Protéine kinase C

LXA active la protéine kinase C isolée et pourrait servir de signal intracellulaire modulant certains systèmes enzymatiques (SAMUELSSON B. et coll., 1987).

6.5. Remarque

Les végétaux possèdent comme on l'a vu, des lipoxygénases dont les propriétés, et celles de leurs métabolites, sont beaucoup moins étudiées que celles des lipoxygénase animales, mais on a pu déterminer l'intervention des lipoxygénases végétales au niveau

- de la croissance, de la maturation de la graine, des organes de la plante, jusqu'à la sénescence.
- de la défense contre les agents pathogènes.
- de la réparation, cicatrisation des lésions, des traumatismes tissulaires.

VII - INHIBITION DES LIPOXYGENASES

L'inhibition de l'activité lipoxygénasique joue un grand rôle dans la recherche actuelle, elle peut avoir lieu à différents niveaux :

- en amont des lipoxygénases où les inhibiteurs de la phospholipase A2 diminuent la biodisponibilité du substrat qu'est l'acide arachidonique restreignant sa métabolisation par la cyclooxygénase et la lipoxygénase ; c'est le site d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens (cortisone, hydrocortisone et dérivés).

- en aval des lipoxygénases avec la découverte d'antagonistes des leucotriènes en particulier au niveau des récepteurs cellulaires au LTD₄, des essais cliniques étant en cours dans la pathologie asthmatique ; et avec des inhibiteurs d'enzymes responsables de la voie des leucotriènes (LTA₄ hydrolase, LTC₄ synthétase).

- directement au niveau de la lipoxygénase pour court-circuiter par des inhibiteurs l'ensemble de la voie métabolique, le plus souvent dans le cadre d'applications thérapeutiques contre les pathologies inflammatoires, allergiques, immunologiques, ... ; l'emploi d'inhibiteurs de la 5-lipoxygénase serait une alternative à l'usage des anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs de la cyclooxygénase aux effets secondaires bien connus (ulcérogènes, allergiques, ...).

A côté de l'application pharmacologique des inhibiteurs des lipoxygénases, ils ont été et sont encore utilisés pour analyser les différentes étapes biochimiques, les mécanismes d'activation (FLAP), les sites récepteurs (LTD₄), les propriétés physiologiques, physiopathologiques des métabolites.

7.1. Classification des inhibiteurs des lipoxygénases

7.1.1. Les substances "rédox"

Les phénols, naphthols, catéchols ; les quinones, flavones, phénidone (1-phényl-3-pyrazolidone) ; les hydroxylamines et acides N-alkylhydroxamiques ont le pouvoir de réduire le

site actif de l'enzyme : l'ion ferrique actif est transformé en ion ferreux inactif (NELSON M.J. et coll., 1991) (FORD HUTCHINSON A.W., 1991b). Le mécanisme de réduction n'est pas connu, mais ces composés peuvent générer par un cycle pseudoperoxydasique des radicaux intermédiaires qui sont capables de former des liaisons covalentes avec les protéines dont la lipoxygénase elle-même (FORD HUTCHINSON, 1991b).

7.1.2. Les antagonistes compétitifs des récepteurs des lipoxygénases

En présence de MK 886, la translocation de la 5-lipoxygénase de son pool cytosolique à la membrane où elle métabolise l'acide arachidonique est inhibée, le MK 886 se fixant compétitivement sur la cible protéique membranaire de la 5-lipoxygénase : la FLAP ; ceci a pour conséquence une forte inhibition de la synthèse des leucotriènes (FORD HUTCHINSON A.W., 1991c).

7.1.3. Les analogues de substrat

L'ETYA analogue de l'acide arachidonique, les doubles liaisons en 5,8,11,14 ayant été remplacées par des liaisons acétyléniques, inhibe la 12-lipoxygénase, la 5-lipoxygénase (ainsi que la cyclooxygénase) (PALMER R.M.J. et SALMON J.A.). Il prend la place de l'acide arachidonique au niveau du site de fixation sur la lipoxygénase et doit bloquer l'activité catalytique.

D'autres analogues d'acides gras polyinsaturés substrats des lipoxygénases, dérivés acétylés en particulier, agissent de la même façon.

7.2. Influence de la diététique

A côté de l'inhibition stricte des lipoxygénases par des molécules pharmacologiques, des stratégies diététiques peuvent influencer la cascade de l'acide arachidonique.

En effet l'ingestion d'acides gras précurseurs des eicosanoïdes autre que l'acide arachidonique entraîne la formation de métabolites par la lipoxygénase (et par la cyclooxygénase) moins actifs biologiquement, de plus ces acides gras polyinsaturés entrent en compétition avec l'acide arachidonique au niveau du site de fixation du substrat de la lipoxygénase. Cette compétition a pour conséquences une diminution de la synthèse de leucotriènes, lipoxines, acides gras hydroxylés dérivant de l'acide arachidonique (FISHER S., 1989) (WEBER P.C., 1990).

Plusieurs études vont dans le même sens ; l'administration d'huile de poisson riche en acides gras polyinsaturés de la série n-3 (EPA et acide docosahexaénoïque) entraîne une diminution du chimiotactisme des neutrophiles et de l'adhésion leucocytaire aux cellules endothéliales, avec d'un point de vue clinique des effets bénéfiques dans les maladies inflammatoires (psoriasis, dermatite atopique, arthrite rhumatoïde, asthme bronchique) (LEE T.H., 1991).

(ZIBOH V.A. et FLETCHER M.P., 1992) ont montré qu'une supplémentation en acide gras polyinsaturé (acide gamma linoléinique) apporté par l'huile de bourrache, chez des adultes, se traduisait par une augmentation de la présence de DGLA (série n-6 des acides gras polyinsaturés) dans les phospholipides membranaires des polynucléaires parallèlement à la suppression de la formation de LTB_4 dans les cellules.

DEUXIEME PARTIE
EXPERIMENTATION

I - MATERIELS

1.1. L'enzyme

Il s'agit de la lipoxygénase de soja, isoenzyme 1 : préparée à partir de graines de soja par gel de filtration et chromatographie d'échanges d'ions provenant de SIGMA Chemical Compagny.

Enzyme utilisée comme principal modèle pour les études mécanistiques (VLIEGENTHART J.F.G. et VELDINK G.A. et coll., 1982) (KUHN H; et coll., 1990) (SPARROW C.P. et coll., 1988) (CATHCART M.K. et coll., 1991)... En effet la 15-lipoxygénase-1 de soja est facilement disponible et obtenue sous forme lyophilisée ; toutes les autres lipoxygénases sont extrêmement labiles (SCHEWE T. et coll., 1987) ce qui rend leur purification plus difficile et plus coûteuse.

De plus elle présente de fortes analogies avec les lipoxygénases animales, humaines : globalement 40 % de séquence similaire à la 5-lipoxygénase humaine, 25 % de séquence identique avec la 12-lipoxygénase humaine .Surtout elle possède des portions peptidiques hautement similaires aux autres lipoxygénases, au centre de la protéine et vers la zone du COOH terminal, ces portions constantes sont supposées être le site de fixation du substrat, le site actif de liaison de l'atome de fer et donc le site de l'activité catalytique (SIGAL E., 1991).

L'ensemble de ces caractéristiques font de la 15-lipoxygénase de soja un bon modèle expérimental et simple à mettre en oeuvre pour étudier l'effet de différents composés sur l'activité lipoxygénasique. La lipoxygénase-1 de soja, sous forme lyophilisée, est conservée au congélateur (-18°C).

1.2. Le substrat

L'acide linoléique, substrat préférentiel des lipoxygénases végétales, est sous forme de solution éthanolique à $32.10^{-3}M$, et conservé à $-18^{\circ}C$ pour limiter son auto-oxydation.

L'acide linoléique est métabolisé par la lipoxygénase-1 de soja majoritairement en 13-HPOD. Le spectre d'absorption du 13-HPOD est caractérisé par une valeur maximale aux environs de 235 nm, alors que pour l'acide linoléique elle est proche de 210 nm.

1.3. Les produits testés

1.3.1. Molécules thérapeutiques à cycle imidazole

- **kétoconazole** : acétyl-1 [[[dichloro-2,4 phényl)-2 (imidazolyl-1 méthyl)-2 dioxolanne-1,3-yl-4] méthoxy]-4 phényl]-4 piperazine

Masse moléculaire = 531,43 g/mole

Laboratoire Janssen Lebrun

n° 2977

- **lévamisole (chlorhydrate)** : phényl-S(-)-6 tétrahydro-2,3,5,6-imidazothiazole [2,1-b] hydrochloride

Masse moléculaire = 224,22 g/mole

Laboratoire SPECIA

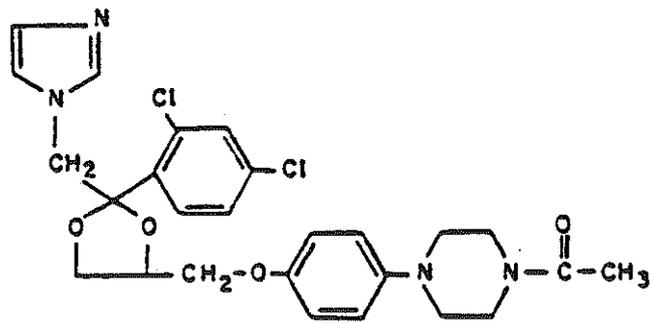
Lot 424 0913 82 260 00

- **métronidazole** : éthanol-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole

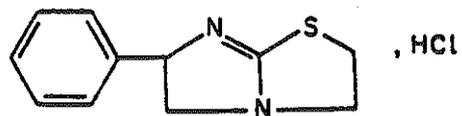
Masse moléculaire = 171,16 g/mole

Laboratoire Rhône Poulenc

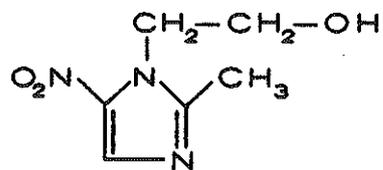
Lot 910 25 21



Kétoconazole



Lévamisole



Métronidazole

1.3.2. Molécules à visée molluscicide à cycle thiazole

Ce sont des produits, provenant de l'Unité CNRS N° 13878 (Dir. Prof. Demerseman) de l'Institut Curie, PARIS.

- **B.N.T.** : Benzamido-2 nitro-5 thiazole

Masse moléculaire = 249,25 g/mole

- Dérivés bromés

Br-2 BNT

Br-3 BNT

Masse moléculaire = 329,16 g/mole

Br-4 BNT

diBr-2,5 BNT

Masse moléculaire = 409,07 g/mole

- Dérivés chlorés

Cl-3 BNT

Masse moléculaire = 284,70 g/mole

diCl-2,5 BNT

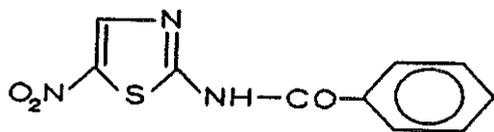
Masse moléculaire = 320,15 g/mole

- Dérivés fluorés

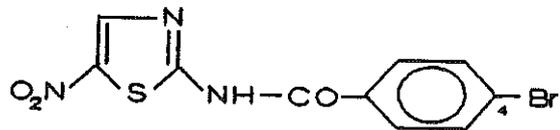
F-2 BNT

Masse moléculaire = 268,25 g/mole

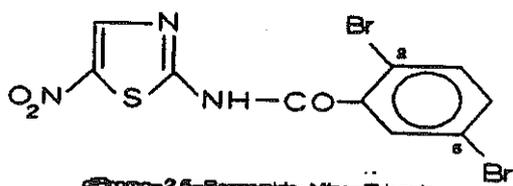
F-4 BNT



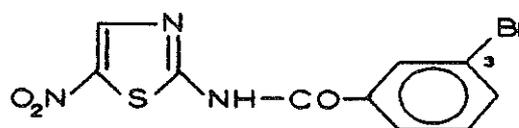
BENZAMIDO-NITRO-THIAZOLE



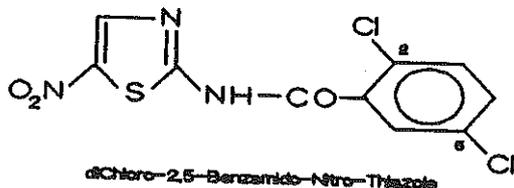
Bromo-4-Benzamido-Nitro-Thiazole



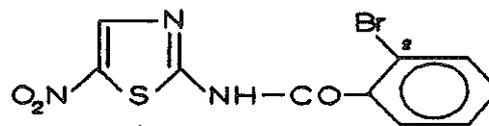
Bromo-2,5-Benzamido-Nitro-Thiazole



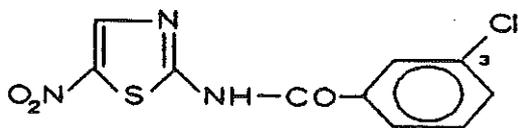
Bromo-3-Benzamido-Nitro-Thiazole



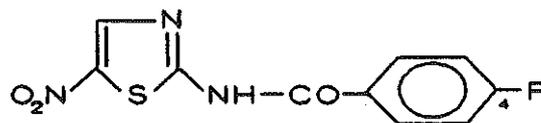
Dichloro-2,5-Benzamido-Nitro-Thiazole



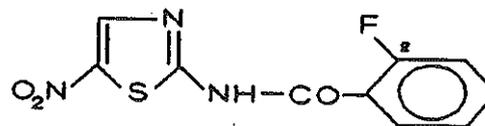
Bromo-2-Benzamido-Nitro-Thiazole



Chloro-3-Benzamido-Nitro-Thiazole



Fluoro-4-Benzamido-Nitro-Thiazole



Fluoro-2-Benzamido-Nitro-Thiazole

L'ensemble de ces produits doit être conservé au sec, à l'abri de la lumière pour éviter leur dégradation.

1.4. Tampon utilisé

Tampon phosphate ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) de pH=7. Le pH optimal de la lipoxygénase-1 de soja est aux environs de 9 mais on choisit de travailler à pH 7, c'est à dire à un pH proche du pH sanguin physiologique (7,35 à 7,45 à 37° C) car la majorité des lipoxygénases des mammifères est caractérisée par un pH optimal proche de pH 7 (SCHEWE T. et al., 1987).

La présence d'ions phosphates active la réaction (résultats non publiés) et évite l'apparition d'un temps de latence observé à pH 9 en tampon borate. Cela permet de calculer la vitesse initiale de la réaction.

1.5. Spectrophotomètre

Il s'agit d'un spectrophotomètre PERKIN-ELMER LAMBDA 5 U.V./Visible appareil à double faisceau (Figure 8) qui enregistre les absorbances (A) ou densités optiques (D.O.) :

- soit en fonction SCAN : le spectromètre balaye par cycle une plage de longueur d'onde, dans notre expérimentation de 190 nm à 290 nm .

- soit en fonction TIME-DRIVE : le spectromètre enregistre par cycle la densité à une longueur d'onde donnée, ici à 235 nm (pic d'absorption du 13-HPOD).

La spectrométrie d'absorption est basée sur le principe de proportionnalité entre l'intensité lumineuse absorbée par une solution et la concentration de cette solution en substance absorbante. Ce principe est exprimé par la loi de BEER LAMBERT

$$\text{D.O.} = \log I_0/I_t = \epsilon.l.c.$$

I_0 est l'intensité du faisceau lumineux à l'entrée de la solution

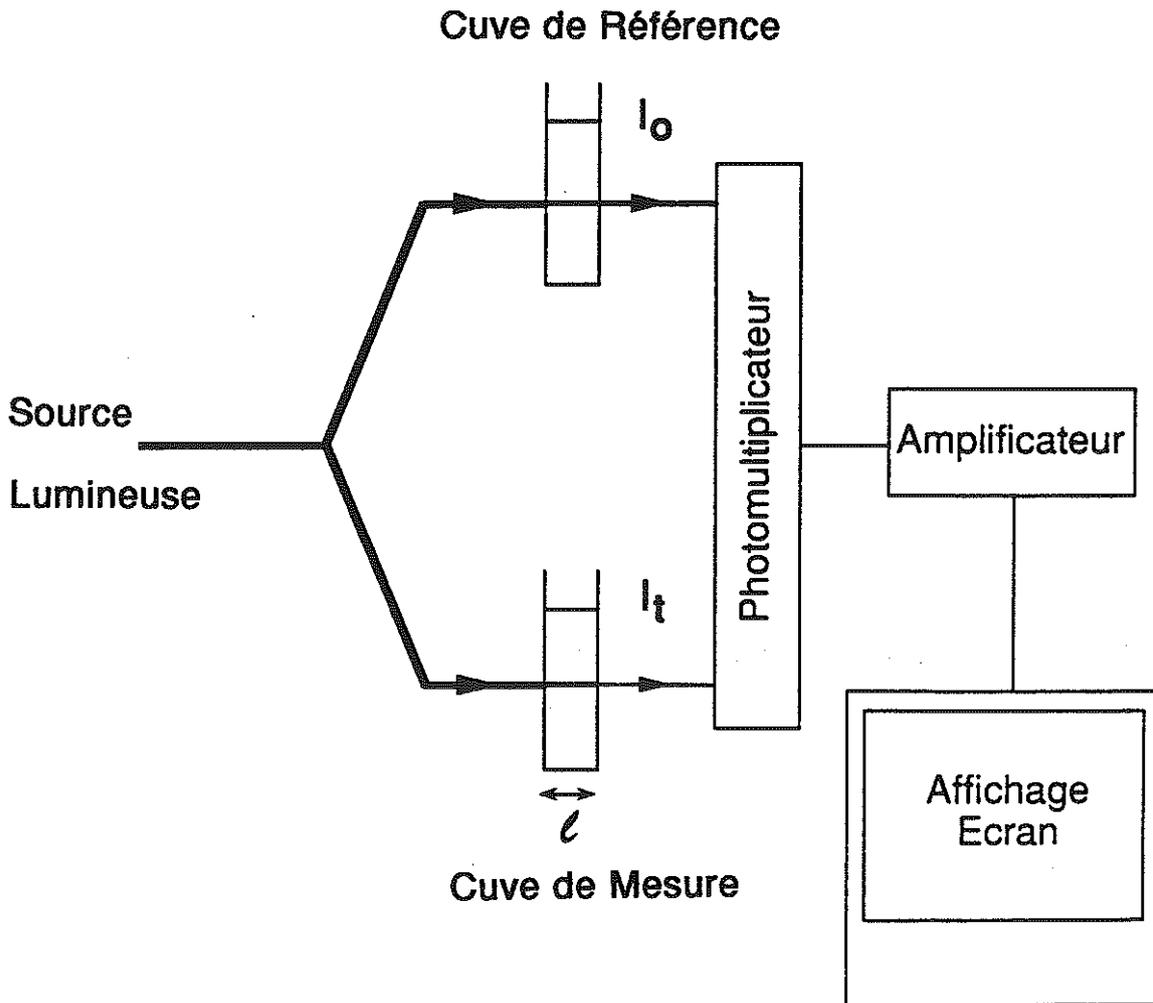


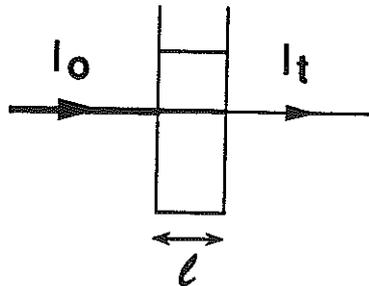
Fig. - 8 Principe du spectrophotomètre à double faisceau

It est l'intensité du faisceau en sortie : intensité transmise

c est la concentration du corps absorbant

l est l'épaisseur totale traversée

ϵ est le coefficient de proportionnalité appelé coefficient d'absorption molaire ou coefficient d'extinction spécifique, il dépend de la nature du corps absorbant, de la longueur d'onde, de la température.



Pour que la loi de Beer Lambert soit respectée on a choisit de réaliser les expérimentations de façons telles que les densités optiques soient toujours inférieures à 1, alors il y a proportion linéaire entre densité optique et concentration en substance absorbante. Le spectrophotomètre est réglé sur une vitesse de lecture de 480 nm/minute et 0,05 minute entre deux cycles.

II - METHODES

2.1. Réalisation du témoin

On réalise un témoin de l'activité lipoxygénasique sans inhibiteur pour chaque produit testé.

2.1.1. Composition

Le témoin est préparé extemporanément à partir de solutions placées dans de la glace avec

- l'enzyme : 30 μl d'une solution aqueuse à 1 mg/ml de lipoxygénase-1 de soja
- le substrat : 10 μl d'une solution éthanolique à 16.10^{-3} M d'acide linoléique
- le solvant : 50 μl d'éthanol pur (solvant des différents produits testés) sauf pour le lévamisole qui sera dissout dans la solution tampon, on ajoute alors 50 μl de tampon phosphate à la place de l'éthanol.
- le tampon : 2910 μl de solution tampon phosphate

Ainsi pour un volume total de 3000 μl de solution témoin il y a $10 \mu\text{l} + 50 \mu\text{l} = 60 \mu\text{l}$ d'éthanol c'est à dire 2 % (dans le cadre du lévamisole ce pourcentage est de 0,33 %), la concentration en éthanol influençant l'activité de la lipoxygénase-1 de soja. En effet au cours de la mise au point de la réaction témoin, il est apparu que l'augmentation de la concentration éthanolique du milieu (utile pour dissoudre de plus grande quantité d'inhibiteurs en particulier le BNT et ses dérivés) entraîne du fait de l'éthanol lui-même (présence de groupement hydroxyle, propriétés anti-oxydantes) une inhibition de l'enzyme. Par contre lorsque la teneur de la solution en éthanol est inférieur ou égale à 2 % l'effet inhibiteur de l'éthanol est négligeable, ceci est confirmé par (SCHEWE T. et coll., 1987) qui précisent que la concentration du solvant alcoolique ne doit pas excéder 2 % du volume de la solution.

2.1.2. Mesure spectrophotométrique de l'activité témoin

a) *En mode SCAN*

Ceci correspond à la mesure des D.O. sur une plage de longueur d'onde allant de 190 à 290 nm par cycles pendant 15 cycles, avec dans la cuve de référence la solution témoin sans le substrat, et dans la cuve de mesure la solution témoin entière.

Le spectre d'absorption (Figure 9) est caractérisé par un premier pic vers 210 nm signant la présence d'acide linoléique non auto-oxydé qui disparaît au fur et à mesure que se développe un second pic vers 235 nm correspondant à la formation de 13-HPOD (absorption caractéristique

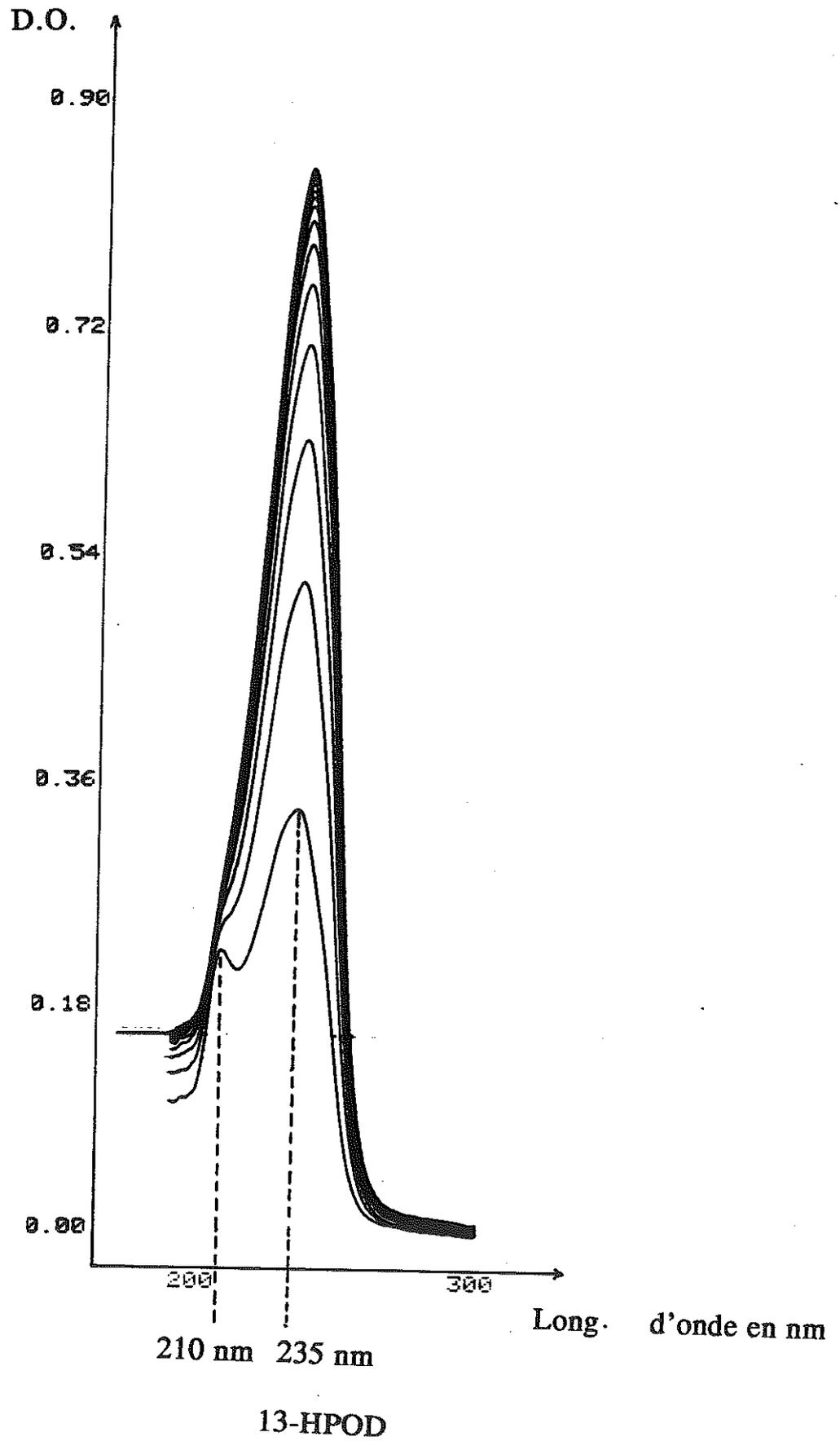


Fig. - 9 Enregistrement spectrophotométrique de la réaction témoin en mode SCAN

des doubles liaisons d'hydroperoxyde d'acide gras). Ces mesures permettent de vérifier que l'activité lipoxygénasique est correcte sur le plan qualitatif

b) En mode TIME-DRIVE

On réalise la mesure de l'augmentation des D.O. à 235 nm (valeur maximale du spectre d'absorption du 13-HPOD) pendant 70 cycles (90 cycles pour le kétoconazole) permettant de mieux étudier la cinétique enzymatique lipoxygénasique. La courbe obtenue (Figure 10) nous permet de mesurer l'activité lipoxygénasique :

- soit par sa vitesse initiale qui est la vitesse maximale de la réaction enzymatique et peut être assimilée à une fonction linéaire approchée par la droite de régression ; la vitesse initiale correspond alors à la pente de la droite de régression pour les mesures de D.O. des cinq premiers cycles.

- soit par la concentration finale en produit formé qui correspond au plateau de la courbe où la réaction lipoxygénasique est terminée : il ne se forme plus d'hydroperoxyde. Par application de la loi de Beer Lambert, la D.O. maximale permet de calculer cette concentration en produit formé.

On choisira de caractériser la cinétique lipoxygénasique en présence des molécules testées par la D.O. maximale obtenue, car dans plusieurs cas la vitesse initiale de la réaction en présence d'inhibiteur, paradoxalement, est supérieure à celle du témoin alors qu'en finale la formation de produit est bien inférieure ; ou bien la vitesse initiale en présence d'inhibiteur est trop proche du témoin pour les comparer alors que la différence de D.O. maximales est encore mesurable.

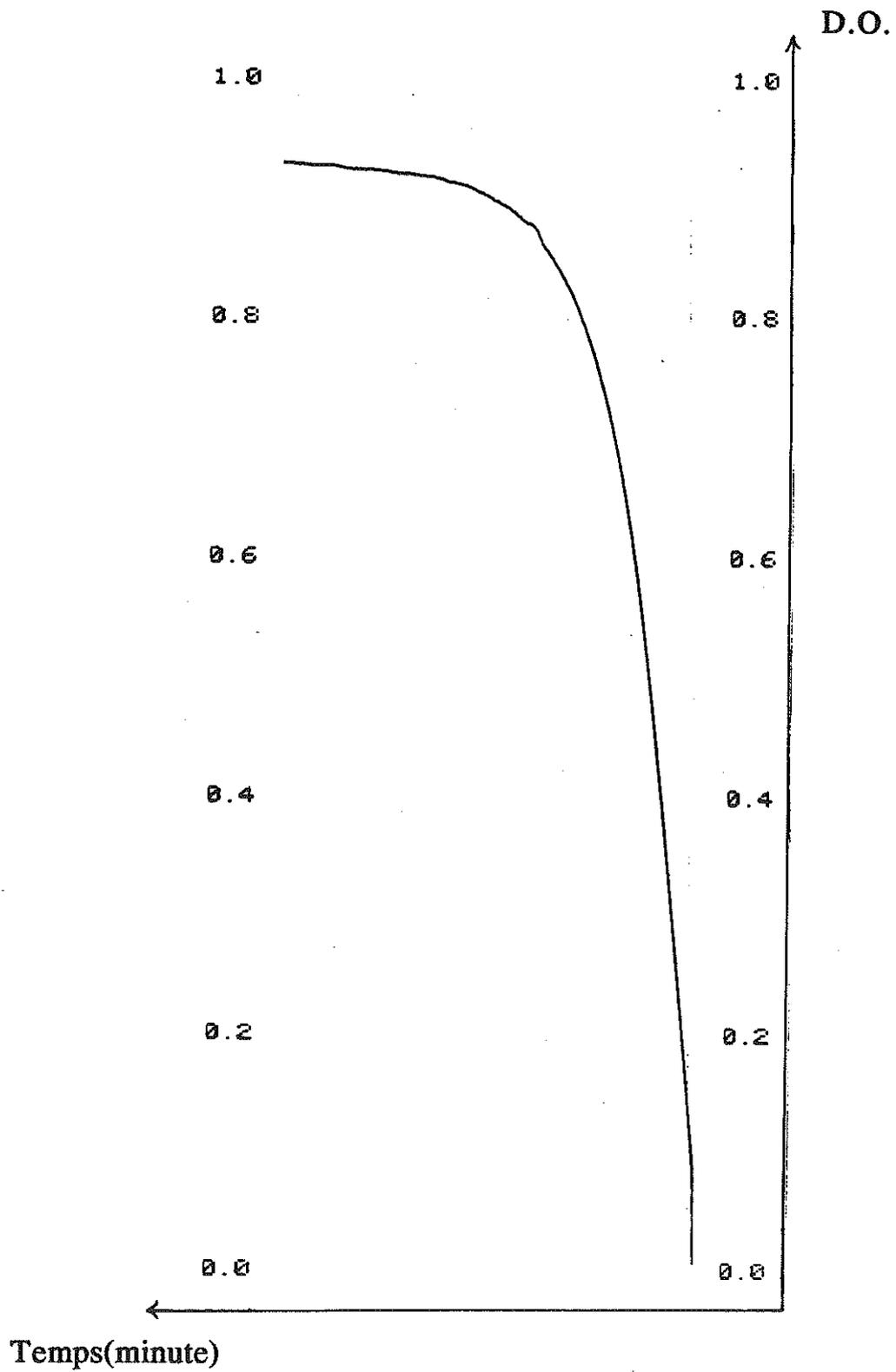


Fig. 10 - Enregistrement spectrophotométrique
du témoin mode TIME-DRIVE

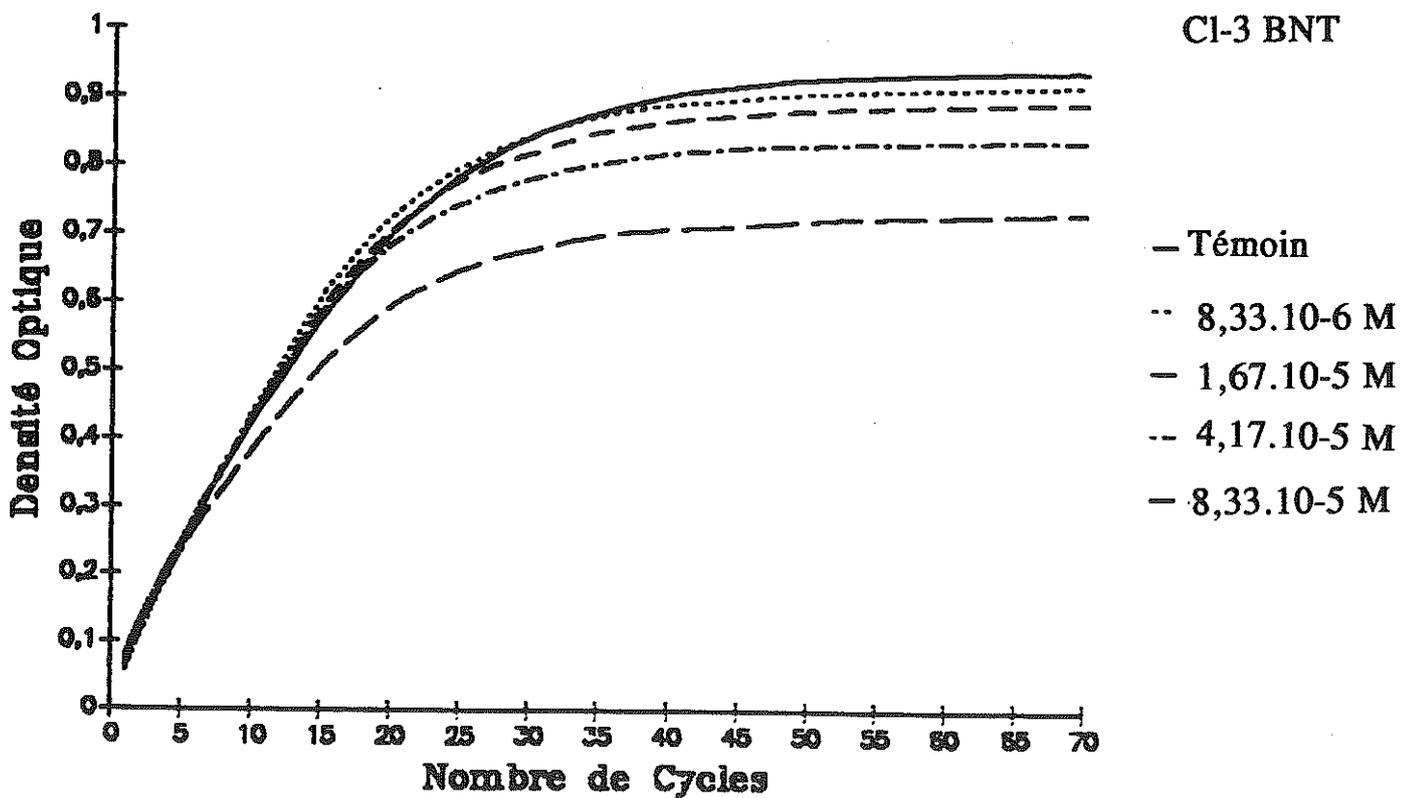
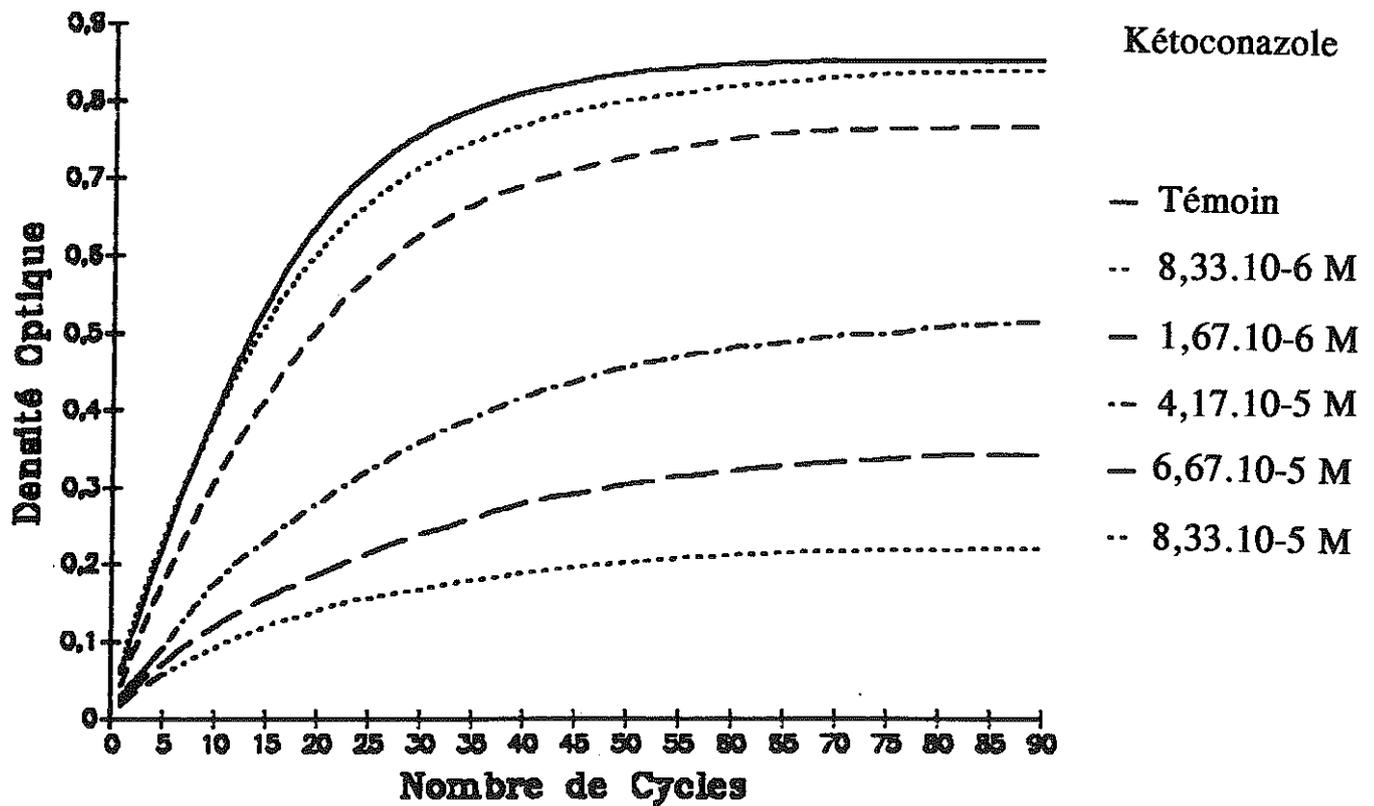


Fig. - 11 Exemple de courbes d'inhibition en mode TIME-DRIVE

2.2. Etude de l'action des différents produits

2.2.1. Préparation de gammes de dilution

L'étendue de la gamme est fonction de la solubilité du produit (tous dissouts dans l'éthanol pur sauf le lévamisole qui est dissout dans la solution tampon) et de l'activité du produit sur la lipoxygénase (lorsque l'inhibition est presque nulle, on ne réalise pas de dilution supérieure). Ainsi la gamme de dilution varie d'un produit à l'autre ; le BNT et ses dérivés particulièrement peu solubles, nécessitent pour accélérer leur dissolution l'emploi d'un agitateur à ultra-sons.

2.2.2. Mesures spectrophotométriques

La cuve de référence diffère de celle du témoin par le fait que les 50 μ l de solvant sont remplacés par 50 μ l d'une solution de la gamme de dilution d'un produit.

La cuve de mesure contient en plus 10 μ l de substrat par rapport à la cuve de référence.

En mode SCAN on vérifie que la réaction lipoxygénasique a lieu et que l'hydroperoxyde absorbe vers 235 nm, même en présence d'inhibiteur, en mode TIME-DRIVING on enregistre les D.O. pour exprimer la vitesse initiale ou bien la concentration finale en produit formé par la réaction lipoxygénasique en présence d'inhibiteurs, pour des raisons pratiques la dernière méthode est préférée. Les mesures sont réalisées après 5 minutes d'incubation du produit avec l'enzyme dans les cuves de mesure.

La dilution de la solution mère d'inhibiteur dans la cuve du spectromètre est de 1/60 ème.

2.3. Mesure de l'activité inhibitrice

On compare pour chaque produit testé à une dilution donnée (P_{xi}), la concentration finale en hydroperoxyde formée (correspondant à la D.O. maximale) par rapport à celle du témoin dont on pose que l'activité est maximale donc que la D.O. correspond à 100 % d'activité.

$$\text{Pourcentage d'inhibition de } P_{xi} = \left(1 - \frac{\text{D.O. max } (P_{xi})}{\text{D.O. max (témoin)}}\right) \times 100$$

III - RESULTATS

Pour chaque produit testé à une dilution donnée, comme pour le témoin, on réalise trois essais les valeurs données sont donc des moyennes et les écarts-types obtenus sont faibles :

3.1. Les molécules thérapeutiques

3.1.1. Kétoconazole

KETOCONAZOLE

Concentration dans la cuve	D.O. maximale (90 cycles)	% d'inhibition
Témoin	0,790	0%
$8,33 \cdot 10^{-5}$ M	0,203	74,3%
$6,67 \cdot 10^{-5}$ M	0,321	59,3%
$4,17 \cdot 10^{-5}$ M	0,486	38,5%
$1,67 \cdot 10^{-5}$ M	0,721	8,7%
$8,33 \cdot 10^{-6}$ M	0,771	2,4%

On ne peut tester des concentrations en kétoconazole supérieures à $8,33 \cdot 10^{-5}$ M, celui-ci précipitant dans la cuve.

A partir de la courbe tracée des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration en kétoconazole on peut déterminer graphiquement l'IC₅₀ qui est la concentration en effecteur pour laquelle l'activité enzymatique est inhibée à 50 %. L'IC₅₀ caractérise la force de la substance inhibitrice, plus l'inhibition est puissante plus l'IC₅₀ est faible, l'IC₅₀ du kétoconazole est de $5,5 \cdot 10^{-5}$ M.

On notera que l'inhibition exercée par le kétoconazole est maximale pour une concentration de $8,33 \cdot 10^{-5}$ M, alors qu'elle a presque disparue pour une solution 10 fois moins concentrée. Ainsi de faibles variations de concentrations en kétoconazole vont entraîner de grandes variations d'inhibition.

3.1.2. Métronidazole

METRONIDAZOLE

Concentration dans la cuve	D.O. maximale (70 cycles)	% d'inhibition
Témoin	0,884	0%
$3,33 \cdot 10^{-4}$ M	0,609	31,1%
$1,67 \cdot 10^{-4}$ M	0,755	14,6%
$8,33 \cdot 10^{-5}$ M	0,833	5,8%
$4,17 \cdot 10^{-5}$ M	0,860	2,7%

Le métronidazole est un faible inhibiteur de la lipoxygénase, de plus on ne peut mesurer l'inhibition du métronidazole à une concentration supérieure dans la cuve à $3,33 \cdot 10^{-4}$ M, ce qui

correspond à une solution de la gamme de dilution 60 fois plus concentrée c'est à dire $2 \cdot 10^{-2}$ M ; à une concentration plus élevée que $2 \cdot 10^{-2}$ M le métronidazole n'est plus soluble dans l'éthanol. (en extrapolant la courbe d'inhibition du métronidazole vers des concentrations plus élevées on pourrait calculer une IC₅₀ de $6 \cdot 10^{-4}$ M).

3.1.3. Lévamisole

LEVAMISOLE

Concentration dans la cuve	D.O. maximale (70 cycles)	% d'inhibition
Témoin	0,818	0%
$3,33 \cdot 10^{-4}$ M	0,357	56,4%
$2,50 \cdot 10^{-4}$ M	0,460	43,8%
$1,67 \cdot 10^{-4}$ M	0,560	31,5%
$8,33 \cdot 10^{-5}$ M	0,641	21,6%
$4,17 \cdot 10^{-5}$ M	0,709	13,3%
$3,33 \cdot 10^{-6}$ M	0,806	1,5%

L'IC₅₀ calculée par méthode graphique pour le lévamisole est de $3 \cdot 10^{-4}$ M. Le lévamisole inhibe donc moins la lipoxygénase de soja que le kétoconazole l'IC₅₀ étant plus élevée. Cette inhibition est plus progressive que dans la cas du kétoconazole.

3.2. BNT et dérivés

Ces composés sont peu solubles, leur étude n'a pu être faite que sur une plage de concentrations très limitée.

3.2.1. BNT

B.N.T.

Concentration dans la cuve	D.O. maximale (70 cycles)
Témoin	0,902
8,33.10 ⁻⁵ M	0,765
4,17.10 ⁻⁵ M	0,811
1,67.10 ⁻⁵ M	0,870

3.2.2. Dérivés bromés

Concentrations dans la cuve	D.O. maximales			
	Br-4 BNT	Br-3 BNT	Br-2 BNT	diBr-2,5 BNT
Témoin	0,824	0,824	0,913	0,887
8,33.10 ⁻⁵ M	0,730	0,667	0,748	0,553
4,17.10 ⁻⁵ M	0,799	0,793	0,767	0,692
1,67.10 ⁻⁵ M	0,814	0,810	0,802	0,793
8,33.10 ⁻⁶ M	-	-	0,846	0,826
4,17.10 ⁻⁶ M	-	-	0,868	0,837

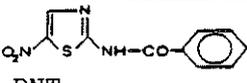
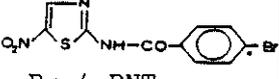
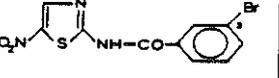
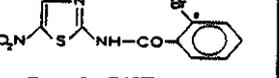
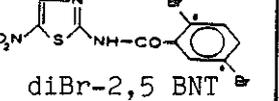
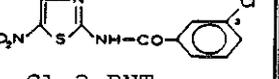
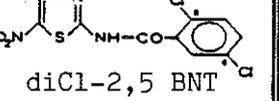
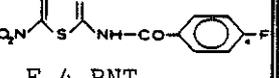
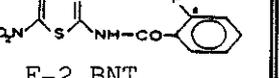
3.2.3. Dérivés chlorés

Concentrations dans la cuve	D.O. maximales	
	Cl-3 BNT	diCl-2,5 BNT
Témoin	0,859	0,839
8,33.10 ⁻⁵ M	0,666	0,665
4,17.10 ⁻⁵ M	0,771	0,784
1,67.10 ⁻⁵ M	0,828	0,817

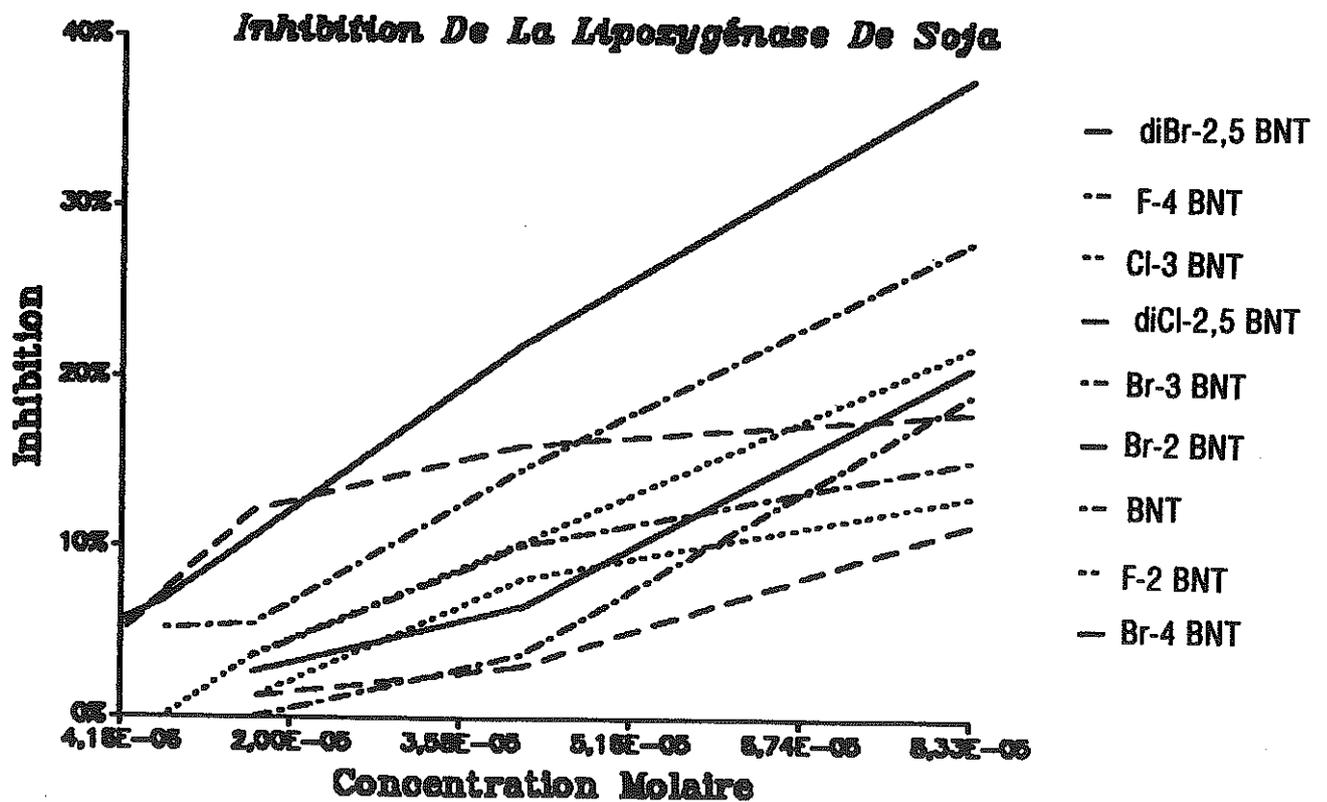
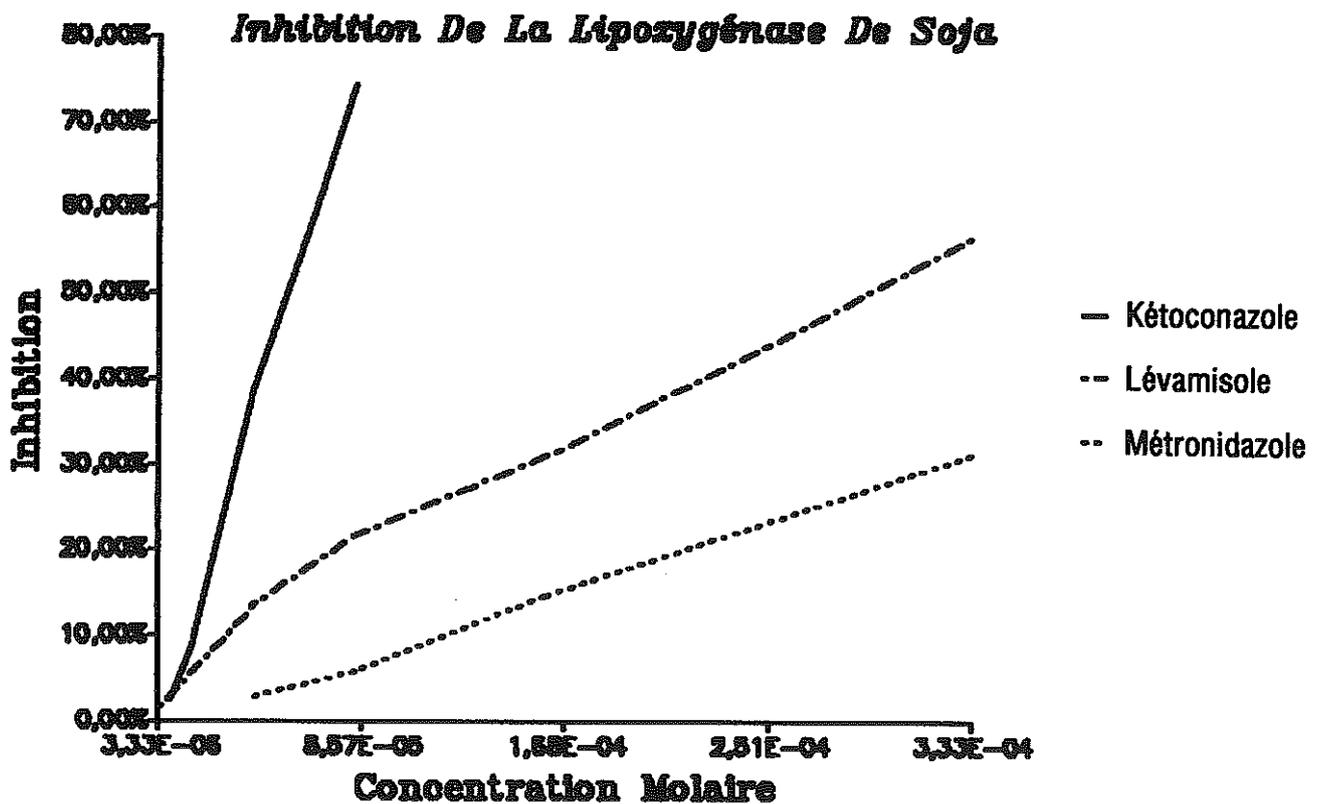
3.2.4. Dérivés fluorés

Concentrations dans la cuve	D.O. maximales	
	F-4 BNT	F-2 BNT
Témoin	0,926	0,917
8,33.10 ⁻⁵ M	0,666	0,797
4,17.10 ⁻⁵ M	0,782	0,842
1,67.10 ⁻⁵ M	0,875	0,906
8,33.10 ⁻⁶ M	0,877	-

3.2.5. Pourcentages d'inhibition de l'enzyme.

	8,33.10 ⁻⁵ M	4,17.10 ⁻⁵ M	1,67.10 ⁻⁵ M	8,33.10 ⁻⁶ M	4,17.10 ⁻⁶ M
 BNT	15,2%	10,1%	3,5%	-	-
 Br-4 BNT	11,4%	3,0%	1,2%	-	-
 Br-3 BNT	19,0%	3,8%	1,7%	-	-
 Br-2 BNT	18,1%	16,0%	12,2%	7,3%	4,9%
 diBr-2,5 BNT	37,7%	22,0%	10,6%	6,9%	5,6%
 Cl-3 BNT	22,5%	10,2%	3,6%	-	-
 diCl-2,5 BNT	20,7%	6,5%	2,6%	-	-
 F-4 BNT	28,1%	15,5%	5,5%	5,3%	-
 F-2 BNT	13,1%	8,2%	1,2%	-	-

Le BNT et ses dérivés n'affectent pas assez l'enzyme dans cette gamme de concentrations pour permettre de calculer des IC₅₀



TROISIEME PARTIE
DISCUSSION

La validité de la lipoxygénase-1 de soja comme modèle expérimental n'étant pas contestable, comme nous l'avons vu précédemment, l'étude réalisée peut être extrapolée aux lipoxygénases animales, ceci d'autant plus que certains résultats sont en accord avec des études publiées sur les lipoxygénases animales.

I - INTERET DES MOLECULES MEDICAMENTEUSE EN FONCTION DE LEUR ACTIVITE SUR LES LIPOXYGENASES

1.1. Le kétoconazole

Il appartient au groupe des antifongiques imidazolés et est le premier à pouvoir être résorbé par voie orale (le fluconazole et l'itraconazole ont été commercialisés par la suite).

Il est caractérisé chimiquement par un noyau dioxolane et un noyau pipérazine.

1.1.1. Spécialités (VIDAL 92)

Usage local	: KETODERM ^R	2% crème ---> mycoses superficielles
		2 % sachet de gel moussant ---> dermite séborrhéique
		2 % monodose ---> pityriasis versicolor
Per os :	NIZORAL ^R	comprimés
		suspension buvable

1.1.2. Caractéristiques pharmacologiques

a) Mode d'action

Comme les autres imidazolés, il altère la membrane fongique en inhibant la synthèse de l'ergostérol, principal stérol membranaire ; il y a accumulation des précurseurs de la chaîne de synthèse : lanostérol et divers 14-méthylstérols. Cette action semble due à l'interaction du kétoconazole avec le cytochrome P₄₅₀ des mitochondries fongiques avec blocage de la déméthylation en C₁₄.

D'autres modes d'action ont été proposés : le kétoconazole provoquerait des lésions directes par fixation sur la membrane avec perte de potassium intracellulaire, accumulation de peroxyde toxique, résultat de l'interaction sur les enzymes oxydatives (inhibition de la cytochrome C peroxydase et la catalase). De plus, le kétoconazole peut altérer la séparation des bourgeons de la levure mère et exerce une inhibition de la filamentation démontrée notamment pour *Candida albicans* ; la forme filamenteuse est la forme invasive issue des levures et représente un obstacle mécanique à la phagocytose.

Aux doses thérapeutiques, le kétoconazole est fongiostatique.

b) Spectre antifongique

* En tant que topique

Le kétoconazole agit sur les agents classiques des mycoses superficielles : *Candida sp.*, dermatophytes : *Trichophyton* et *Microsporum* (parfois peu sensibles), *Epidermophyton*, *Malassezia* ou *Pityrosporum furfur* agent du pityriasis versicolor.

Geotricum candidum, *Scopulariopsis brevicaulis* sont inconstamment sensibles.

Sous forme topique, de fortes concentrations sont appliquées et il présente une activité bactéricide sur les cocci gram négatif.

* Par voie orale

Il est actif sur les mycoses viscérales profondes ou systémiques dues aux champignons dimorphiques : *Histoplasma capsulatum* et *H. duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brassiliensis* et à un moindre degré *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis*.

Les agents de phycomycoses (basidiobolose et rhinoentomophthoromycose) y sont très sensibles, les agents de chromomycoses et de mycétomes sont plutôt résistants.

Le kétoconazole est peu actif sur le genre *Aspergillus* et Mucorale.

c) *Activité leishmanicide*

Activité due à l'inhibition de la synthèse d'ergostérol que les leishmanies possèdent en grande quantité.

d) *Pharmacocinétique*

Absorbé par voie orale à une dose de 200 mg chez l'adulte, le pic sérique est toujours au dessus de 1 $\mu\text{g/ml}$, la résorption du kétoconazole est soumise aux variations individuelles et est améliorée lors de prise au milieu de repas.

C'est une molécule fortement liée aux protéines plasmatiques (84 %) et qui est présente au niveau des erythrocytes (15 %).

Sa diffusion dans l'organisme est bonne à l'exception du compartiment rénal et méningé.

Son catabolisme est hépatique, son élimination essentiellement biliaire et fécale, très peu rénale.

1.1.3. Indications thérapeutiques, posologies

a)mycoses

Le kétoconazole présente un grand intérêt dans la thérapeutique des mycoses superficielles et profondes du fait de sa grande efficacité et sa bonne diffusion dans l'organisme. Il ne possède pas une grande toxicité et agit à concentrations fongistatiques sur les champignons pathogènes conjointement au système immunitaire de défense.

* dans les mycoses superficielles (dans les cas d'intolérance ou d'échec avec le traitement classique mais en fait de plus en plus en 1^{ère} intention)

- vaginites mycosiques rebelles récidivantes : candidose chronique et vaginite à *Torulopsis glabrata*

- muguets rebelles rencontrés chez les nouveaux-nés traités par les antibiotiques, ou chez les malades atteints du SIDA, ...

- candidoses cutanés : intertrigo,...

- onychomycose

- dermatophytoses : teigne, onyxis

- pityrosporoses : pityriasis versicolor, pityriasis capitis, dermatite seborrhéique.

* dans les mycose profondes ou systémiques

c'est l'antifongique :

- de choix dans la candidose mucocutanée chronique : forme sévère de candidose granulomateuse qui peut toucher le cuir chevelu, le visage, les mains, les ongles, envahir le tube digestif... Les troubles immunologiques dus à la présence de l'antigène candidosique avec l'augmentation du nombre d'eosinophiles disparaissent

- de choix dans les histoplasmoses, blastomycose, paracoccidioïdomycose, entomophthoromycoses.

- efficace contre les candidoses chez les héroïnomanes : syndrome signalé dès 1981 de candidose septicémique avec des lésions cutanées folliculaires précoces, des lésions oculaires profondes de rétinite et des lésions tardives ostéoarticulaires

- employé dans la prophylaxie digestive des candidoses chez l'immunodéprimé

- en association dans les septicémies et autres localisations viscérales profondes à candida avec d'autres anti-mycosiques.

b) Leishmaniose

En cas de leishmaniose cutanée, voir cutanéomuqueuse, lors de résistance aux traitements classiques.

c) Posologies-durée de traitement

* Formes locales

1 à 2 applications par jour généralement de 3 semaines jusqu'à 3 mois pour les mycoses les plus difficiles à traiter : onyxis, teigne.

sauf pour Kétoderm monodose ^R que l'on utilise en 1 seule application.

* Formes orales

à partir de 200 mg/j jusqu'à 800 mg/j en 2 prises chez l'adulte suivant la gravité de l'infection

4 à 7 mg/kg/j chez l'enfant en une prise

Ce sont des traitements de 4 à 8 semaines en générale, jusqu'à 6 mois, 1 an dans les mycoses profondes ou les leishmanioses avec atteinte muqueuse.

1.1.4. Interactions enzymatiques et conséquences

Le kétoconazole exerce une action inhibitrice sur les enzymes cytochromes dépendantes responsables de la synthèse d'ergostérol chez les champignons, ce qui lui confère son activité antifongique. Mais l'inhibition d'autres systèmes enzymatiques par le kétoconazole est à l'origine de nouvelles indications et d'essais cliniques.

Ainsi le kétoconazole est utilisé dans les états d'hydroperandrogénie et dans le traitement de l'adénome prostatique, du fait d'effets secondaires lors de son utilisation comme antifongique : les effets antiandrogéniques. Le kétoconazole entraîne une inhibition de la production de testostérone médiée par le cytochrome P₄₅₀ et une diminution de synthèse d'androgènes surrénaliens par inhibition de plusieurs enzymes adrénaliennes (NARDONE P.A. et coll., 1988) (ENGELHARDT D. et coll., 1991).

L'inhibition de la lipoxygénase par le kétoconazole est donc importante à deux niveaux : dans le cadre de son activité antimycosique et pour un développement possible de nouvelles indications. L'inhibition de la lipoxygénase-1 de soja par le kétoconazole ($IC_{50} = 5,5 \cdot 10^{-5}$ M) que nous avons démontrée est transposable aux enzymes animales. En effet l'étude de (BEETENS J.R. et coll., 1986) montre que le kétoconazole inhibe, *in vitro* ($IC_{50} = 2,6 \cdot 10^{-5}$ M) la formation de 5-HETE et de LTB₄ par la 5-lipoxygénase des polynucléaires péritonéaux chez le rat, mais est inactif sur la 12-lipoxygénase plaquettaire humaine et stimule l'activité 15-lipoxygénasique réticulocytaire chez le lapin (une inhibition de l'activité 5-lipoxygénasique est souvent corrélée à une stimulation de l'activité 15-lipoxygénasique). *In vivo* le kétoconazole après administration per os inhiberait la synthèse de leucotriènes diminuant de manière dose dépendante la bronchoconstriction anaphylactique médiée par les leucotriènes.

Il apparaît ainsi que lors d'un traitement anti-mycosique par voie locale ou orale, le kétoconazole permet de lutter contre l'agent parasite mais pourrait aussi par inhibition de la 5-

lipoxigénase diminuer le phénomène inflammatoire corollaire à la présence d'un agent pathogène. En inhibant la synthèse de leucotriènes (avec une IC_{50} exprimée en g/l égale à $13,8.10^{-3}$ g/l comparée à des concentrations sériques par voie orale de $1\mu\text{g/l}$) le traitement par le kétoconazole, en général long, pourrait avoir un effet bénéfique en diminuant l'extravasation plasmatique due aux leucotriènes : migration des cellules à travers la paroi vasculaire vers l'épiderme ou les tissus interstitiels à l'origine d'oedème, de possibles lésions tissulaires et de phénomènes douloureux.

D'autres indications pour le kétoconazole sont recherchées à travers l'inhibition de la biosynthèse des leucotriènes et donc une diminution de leurs effets. (NARDONE P.A. et coll., 1988) ont montré que le kétoconazole par inhibition de la 5-lipoxigénase (et de la thromboxane-synthétase) diminuait l'incidence de métastases de tumeurs hématologiques chez l'animal : les leucotriène altèrent la perméabilité vasculaire facilitant le processus métastatique et stimulent la libération de thromboxane dont le taux est augmenté dans certaines tumeurs. L'étude de nouvelles indications avec les molécules médicamenteuses déjà utilisées présentent l'avantage de la connaissance pour ces molécules des paramètres pharmacologiques et toxicologiques.

1.2. Le lévamisole

Le lévamisole est l'isomère lévogyre du tétramisole dont l'activité anthelminthique est connue, plus récemment des propriétés immunostimulantes lui ont été découvertes et de nombreux essais cliniques ont été réalisés.

Le lévamisole appartient au groupe des imidazothiazoles.

1.2.1. Spécialité

SOLASKIL[®] comprimés, est utilisé comme anti-parasitaire.

1.2.2. Caractéristiques pharmacologiques

a) mode d'action

* Comme anthelminthique

le lévamisole est un agoniste spécifique des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine des muscles du nématode *Caenorhabditis clegans* et peut être d'autres vers ronds (VAN WAUWE J. et JANSSEN P.A.J., 1991), le lévamisole stimule aussi les ganglions parasympathiques (MUTCH R.S. et HUSTON P.R., 1991) ; ceci entraîne des contractions spasmodiques neuromusculaires et une paralysie par dépolarisation. Enfin le lévamisole est un puissant inhibiteur du système fumarate réductase qui assure la réduction du fumarate en succinate. Principale source en ATP chez les vers, le système succinate-fumarate deshydrogénases remplace le système des cytochromes oxydases des mammifères (STEVENSON H.C. et coll., 1991). L'ensemble aboutit à la paralysie puis à la mort du nématode.

* Comme immunostimulant

(VAN WAUWE J. et JANSSEN P.A.J., 1991), (MUTCH R.S. et HUSTON P.R., 1991), (STEVENSON H.C. et coll., 1991)

Le mécanisme par lequel le lévamisole modifie le système immunitaire humain est complexe et non encore complètement expliqué. Le lévamisole est un agent restaurateur de l'immunité cellulaire essentiellement. Ainsi il agit :

- sur les lymphocytes T en stimulant leur maturation, leur production de lymphokines et d'interférons et en augmentant leur prolifération, leur cytotoxicité.

- sur les phagocytes en favorisant leur prolifération leur migration, l'adhérence vasculaire, le chimiotactisme, la capacité de phagocytose et de destruction intracellulaire, l'activité peroxydasique des monocytes, des macrophages et des neutrophiles.

- sur les lymphocytes B indirectement, l'augmentation de la production d'immunoglobulines n'étant due qu'à la stimulation des lymphocytes T par le lévamisole qui, eux-mêmes, modulent l'activité des lymphocytes B. (Lors d'un traitement au long court avec le lévamisole, il y a diminution de la production d'immunoglobulines).

Le lévamisole n'a aucune action sur les cellules NK ou les cellules K.

Le mode d'action biochimique du lévamisole est complexe :

- il induit la formation de substances immunostimulantes endogènes éléments sériques au nombre de trois, distingués par leur différente stabilité à la chaleur, leur formation thymus-dépendante.

- le lévamisole est une prodrogue : métabolisé, majoritairement dans de nombreuses espèces animales, par ouverture du cycle thiazolidine en O.M.P.I. (oxo-mercaptoéthyl-phényl imidazoline) qui serait responsable de la plupart des propriétés immunologiques rencontrées avec les leucocytes en contact avec le lévamisole.

- il est inhibiteur de l'action ou de la production de facteurs immunosuppresseurs endogènes. Parmi les substances libérées par les lymphocytes T suppresseurs activés, il en est une qui est soluble et à effet suppresseur sur la réponse immune : on parle de SIRS. La SIRS. est une pro-lymphokine inactive qui n'exerce son effet suppresseur qu'après avoir été convertie en sa forme oxydée : SIRSox. Le lévamisole bloque l'oxydation de la SIRS.

- le lévamisole possède des propriétés cholinergiques (responsables en partie de son activité anthelminthique) dues au cycle imidazole. L'effet cholinergique du lévamisole augmente le taux de GMPc intracellulaire (Guanosine Mono Phosphate cyclique) et il en est de même dans les cellules lymphocytaires et phagocytaires exposées au lévamisole. L'augmentation de GMPc est associée à une stimulation de la prolifération cellulaire, du chimiotactisme, de l'expression de récepteur et d'antigène à la surface cellulaire, et de l'activité des macrophages. Cette augmentation du taux de GMPc est associée à une diminution du taux d'AMPc qui agit sans le même sens sur les lymphocytes et phagocytes.

b) Pharmacocinétique

Le lévamisole est rapidement résorbé par le tractus gastro-intestinal : une dose orale unique de 150 mg entraîne un pic plasmatique à 0,7 µg/ml en 1 à 2 heures.

Il se distribue dans tous les tissus fluides de l'organisme et majoritairement dans le foie et le rein, organes de son catabolisme. L'excrétion du lévamisole est rénale et fécale.

1.2.3. Indications thérapeutiques -posologies

a) Comme anthelminthique

Le lévamisole est un excellent anti-ascaridien. L'efficacité du lévamisole dans l'ankylostomose est non négligeable d'autant plus que les deux verminoses, ankylostomose et ascaridiose sont fréquemment associés. Sa bonne tolérance en fait un médicament de choix dans un traitement de masse (se méfier des leucopénies immunologiques dues au lévamisole).

La posologie :

- pour l'ascaridiose est généralement d'une prise unique après un repas de 150 mg chez l'adulte et de 3 mg/kg chez l'enfant.

- dans l'ankylostomose (ou en cas d'infection mixte) les doses sont doublées et à prendre pendant deux jours consécutifs.

Une deuxième cure identique est nécessaire s'il y a persistance d'oeufs de parasite dans les selles.

b) Comme immunostimulant

Le lévamisole est utilisé pour restaurer la réponse immunitaire diminuée (augmentant l'activité des macrophages et l'immunité retardée...) dans des pathologies, thérapies

immunosuppressives et des désordres allergiques. Ainsi des évaluations cliniques ont été faites avec le lévamisole dans les cas d'asthme, de dermatite atopique ; d'atteintes infectieuses chroniques ou récurrentes ; de maladies inflammatoires chroniques : atteinte rhumatismale, lupus érythémateux disséminé, maladie de Crohn, colite ulcéreuse, atteintes dermatologiques... L'activité du lévamisole étant souvent inconstante mais significative.

De plus, le lévamisole trouve des indications en cancérologie par ses propriétés anti-métastatiques, en association avec les thérapies antinéoplasiques conventionnelles (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie). Sans en connaître totalement l'influence, ce sont les effets immunostimulants du lévamisole qui seraient responsables de son efficacité dans les phénomènes néoplasiques (souvent l'activité immunologique diminue lors de cancers ou de traitements de ce cancer : radiothérapie, chimiothérapie). Depuis 1990, le F.D.A. (Foods and Drugs Administration) a donné son approbation pour l'emploi d'une association de 5-fluoruracil et de lévamisole dans le carcinome du colon stade III, comme thérapie adjuvante.

Posologies les plus souvent rencontrées : 150 mg (ou 2,5 mg/kg) 2 jours par semaine ou bien 3 fois par semaine.

1.2.4. Conséquences de l'interaction lévamisole-lipoxygénase

Comme nous l'avons démontré, le lévamisole est un inhibiteur de la 15-lipoxygénase-1 de soja, action inhibitrice plus faible que le kétoconazole.

Cette action inhibitrice a aussi été retrouvée, *in vivo*, sur la 15-lipoxygénase animale des macrophages péritonéaux du rat (BENEYTOU J.L. et al., 1988).

L'effet immunostimulant du lévamisole pourrait être expliqué en partie par l'inhibition de la 15-lipoxygénase. En effet la conséquence directe de l'effet inhibiteur de lévamisole est une diminution de la synthèse de 15-HPETE et 15-HETE et donc une réduction de l'effet immunosuppresseur (voir les propriétés des produits de la 15-lipoxygénase) de ces métabolites. Au niveau biochimique l'oxydation de la SIRS en SIRSox active est réalisée lors de l'incubation avec le peroxyde d'hydrogène, le 15-HPETE, et avec des macrophages (VAN WAUWE J. et

JANSSEN P.A.J.). Le blocage de l'oxydation de la SIRS par le lévamisole serait dû à l'inhibition de la 15-lipoxygénase.

De plus l'inhibition et l'activation de la 15-lipoxygénase et de la 5-lipoxygénase sont étroitement liées, le 15-HPETE inhibant l'activité de la 5-lipoxygénase. Indirectement le lévamisole par inhibition de la 15-lipoxygénase stimule la 5-lipoxygénase et la biosynthèse des leucotriènes. Ceci est en accord avec les effets du lévamisole sur les lymphocytes et les phagocytes qui miment l'action du LTB₄ sur ces mêmes cellules. Enfin, l'augmentation du taux intracellulaire de GMPc résultant des propriétés cholinergiques du lévamisole pourrait être due à l'augmentation de synthèse de 5-HETE qui stimule la guanylate cyclase lymphocytaire (COFFEY R.G. et HADDEN J.N., 1985). De même l'augmentation de la synthèse de LTB₄ pourrait stimuler la formation de GMPc, les récepteurs au LTB₄ étant liée à une protéine G régulée par le GMP.

Il apparait donc que les inhibiteurs de la 15-lipoxygénase pourrait ouvrir une nouvelle voie dans la compréhension des processus immunologiques et le développement d'immunostimulant.

1.3 Métronidazole

Utilisé en premier pour son action antiparasitaire dans les infections à Trichomonas en particulier, ses propriétés antibiotiques vis à vis des bactéries anaérobies ne furent découvertes que 10 ans plus tard et il devient un des produits la plus utilisé en antibiothérapie.

Le métronidazole appartient à la classe des 5-nitro-imidazoles.

1.3.1. Spécialités

FLAGYL[®] comprimés, ovules, suspension buvable, forme injectable

METRONIDAZOLE FANDRE[®] forme injectable

ROZEX^R gel dermique indiqué dans la rosacée (forme populopustaleuse de l'adulte)

en association avec la spiramycine :

RODOGYL^R comprimés.

1.3.2. Caractères pharmacologiques

a) Mode d'action

Le métromidazole pénètre dans les cellules par diffusion passive. Son activation, dans les organismes anaérobies sous l'action de la pyruvate ferridoxine oxydoréductase correspond à la réduction du groupement nitré NO_2 par la captation d'électrons aux dépens du système des protéines transporteuses d'électrons (du type ferridoxine ou flavodoxine) au faible potentiel redox. Cette réduction a deux conséquences d'une part la forme libre de l'antibiotique intracellulaire décroît, donc le gradient de concentration transmembranaire en métronidazole augmente et il en pénètre encore plus dans la cellule ; d'autre part il se forme des produits cytotoxiques : radicaux libres nitrés et nitroso, dérivés hydroxylamines et nitroso. Des métabolisations supplémentaires conduisent à la décomposition du reste de la molécule en molécules plus petites et inactives.

La cytotoxicité des radicaux libres ou des dérivés formés par réduction du groupement NO_2 serait due surtout à la fixation sur l'ADN et aux dommages qu'ils provoquent, ils pourraient ainsi attaquer d'autres cibles comme certaines protéines enzymatiques, l'ARN messenger, ils sont responsables de la mort de la cellule (SCULLY B.E., 1988) (GALLUSSER A., 1988).

b) Spectre d'activité

* comme antiparasitaire

Le métronidazole est actif sur les protozoaires anaérobies : *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* et *Balantidium coli*.

* comme antibactérien

Le métronidazole a une activité bactéricide sur la majorité des bactéries anaérobies.

- Il est actif sur les cocci gram positif anaérobies t.q. *Clostridium perfringens*, *C. difficile* alors que son action est limitée sur les pepto-streptococci, pepto-cocci, Actinomyces, bifidobactéries

- hautement bactéricides sur les bactéries gram négatif anaérobie : *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides sp.*

- Enfin certains spirochètes dont *Treponema pallidum* sont sensibles au métronidazole.

* Remarques

- l'association du métronidazole à d'autres antibiotiques a surtout été étudiée vis à vis de *B. fragilis*. Dans le but d'une plus grande efficacité sur des bactéries moyennement sensibles, on peut associer le métronidazole avec la benzylpénicilline, un macrolide (RODOGYL^R) ou un lincosamide.

- la résistance au métronidazole peut être naturelle et liée à une mauvaise pénétration de l'antibiotique et ou à l'absence de pyruvate ferrioxine oxydoréductase chez des bactéries microaérophiles comme *Propionibacterium acnes*, Streptocoques, Actinomyces ; le développement de résistance acquise étant exceptionnel.

b) Pharmacocinétique

* résorption

Le métronidazole est bien résorbé après une administration orale, les taux sériques atteints sont équivalents à ceux obtenus avec la même dose par voie intraveineuse. Après une dose standard de 7,5 mg/kg le pic sérique est de l'ordre de 20 à 25 $\mu\text{g/ml}$.

* diffusion

Le métronidazole se distribue bien dans les différents compartiments de l'organisme humain : système nerveux central, tissu osseux, salive, bile, liquide séminal, trompes de Fallope, myomètre, tissu mou, ... Il traverse la barrière placentaire, se retrouve dans le lait maternel.

Le métronidazole se lie peu aux protéines plasmatiques.

* métabolisation

Les deux chaînes latérales du métronidazole peuvent être métabolisées probablement dans le foie donnant des dérivés "alcool" et "acide" actifs.

* élimination

L'excrétion est principalement urinaire.

1.3.3. Indications et posologies

a) Comme antibactérien

Les bactéries anaérobies peuvent créer des infections sévères de presque tous les tissus, essentiellement au niveau du tube digestif, des voies génitales féminines et des voies respiratoires. Le métronidazole est alors un antibiotique de premier choix en raison de sa rapide et constante activité sur *B. fragilis* bactérie anaérobie la plus souvent pathogène actuellement. Mais les infections anaérobies étant en règle générale mixtes, on utilisera plutôt des associations antibiotiques avec le métronidazole ; la caractéristique de ces infections étant la nécrose tissulaire avec souvent formation d'abcès, un acte chirurgical thérapeutique est souvent nécessaire.

Ainsi la métronidazole est utilisé, du fait de sa bonne diffusion, dans les infections gynécologiques, osseuses, articulaires, des tissus mous, dans les infections de la tête et du cou, les infections pleuropulmonaires, intra-abdominales, infections septicémiques, endocarditiques, du système nerveux central (abcès du cerveau, méningites purulentes...) (KERNBAUM S., 1988). Dans le cas d'endocardite et de méningite le métronidazole est particulièrement approprié, lorsque des germes anaérobies sont en cause, car c'est un antibiotique bactéricide (non pas seulement bactériostatique). Le métronidazole est actif dans le traitement des colites pseudomembraneuses associées à *C. difficile* comme alternative à la vancomycine (SMILACK J.D. et al., 1991).

Le métronidazole est aussi employé dans un but prophylactique avant des opérations digestives et gynécologiques. Le métronidazole, comme les autres 5-nitro-imidazoles sont inefficaces dans les Actinomycozes et les infections à *Propionibacterium* et s'est révélé décevant dans les infections des voies respiratoires inférieures.

b) Comme antiparasitaire

Le métronidazole est indiqué dans le traitement des vaginites à *Trichomonas vaginitis*, utilisé en dose unique ou en cure. Dans les affections digestives parasitaires, le métronidazole est actif dans le cas d'amibiase intestinale ou extra-intestinale, le traitement doit être suivi le plus souvent de la prise d'iodoquinol pour prévenir les rechutes. Dans les giardiases le métronidazole est actif et bien toléré (SCULLY B.E. et coll., 1988).

c) Posologies

- Infections anaérobies sensibles : en I.V. 15 mg/kg, dose suivie de 7,5 mg par kg toutes les 6 heures

per os 1 à 2 g/j en 2 à 4 prises

- Vaginite à *Trichomonas* : 2 g en dose unique ou 250 mg 3 fois/jour pendant 7 jours

- Vaginite non spécifique : 500 mg 2 fois/jour pendant 7 jours

- Colite associée à *C. difficile* : 250 mg 3 fois/jour pendant 7 à 10 jours.

- Amibiase : 700 mg 3 fois/jour pendant 10 jours

- Gardiase : 250 mg 3 fois/jour pendant 5 à 7 jours ou 2 g/jour pendant 7 jours (SCULLY B.E. et coll., 1988).

1.3.4. Métronidazole et activité sur la lipoxigénase

Nous avons démontré que le métronidazole inhibait de façon modérée la lipoxigénase-1 de soja. Par extrapolation, en dehors d'études réalisées sur les lipoxigénases animales, on peut penser que le métronidazole exerce sur ces dernières une action inhibitrice. De plus certains inhibiteurs des lipoxigénases sont des substances à propriétés oxydoréductrices et chélatrices. Hors le métronidazole, molécule simple, possède un cycle imidazole avec un groupement nitré,

méthyle, et surtout une chaîne éthanolique ; par le groupement OH de cette fonction alcool, le métronidazole, à la manière des catéchols, pourrait agir comme chélateur du fer des lipoxygénases et ou comme anti-oxydant réduisant le fer à l'état ferreux inactif.

Le métronidazole qui diffuse facilement dans les cellules (première étape de son mode d'action contre les agents infectieux) pourrait donc inhiber la 5-lipoxygénase cellulaire et la voie des leucotriènes, lui conférant ainsi une action anti-inflammatoire.

Dans les indications du métronidazole, notamment lors d'infections digestives, le caractère inflammatoire est important avec le développement de colite pseudomembraneuse à Clostridium, de colite et nécrose tissulaire lors d'amibiase intestinale, de duodéno-iléite lors de giardiase... et de signes généraux comme fièvre, oedème, douleur. L'intérêt du métronidazole est qu'il est actif dans de telles infections mais aussi qu'il pourrait exercer un effet anti-inflammatoire par inhibition de la voie des leucotriènes dans les leucocytes infiltrés et donc de leurs actions *in situ*, diminuant les manifestations inflammatoires de colite, douleur, fièvre...

Cet effet anti-inflammatoire du métronidazole est recherché en dehors de toute pathologie infectieuse lors d'essais cliniques dans la maladie de Chron avec des résultats inégaux, et surtout dans le cas de rosacée ou de dermite rasacéiforme post-cortisonique. Le métronidazole est alors prescrit par voie orale à 250 mg/jour en 2 prises pendant 1 mois puis 250 mg/jour et 125 mg/jour pendant 2 à 3 mois en entretien ou par voie locale sous forme récente de gel dermique ROZEX[®] ; l'inhibition de la 5-lipoxygénase pourrait se faire au niveau local des cellules dermiques (kératinocytes et leucocytes infiltrés). Cette inhibition serait responsable de l'effet anti-inflammatoire d'autant plus que le métronidazole est utilisé pendant une longue période.

II - INHIBITION DE LA LIPOXYGENASE PAR LE BNT ET SES DERIVES HALOGENES

2.1. Introduction

Ces produits organiques présentent une activité molluscicide et peuvent être utilisés pour détruire les mollusques dont les gastéropodes d'eau douce ou terrestre, hôtes intermédiaires de parasitoses humaines. Le cycle évolutif parasitaire est alors "coupé", la multiplication, la maturation du parasite ne pouvant avoir lieu du fait de la disparition de l'hôte intermédiaire. Essentiellement deux grandes parasitoses sont concernées par cette prophylaxie chimique : la fasciolose ou grande douve (pays tempérés) et la bilharziose ou schistosomose (pays chauds et humides).

Certains dérivés possèdent aussi des propriétés protozoocides, oxyuricides, ténicides.

L'activité du BNT et de ses dérivés serait due à l'interaction de ces molécules avec les chaînes respiratoires et les bases d'ADN du mollusque et a fait l'objet d'études de toxicité sur la faune et la flore (VIGNOLES P., 1990).

Les molécules simples que sont le BNT et ses dérivés halogénés, constituent une série chimique idéale pour étudier des relations structure-activité. C'est dans cette optique que nous avons mesuré l'activité de ces molécules sur la lipoxigénase de soja. Il faut préciser que ces molécules sont assez lipophiles (CLEDAT D., 1989) et se sont révélées peu solubles dans l'éthanol ainsi la gamme de concentrations étudiées est limitée. L'inhibition de la lipoxigénase par ces molécules dans cette zone de concentrations est faibles pour la plupart d'entre elles. On peut quand même remarquer que ces molécules dans les mêmes conditions inhibent la lipoxigénase de soja, toutes plus que le métronidazole, et certaines plus que le lévamisole.

On comparera le BNT et ses dérivés en fonction de la valeur d'inhibition maximale de la lipoxigénase et l'allure des "courbes" d'inhibition

2.2. Influence de la nature des halogènes

Comme l'a étudié (CLEDAT D., 1989) la nature des halogènes modifie la basicité et la lipophilie de la molécule dérivée du BNT. Sachant que notre étude est réalisée en tampon pH 7, la basicité des molécules n'intervient pas ; par contre la notion de lipophilie paraît essentielle. La lipophilie est exprimée par $\log P$ où P est le coefficient de partage octanol/eau et est calculée par la méthode de LEO.

Produits	$\log P$
BNT	0,81
Br-4 BNT	/
Br-3 BNT	1,87
Br-2 BNT	1,00
diBr-2,5 BNT	1,96
Cl-3 BNT	/
diCl-2,5 BNT	1,66
F-4 BNT	1,15
F-2 BNT	0,86

D'après notre étude on peut classer ces molluscicides en deux catégories :

- les molécules les plus inhibitrices (valeurs d'inhibition élevées, courbe des valeurs en progression) :

di Br-2,5 BNT

F-4 BNT

Cl-3 BNT

diCl-2,5 BNT

Br-3 BNT

- Les molécules les moins inhibitrices (valeurs d'inhibition faibles, courbe des valeurs en stagnation) :

Br-4 BNT

F-2 BNT

BNT

Br-2 BNT

Il apparaît donc que les molécules les plus lipophiles sont les plus inhibitrices. L'importance de la lipophilie pour une inhibition puissante a été démontrée dans d'autres études (HALSTA D.J. et coll., 1991).

La nature de l'halogène ne semble pas directement influencer le caractère inhibiteur des dérivés du BNT, en effet parmi les molécules les plus inhibitrices et les moins inhibitrices on retrouve des dérivés bromés, fluorés,...

2.3. Influence de l'emplacement des halogènes

En position 4 (para) sur le cycle benzénique : le dérivé halogéné F-4 BNT est une molécule inhibitrice alors que le Br-4 BNT est faiblement inhibiteur.

En position 3 (méta) sur le cycle benzénique : le Br-3 BNT et le Cl-3 BNT sont des dérivés du BNT parmi les plus inhibiteurs.

En position 2 (ortho) sur le cycle benzénique : ce sont les molécules les plus faiblement inhibitrice F-2 BNT, Br-2 BNT.

En position 2 et 5 (ortho et méta) sur le cycle benzénique : le diCl-2,5 BNT et le diBr-2,5 BNT font partie des molécules les plus inhibitrices.

Il apparaît globalement que les dérivés du BNT les plus inhibiteurs possèdent un halogène en position méta (3 ou 5).

CONCLUSION

Les propriétés biologiques des lipoxgénases animales et de leurs métabolites sont complexes. Ils interviennent dans les maladies inflammatoires (atteintes dermatologiques, rhumatismales, digestives,...), les réactions immunologiques, les phénomènes allergiques (asthme, anaphylaxie,...), les pathologies néoplasiques, les maladies métaboliques (diabète, athérosclérose), les sécrétions hormonales, et les médiations intracellulaires. La recherche de nouveaux inhibiteurs des lipoxgénases est donc d'actualité

A partir de l'expérimentation sur la lipoxgénase-1 de soja, modèle d'étude générale de l'activité lipoxgénasique, et par comparaison avec des études précédentes on a pu déterminer que:

- le kétoconazole et certainement le métronidazole sont des inhibiteurs de la 5-lipoxgénase et de la voie des leucotriènes. Ils présentent le double intérêt d'exercer une activité anti-infectieuse et une activité anti-inflammatoire. Il serait donc judicieux de favoriser leur utilisation dans les infections où les germes sont sensibles à ces produits et où le caractère inflammatoire est majeur : infection digestive, infection pulmonaire, infection articulaire... et de développer des formes locales indiquées dans les affections dermatologiques inflammatoires telles que le psoriasis, l'eczéma atopique... ; le métronidazole comme anti-inflammatoire est déjà utilisé dans la rosacée ; le kétoconazole dans la dermatite séborrhéique.

- le lévamisole agirait comme immunostimulant ayant des applications en cancérologie dans une polychimiothérapie grâce à son activité inhibitrice sur la 15-lipoxgénase. Ceci confirmerait la liaison étroite entre inhibition de la 15-lipoxgénase et activation de la 5-lipoxgénase et ouvrirait une nouvelle voie dans l'immunostimulation et la cancerologie.

- le BNT et ses dérivés sont des inhibiteurs de la lipoxgénase de soja, les molécules les plus lipophiles étant les plus inhibitrices. Il conviendrait de tester leur activité anti-lipoxgénasique sur des lipoxgénases animales et dans des conditions expérimentales différentes

pour établir une gamme de concentrations plus étendue (tout en sachant que la plupart des solvants organiques inhibent la lipoxycgénase).

Les nombreuses études cliniques réalisées avec des inhibiteurs des lipoxycgénases devraient déboucher prochainement sur de nouveaux médicaments anti-asthmatiques et anti-psoriasiques.

BIBLIOGRAPHIE

- **AKTAN S., AYKUT C., ERCAN S. (1991)**
Leucotriene C4 and prostaglandin E2 activities in the serum and cerebrospinal fluid during acute cerebral ischemia.
Prostaglandins Leukotrienes Fatty Acid, 43, 247-249

- **ANDRIANARISON R.H., BENEYTOUT J.L., TIXIER M. (1989)**
An enzymatic conversion of lipoxynease products by a hydroperoxyde lyase in blue-green algae *Oscillatoria s.p.*
Plant. Physiol., 91, 1280-1287

- **BEETENS J.R., LOOTS W., SOMERS Y., COENE M.C., DE CLERK F. (1986)**
Ketoconazole inhibits the biosynthesis of leukotrienes in vitro and in vivo.
Biochem. Pharmacol., 35, 883-891

- **BELKNER J., WIESNER R., KUHN H., LANKIN V.Z. (1991)**
The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase.
FEBS Letters, 279, 110-114

- **BENEYTOUT J.L., DREYFUSS G., NAJID A., TIXIER M. (1988)**
Treatment of rats with hydrocortisone or levamisole can modulate the lipoxygenase activity of their peritoneal macrophages.
Med. Sci. Res., 16, 619-620

- **BORGEAT P., FRUTEAU DE LACLOS B., CRASTES DE PAULET A., MACLOUF J. (1983)**
La biochimie des leukotrienes
dans Biochimie de l'inflammation, Ed. Masson, Paris, pp 44-60

- **BORGEAT P., SAMUELSSON B. (1979)**
Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A 23187.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 2148-2152

- **BORGEAT P., SAMUELSSON B. (1989)**
Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem., 254, 7855-7869

- **BRAIN S.D., WILLIAMS T.J. (1990)**
Leukotrienes and inflammation.
Pharmacol. Ther., 46, 57-66

- **CAMPBELL W.B., HENRICH L.W. (1990)**
Endothelial factors in the regulation of renin release.
Kidney. International, 38, 612-617

- **CASHMAN J.R., LAMBERT C., SIGAL E. (1988)**
Inhibition of human leukocyte 5-lipoxygenase by 15-HPETE and related eicosanoids.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 38-44

- **CATHCART M.K., Mc NALLY A., CHILSON G.M. (1991)**
Lipoxygenase mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex.
J. Lipid. Res., 32, 63-70

- **CHABLE-RABINOVITCH H., RIGAUD M. (1988)**
Oxygène et lipides.
Dans Biologie des lipides chez l'homme, de la physiologie à la pathologie, Ed. E.M. Inter., Paris, pp. 114-122

- **CHOPRA H., TIMAR J., CHEN Y.Q., RONG X.H., GROSSI I.M., FITZGERALD L.A., TAYLOR J.D., HONN K.V. (1991)**
The lipoxygenase metabolite 12-(S)HETE induces a cystoskeleton-dependant increase in surface expression of integrin α II b β 3 on melanoma cells.
Inter. J. Cancer, 49, 774-786

- **CLEDAT D. (1989)**
Influence de la structure sur la basicité et lipophilie de quelques dérivés du benzamido-2 nitro-5 thiazole.
Limoges, 18 Septembre 1989, 83 pages
Thèse Doctorat Université, chimie-chimie Physique, Limoges, 1989

- **COFFEY M., HADDEN J.W. (1985)**
Stimulation of lymphocyte Guanylate Cyclase by arachidonic acid and HETEs.

In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M., Ed. Plenum, New-York, pp. 501-510

- **COFFEY M., GOLDEN M.P., FANTONE J.C., SPORN P.H.S. (1992)**
Membrane association of active 5-lipoxygenase in resting cells.

J. Biol. Chem., 267, 570-576

- **CONRAD D.J., KUHN H., MULKINS M., HIGHLAND E., SIGAL E. (1992)**
Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 217-221

- **CRASTES DE PAULET A. (1983)**
Les grandes voies métaboliques de l'acide arachidonique.

Dans Biochimie de l'inflammation, Ed. Masson, Paris, pp. 20-25

- **CROOKE S.T., SARAN H., SAUSSY D., WINKLER J., FOLEY J. (1990)**
Signal transduction processes for the LTD4 receptor.

Adv. Prostaglandins. Thromboxane Leukotriene res., 20, 127-137

- **DAYER J.M., SCHORDERET M. (1988)**
Physiologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation.

Dans Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Ed. Slatkin, pp. 526-533

- **DENNIS A.E. (1990)**
Modification of the arachidonic acid cascade through phospholipase A2 dependant mechanisms.

Adv. Prostaglandins Thromboxane and Leukotrienes Res., 20, pp. 217-223

- **ENGELHARDT D., WEBER M.M., MIKSCH T., ABEDINPOUR F., JASPERS C. (1991)**
The influence of ketoconazole on human adrenal steroidogenesis : incubation studies with tissue slices.

Clin. Endocrinol. (Oxf.), 35, 163-168

- **FISHER S. (1989)**
Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in human.
Adv. Lipid. Res., 23, 169-198

- **FITZSIMMONS B.J., ADAMS J., EVANS J.F., LEBLANC Y., ROKACH J. (1985)**
The lipoxins stereochemical identification and determination of their biosynthesis.
J. Biol. Chem., 260, 13008-130012

- **FOGH K., HANSEN E.S., HERLIN T., KNUDSEN V., HENRIKSEN T.B., EWALD H., BUNGU C., KRAGBALLE K. (1989)**
15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) inhibits carrageenan induced experimental arthritis and reduce synovial fluid leukotriene B4.
Prostaglandins, 37, 213-228

- **FOGH K. (1990)**
Lipoxygenase product of arachidonic acid in a psoriasis, atopic dermatitis, and experimental arthritis.
Danish. Medical Bull., 37, 289-308

- **FORD-HUTCHINSON A.W. (1991a)**
Arachidonate 15-lipoxygenase characteristics and potential biological significance.
Eicosanoids, 4, 65-74

- **FORD-HUTCHINSON A.W. (1991b)**
Inhibition of leukotriene biosynthesis.
Annals New-York Acad. Sci., 629, 133-142

- **FORD-HUTCHINSON A.W. (1991c)**
FLAP : a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes
TIPS, 12, 68-70

- **FUNK C.D., GUNNE H, STEINER H., IZUMI T., SAMUELSSON B. (1989)**
Native and mutant 5-lipoxygenase expression in a baculovirus/insect cell system
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, 2592-2596

- **GALLUSSER A. (1988)**
Antibiotiques anti-anaérobies : 5-nitro imidazoles

Dans Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Ed. Slatkin, Paris, pp. 731-735

- **GARY F., BRYANT R.W., LOW C.E., PEASE A., BAILEY J.M. (1985)**
Lipoxygenation of mitochondrial membranes by reticulocyte lipoxygenase.

In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M., Ed. Plenum, New York, pp. 87-97

- **GRANSTROM E., KUMLIN M. (1987)**
Metabolism of prostaglandins and lipoxygenase products : relevance for eicosanoid assay.

In Prostaglandins and related substances : a practical approach, IRL press, Oxford, pp. 5-26

- **GUALDE N., GOODWIN J.S. (1985)**
Induction of suppressor T cells in vitro by arachidonic acid metabolites issued from the lipoxygenase pathway.

In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M., Ed. Plenum, New York, pp. 565-575

- **HAEGGSTROM J.Z. (1990)**
Cytosolic liver enzymes catalyzing hydrolysis of leukotriene A4 to leukotriene B4 and 5,6 di-hydroxyeicosatetraenoic acid.

Method. Enzymol., 187, 324-334

- **HAMBERG M. (1984)**
Studies on the formation and degradation of unsaturated fatty acid hydroperoxydes

Prostaglandins, Leukotrienes Med., 13, 27-34

- **HAMPSON A.J., ROULEY A.F., BARROW S.E., STEADMON R. (1992)**
Biosynthesis of eicosanoids by blood cells of the crab *Carcinus maenas*

Biochim. Biophys. Acta, 1124, 143-150

- **HEDQVIST P., RAUD J., DAHLEN S.E. (1990)**
Microvascular actions of eicosanoids in the Hamster cheek pouch

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 20, 153-160

- **HEBERTSSON H., HAMMARSTROM S. (1992)**
High affinity binding sites for 12(S)-hydroxy-5,8,10,14-
eicosatetraenoic acid (12(S)-HETE) in carcinoma cells.
FEBS letters, 298, 249-252

- **HIRATA F. (1985)**
Molecular mechanisms of the modulation of phospholipid
metabolism by glucocorticoids
In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M.,
Ed. Plenum, New-York, pp. 119-124

- **HLASTA D.J., CASEY F.B., FERGUSON E.W., GANGELL S.J.,
HEIMANN S., JAEGER E.P., KULLNIG R.K., GORDON R.J. (1991)**
5-lipoxygenase inhibitors : the synthesis and structure-
activity relationships of a series of 1-phenyl-3
pyrazolidinones
J. Med. Chem., 34, 1560-1570

- **HONN K.V., GROSSI I.M., FITZGERALD L.A., UMBARGER L.A.,
DIGLIO C.A., TAYLOR J.D. (1988)**
Lipoxygenase products regulate IRGp IIb/IIIa receptor
mediated adhesion of tumor cells to endothelial cells,
subendothelial matrix and fibronectin
Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 189, 130-135

- **ISCHII S., NOGUCHI M., MATSUMOTO T., NOMA M. (1992)**
Mutagenesis studies on the amino acid residues involved
in the iron-binding and the activity of human 5-lipoxygenase
Biochim. Biophys. Res. Commun., 182, 1482-1490

- **KERNBAUM S. (1988)**
5-nitro-imidazoles et infections à anaerobies.
Dans Pharmacologie Clinique bases de la thérapeutique,
Ed Expansion Scientifique Française, Paris, pp 1512-1518

- **KRELL R.D., AHARONY D., BUCKNER C.K., KUSNER E.J. (1990)**
Peptide leukotriene receptors and antagonists
Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 20, 119-126

- **KRONECK P.M., CUCURON C., ULLRICH V., UEDA N., SUZUKI H.,
YOSHIMOTO T., MATSUDA S., YAMAMOTO S. (1991)**
Porcine leukocyte 5- and 12-lipoxygenases are ion enzymes.
FEBS letters, 287, 105-107

- KUHN H., BELKNER J., WIESNER R., BRASH A.R. (1990a)
Oxygenation of biological membranes by the puer reticulocyte lipoxygenase
J. Biol. Chem., 265, 18351-18361

- KUHN H., WIESMER R., SCHEWE T. (1990b)
Formation of oxygenase and hydroperoxydase products by the pure reticulocyte lipoxygenase.
Biomed. Biochem. Acta, 49, 39-41

- KUHN H., SPRECHER H., BRASH R. (1990c)
On sigular or dual positional specificity of lipoxygenases.
J. Biol. Chem., 265, 16300-16305

- KUHN H., EGGERT L., ZABOLOTSKY O.A., MYAGKOVA G.I., SCHEWE T. (1991a)
Keto fatty acids not containing doubly allylic methylenes are lipoxygenase substrates.
Biochemistry, 30, 10269-10273

- KUHN H., HEYDECK D., SPRCHER H. (1991b)
On the mechanistic reasons for the dual positional specificity of the reticulocyte lipoxygenase
Biochim. Biophys. Acta, 1081, 129-134

- LAGARDE M., CROSET M., AUTHI K.S., DECHAVANNE M., RENAUD S., CRAWFORD N. (1985)
Formation and role of lipoxygenase products in human platelets.
In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M., Ed. Plenum, New-York, pp. 79-85

- LAPETINA E.G., CUATRECASA P. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 121-125

- LAX Y., GROSSMAN S., RUBINSTEIN S., MAGID N., BREITBART H. (1990)
Role of lipoxygenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa.
Biochim. Biophys. Acta, 1043, 12-18

- LEE T.H., ARM J.P., HORTON C.E., CREA A.E., MENCIA-HUERTA J.M., SPUR B.W. (1991)
Effects of dietary fish oil lipids on allergic and inflammatory diseases.

Allergy-Proc., 12, 299-303

- LEWIS R.A., AUSTEN F., SOBERMAN R.J. (1990)
Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway.

The New England Journal of Medicine, 323, 645-

- LINDGREN J.A., EDENIUS C. (1990)
Platelet-granulocyte interaction and the production of leukotrienes and lipoxins.

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 20, 63-

- LUDWIG P., HOLZHUTTER H.G., COLOSIMO A., SILVESTRINI M.C., SCHEWE T., RAPOPORT S.M. (1987)
A kinetic model for lipoxygenase based on experimental data with the lipoxygenase of the reticulocytes.

Eur. J. Biochem., 168, 325-337

- MALCOLM K., FALCH J.R., FITZPATRICK F.A. (1990)
Novel eicosanoids generated by cytochrome P450 : effects on platelet aggregation and protein phosphorylation.

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 20

- MORITA E., SCHRODER J.M., CHRISTOPHERS E. (1987)
Studies on arachidonate 15-lipoxygenase activities of human eosinophils and neutrophils.

J. Invest. Dermatol., 89, 325

- MURRAY J.J., BRASH A.R. (1988)
Rabbit reticulocyte lipoxygenase catalyses specific 12(S) and 15(S) oxygenation of arachidonyl-phosphatidyl choline.

Arch. Biochem. Biophys., 49, S35-S38

- MUTCH R.S., HUTSON P.R. (1991)
Levamisole in the adjuvant treatment of colon cancer.

Clinical Pharmacy, 10, 95-109

- **NAIDU A.K., KULKARNI A.P. (1991)**
Aldrin epoxidation catalytic potential of lipoxygenases coupled with linoleic acid oxidation.
Drug. Metab. Dispos., 19, 758-763

- **NAKAJIMA T., SUGIMOTO T., KURACHI Y. (1991)**
Platelet-activating factor activates cardiac G K via arachidonic acid metabolites.
FEBS letters, 289, 239-243

- **NARDONE P.A., SLOTMAN G.J., VEZERIDIS M.P. (1988)**
Ketoconazole : a thromboxane synthetase and 5-lipoxygenase inhibitor with antimetastatic activity in B16-F10 melanoma.
J. of Surgical Research, 44, 425-429

- **NATHAN M.H., PECK S.D., (1990)**
Lipoxygenase-generated eicosanoids inhibit glucose-induced insulin release from rat islets
Prostaglandins leukotriene essential fatty acids, 40, 21-25

- **NAVARATNAM S., FEITERS M.C., AL-HAKIM M., ALLEN J.C., VELDINK G.A., VLIAGENTHART J.F.G., (1988)**
Biochem. Biophys. Acta, 956, 70-76

- **NELSON M.J., BATTD.G., THOMPSON J.S., WRIGHT S., (1991)**
Reduction of the active-site iron by potent inhibitors of lipoxygenases.
J. Biol. Chem., 266, 82225-82229

- **NGUYEN T., FALGUEYRET J.P., ABRAMOVITZ M., RIENDEAU D., (1991)**
Evaluation of the role of conserved His and Met residues among lipoxygenase by site-directed mutagenesis of recombinant human 5-lipoxygenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 182, 1482-1490

- **NICHOLS R.C., VANDERHOECK J.Y., (1990)**
5-hydroxyeicosanoids selectively stimulate the human neutrophil 15-lipoxygenase to use endogenous substrate.
J. Exp. Med., 171, 136-175

- PACE-ASCIAK C.R., MARTIN J.M., COREY E.J., SU W.G., (1985)

Biochem. Biophys. Res. Commun., 128, 942

- PALMER R.M.J., SALMON J.A., (1985)

Inhibition of 5-lipoxygenase relevance to inflammation.

In Drugs Affecting Leukotrienes and Other Eicosanoid Pathway,
Ed. Plenum, New-York, pp 311-326

- PERCIVAL D., (1991)

Human 5-lipoxygenase contains an essential iron.

J. Biol. Chem., 266, 10058-10061

- PESKAR B.M., (1990)

Lipoxygenase products in gastric damage and protection

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 21, 753-760

- PESKAR B.M., (1991)

Leukotrienes in mucosal damage and protection.

J. Physiol. Pharmacol., 42, 135-145

- PETERS-GOLDEN M., SHELLY C., (1988)

Inhibitory effect of exogenous arachidonic acid on alveolar macrophage 5-lipoxygenase metabolism. Role of ATP depletion.

J. of Immunologie, 140, 1958-1966

- PETRONI A., BLASEVICH M., VISIOLI F., GALLI C., (1990)

Arachidonic acid cyclo and lipoxygenase pathways in astroglial cells.

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 21, 12-23

- PETTIT T.R., ROWLEY A.F., BARROW S.E., MALLET A.I.,
SECOMBS C.J., (1991)

Synthesis of lipoxins and other lipoxygenase products by macrophages from the rainbow trout Oncorhynchus mykiss.

J. Biol. Chem., 266, 8720-8726

- PIPER P.J., SAMPSON A.P., YAACOB H.B., MACLEOD J.M., (1990)

Leukotrienes in the cardiovascular system

In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M.,
Ed. Plenum, New-York, pp. 146-151

- **POSTOACK D., NYSTUEN L., KING L., UENO M., BECKMAN B.S., (1990)**

15-lipoxygenase products of arachidonate plays a role in proliferation of transformed erythroid cells.

Am. J. Physiol., 259, C849-C853

- **RAMIS I., CATAFAN J.R., SERRA J., BULBENA O., PICADO C., GELPI E., (1991)**

In vivo release of 15-HETE and other arachidonic acid metabolites in nasal secretions during early allergic reactions.

Prostaglandins, 42, 411-420

- **RAPOPORT S., HARTEL B., HANSDORF G., (1984)**

Methionine sulfoxide formation : the cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase.

Eur. J. Biochem., 139, 573-576

- **RAUKIN S.M., PATHASARATHY S., STEINBERG B., (1991)**

Evidence for a dominant role of lipoxygenases in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophage.

J. Lipid Research, 32, 449-456

- **RIENDEAU D., FALGUEYRET J.P., GUAY J., UEDA N., YAMMAMOTO S., (1991)**

Pseudoperoxidasic activity of 5-lipoxygenase stimulated by potent benzofuranol and N-hydroxyurea inhibitors of the lipoxygenase reaction.

Biochem. J., 274, 287-292

- **ROY S. K, KULKARNI A.P., (1991)**

A new pathway for 2-aminofluorene bioactivation.

Cancer Letter, 60, 33-39

- **SAKAMOTO S., SHICHI H., (1991)**

Regional distribution of lipoxygenase activities in porcine ciliary epithelium.

J. Ocul. Pharmacol., 7, 141-145

- **SAMUELSSON B., (1983)**

Leukotrienes : a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 11, 54-60

- **SAMUELSSON B., DAHLEN S.E., LINDGREN J.A., ROUZER C.A., SERBAN C.N., (1987)**

Leukotrienes and lipoxins : structures, biosynthesis, and biological effects.

Science, 237, 1171-1176

- **SAMUELSSON B., CLAEISSON H.E. (1990)**

Leukotriene B₄ : biosynthesis and role in lymphocytes.

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 20, 1-11

- **SCHEWE T., RAPOPORT S.M., KUHN H., (1986)**

Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase : comparaison with other lipoxygenases.

Adv. Enzymol., 58, 191-272

- **SCHEWE T., KUHN H., RAPOPORT S.M., (1987)**

Lipoxygenases measurement, characterisation and properties.

In Prostaglandins and related substances, ed IRL press, Oxford, pp 229-242

- **SCULLY B.E , (1988)**

Metronidazole.

Med. Clinics of North America, 72, 613-621

- **SERHAN C.N., SHEPPARD K.A., FIORE S., (1990)**

Lipoxins formation : evaluation of the role and actions of leukotriene A₄.

Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 20, 54-61

- **SIGAL E., GRUNBERGER D., CASHMAN J.M., CRAIHS C.S., CAUGHEY G.H., NADEL J.A., (1988)**

Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes partial purification and properties.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 150, 376-383

- **SIGAL. E, (1991)**

The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism.

Am. J. Physiol., 260, L13-L27

- **SIROIS P., BORGEAT P., (1988)**
Les leucotriènes.

*Dans Pharmacologie Clinique : bases de la thérapeutique,
Ed. Expansion Scientifique Française, Paris, 685-690*

- **SLOANE D.L., LEUNG L., CRAIK C.S., SIGAL E. (1990)**
A primary determinant for lipoxygenase positional specificity

Nature, 354, 149-152

- **SMILACK J.R., WILSON W.R., COCKERILL F.R., (1991)**
Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, clindamycin
and metronidazole.

Mayo Clin. Proc., 66, 1270-1280

- **SPARROW C.P., PATHASARATHY S., STEINBERG D., (1988)**
Enzymatic modification of the low density lipoprotein by
purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-
mediated oxidative modification.

J. Lipid Res., 29, 745-753

- **SPARROW C.P., OLSZEWSKI J., (1992)**
Cellular oxidative modification of low density lipoprotein
does not require lipoxygenases.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 128-131

- **SPECTOR A.A., GORDON J.A., MOORE S.A., (1988)**
Hydroxyecosatetraenoic acids (HETEs).

Prog. Lipid. Res., 27, 271-323

- **SPURNEY R.F., RUIZ P., PISETSKY D.S., COFFMAN T.M., (1991)**
Enhanced renal leukotriene production in murine lupus :
role of lipoxygenase metabolites.

Kidney international, 39, 95-102

- **SRAER J., RIGAUD M., BENS M., RABINOVITCH H., ARDAILLON R.,
(1983)**
Metabolism of arachidonic acid via the lipoxygenase pathways
in human and murine glomeruli.

J. Biol. Chem., 258, 4325-4330

- **STEVENSON H.C., GREEN I., HAMILTON J.M., CALABRO B.A., (1991)**
Levamisole : known effects on the immune system, clinical
results, and future applications of the treatment of cancer.

J. Clin. Oncol., 9, 2052-2066

- STEWART A.M., (1985)
Fuel metabolism as a determinant of arachidonic acid release and oxygenation. Studies with intact rat islets of langerhans.
In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M., Ed. Plenum, New-York, pp. 156-167

- TAKAHASHI Y., UEDA N., YAMAMOTO S., (1988)
Arch. Biochem. Biophys., 266, 613-621

- TAKAHASHI K., BADR K.F., (1991)
Functional significance of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in the glomerular microcirculation.
Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotriene Res., 21, 683-688

- TOCHER D.R., BELL J.G., SARGENT J.R., (1991)
Incorporation of [3H] arachidonic and [14C] eicosapentaenoic acids into glycerophospholipids and their metabolism via lipoxygenases in isolated brain cells from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.
J. Neurochem., 57, 2078-2085

- TOREL J., CILLARD J., CILLARD P., (1985)
Leucotriènes : origine et cibles d'action.
Lyon Pharmaceutique, 36, 121-128

- TORNHAMRE S., GIGOU A., EDENIUS C., LELLOUCH J.P., LINDGREN J.A., (1992)
Conversion of 5,6-dihydroxyeicosatetraenoic acids : a novel pathway for lipoxin formation by human platelets.
FEBS Letters, 304, 78-82

- UEDA N., HIROSHIMA A., NATSUI K., SHINJO F., YOSHIMOTO T., YAMAMOTO S., II K., GEROZISSIS K., DRAY S., (1990)
Localisation of arachidonate 12-lipoxygenase in parenchymal cells of porcine anterior pituitary.
J. Biol. Chem., 265, 2311-2316

- VANDERHOEK J.Y., KARMIN M.T., EKBORG S.L., (1985)
Endogenous hydroeicosatetraenoic acids stimulate the human polymorphonuclear leukocyte 15-lipoxygenase pathway.
Biol. Chem., 260, 15482-15487

- **VANDERHOEK J.Y., BAILEY J.M. (1985)**
Postphospholipase activation of lipoxygenase/leukotriene systems.
In Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins, Bailey J.M., Ed. Plenum, New-York, pp. 133-146

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

- **VAN WAUWE J., JANSSEN P.A.J. (1991)**
On the biochemical mode of action of levamisole : an update.
Inter. J. Immunopharm., 13, 3-9

- **VIGNOLES P. (1990)**
Toxicité du benzamido-2 nitro-5 thiazole et de 11 dérivés sur Lymnaea peregra ovata Müller, Gammarus pulex pulex L. et Euglena gracilis Klebs. Relation structure-activité quantitatives.
Limoges, 10 Décembre 1990, 131 pages
Thèse Doctorat d'Université, Sciences naturelles, Limoges, 1990

- **VLIEGENTHART J.F.G., VELDINK G.A. (1982)**
In Free Radicals in biology, Ed. Pryor W.A., Academic Press New-York, 5, 29-64

- **WANG J., HO YUEN B., LEUNG P.C.K. (1989)**
Stimulation of progesterone and prostaglandin E2 production by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid.
FEBS Letters, 244, 154-158

- **WEBER P.C. (1990)**
The modification of the arachidonic acid cascade by n-3 fatty acids.
Adv. Prostaglandins thromboxane Leukotriene Res., 20, 232-239

- **WIESNER R., KUHN H., ANTON M., SCHEWE T. (1990)**
Oxygenation of mitochondrial membranes by the erythroid lipoxygenase. Consequences for membrane properties.
Biomed. Biochim. Acta, 49, S35-S38

- **WONG A., HWANG S.M., COOK M.N. (1990)**
The regulation of 5-lipoxygenase activity in rat basophilic leukemia cells.
Adv. Prostaglandins thromboxane Leukotriene Res., 20, 28-34

- **WONG P.Y.K., WESTLUND P., HAMBERG M., GRANSTROM E., CHAO P.H.W., SAMUELSSON B. (1985)**
Metabolism of arachidonic acid by 12 et 15 lipoxygenases in human platelets and polymorphonuclear leukocytes.
In Drugs Affecting Leukotrienes and Other Eicosanoid Pathway,
Ed. Plenum, New-York, pp 181-191

- **YOSHIMOTO T., YAMAMOTO S., ARAKAWA T., SUZUKI H., YAMAMOTO S., YOKOYAMA C., TANABE T., TOH K. (1990)**
Molecular cloning and expression of human arachidonate 12-lipoxygenase
Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 1230-1235

- **ZIBOH V.A., FLETCHER M.P. (1992)**
Dose reponse effects of dietary gamma linolenic acid - enriched oils on human polymorphonuclear - neutrophil biosynthesis of leukotriene B4.
Am. J. Clin. Nutr., 55, 39-45

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	11

<u>PREMIERE PARTIE : LES LIPOXYGENASES ANIMALES</u>	12
I - Définition générale	13
II - Substrats des lipoxygénases animales	14
2.1. Généralités	14
2.1.1. Les acides gras polyinsaturés	14
2.1.2. Remarques	17
2.2. L'acide arachidonique	17
2.2.1. Structure chimique	17
2.2.2. Origine	18
2.2.3. Vers la synthèse des eicosanoïdes	18
III - Voies métaboliques	20
3.1. Introduction régio et stéréospécificité	20
3.2. Voie de la 15-lipoxygénase	23
3.2.1. A partir de l'acide arachidonique	23
a) Activité LTA4 synthétasique/oxygénasique	23
b) Activité hydroperoxydasique	24
c) Propriété de 12-lipoxygénase	24
3.2.2. A partir d'autres acides gras	24
3.2.3. Activité sur les membranes biologiques	25
3.3. Voie de la 12-lipoxygénase (n-9 lipoxygénase)	25
3.3.1. A partir de l'acide arachidonique	26
3.3.2. A partir d'autres acides gras	26
3.4. Voie de la 5-lipoxygénase - voie des leucotriènes	26

3.4.1. A partir de l'acide arachidonique	27
3.4.2. A partir d'autres acides gras	28
3.4.3. Autres voies formant des leucotriènes	29
3.4.4. Métabolisme transcellulaire du LTA4	29
3.5. Interactions entre les différentes voies jusqu'aux lipoxines	30
3.5.1. Dérivés di et tri-hydroxylés	30
3.5.2. Les lipoxines	32
IV - Régulation des réactions lipoxygénasiques	33
4.1. Par la libération d'acide arachidonique	33
4.1.1. Mécanismes enzymatiques	33
4.1.2. Stimulation - inhibition	34
4.2. Par les métabolites : les eicosanoïdes	35
4.2.1. Introduction, points communs des lipoxygénases	35
4.2.2. Pour la 15-lipoxygénase	36
a) Action des métabolites - "Self inactivation"	36
b) Substrats suicides	37
c) Remarque	38
4.2.3. Pour la 12-lipoxygénase	39
4.2.4. Pour la 5-lipoxygénase	39
a) Rôle du calcium et de l'ATP	39
b) La FLAP ou Five-Lipoxygenase Activating Protein	40
c) Action des métabolites	41
d) Influence des substrats	43
V - Relations Structure-Activité des lipoxygénases	43
5.1. Abords de biologie moléculaire : Structure protéinique	43
5.1.1. 15-Lipoxygénase	44
a) Humaine	44
b) Chez le lapin	44

c) Remarque	44
5.1.2. 12-lipoxygénase	45
a) Humaine	45
b) Porcine	45
c) Remarque.	46
5.1.3. 5-lipoxygénase	46
5.2. Régiospécificité des réactions lipoxygénasiques	46
5.2.1. Unique ou double spécificité de position	46
5.2.2. Un déterminant essentiel pour la spécificité de position	48
5.3. Le fer non héminique des lipoxygénases	50
5.3.1. Rôle dans la dioxygénation	52
VI - Propriétés des lipoxygénases, de leurs métabolites	52
6.1. La 15-lipoxygénase.	55
6.1.1. Sur les membranes biologiques - Maturation des érythrocytes	55
6.1.2. Les LDL	56
6.1.3. Autres propriétés	57
a) Au niveau des voies aériennes supérieures	57
b) Au niveau inflammation-immunité	58
c) Au niveau de la sphère génitale	58
6.2. La 12-lipoxygénase	59
6.2.1. Inflammation - cas du psoriasis	59
6.2.2. Immunité	60
6.2.3. Aggrégation plaquettaire	60
6.2.4. Activité sécrétoire	60
6.2.5. Cancérologie	61
6.3. La 5-lipoxygénase	61
6.3.1. Dans l'inflammation	62
a) Processus inflammatoire	62
b) Rôle du LTB ₄	63

c) Rôle des cystéinyls leucotriènes : LTC ₄ LTD ₄ LTE ₄	64
d) Pathologie allergique	65
e) Autres maladies inflammatoires	66
6.3.2. Système cardiovasculaire	66
6.3.3. Système nerveux central	67
6.3.4. Autres	68
a) Au niveau du rein	68
b) Au niveau gastrique	68
6.3.5. Récepteurs des Leucotriènes	70
6.4. Les lipoxines.	72
6.4.1. Inflammation	72
6.4.2. Immunité cellulaire	72
6.4.3. Autres	73
a) Au niveau rénal.	73
b) Protéine kinase C.	73
6.5. Remarque	73
VII - Inhibition	74
7.1. Classification des inhibiteurs des lipoxygénases	74
7.1.1. Les substances "Redox"	74
7.1.2. Les antagonistes compétitifs des récepteurs aux lipoxygénases	75
7.1.3. Les analogues de substrat	75
7.2. Influence de la diététique	76
 <u>DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION</u>	 77
I - Matériels	78
1.1. L'enzyme	78
1.2. Le substrat	79
1.3. Les produits testés	79
1.3.1. Molécules thérapeutiques à cycle imidazole	79

1.3.2. Molécules à visée molluscicide à cycle thiazole	81
1.4. Tampon utilisé	83
1.5. Spectrophotomètre	83
II - Méthodes	85
2.1. Réalisation du témoin	85
2.1.1. Composition	85
2.1.2. Mesure spectrophotométrique de l'activité témoin	86
<i>a)</i> En mode SCAN	86
<i>b)</i> En mode TIME-DRIVE	88
2.2. Etude de l'action des différents produits	91
2.2.1. Préparation de gammes de dilution	91
2.2.2. Mesures spectrophotométriques	91
2.3. Mesure de l'activité inhibitrice	92
III - Résultats	92
3.1. Les molécules thérapeutiques	92
3.1.1. Kétoconazole	92
3.1.2. Métronidazole	93
3.1.3. Lévamisole	94
3.2. BNT et dérivés	95
3.2.1. BNT	95
3.2.2. Dérivés bromés	95
3.2.3. Dérivés chlorés	96
3.2.4. Dérivés fluorés	96
3.2.5. Pourcentage d'inhibition de l'enzyme	97
<u>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION</u>	99

1.1. Kétoconazole	100
1.1.1. Spécialités	100
1.1.2. Caractéristiques pharmacologiques	101
a) Mode d'action	101
b) Spectre antifongique	101
c) Activité leishmanicide	102
d) Pharmacocinétique	102
1.1.3. Indications thérapeutiques posologies	103
a) Mycoses	103
b) Leishmaniose	104
c) Posologies - durée de traitement	104
1.1.4. Interactions enzymatiques et conséquences	104
1.2. Lévamisole	106
1.2.1. Spécialités	106
1.2.2. Caractéristiques pharmacologiques	107
a) Mode d'action	107
b) Pharmacocinétique	108
1.2.3. Indications thérapeutiques - posologies	109
a) Comme anthelminthique nématocide	109
b) Comme immunostimulant	109
1.2.4. Conséquences de l'interaction lévamisole-lipoxygénase	110
1.3. Métronidazole	111
1.3.1. Spécialités	111
1.3.2. Caractéristiques pharmacologiques	112
a) Mode d'action	112
b) Spectre d'activité	113
c) Pharmacocinétique	114
1.3.3. Indications et posologies	115
a) Comme anti-bactérien	115
b) Comme anti-parasitaire	116

c) Posologies	116
1.3.4. Métronidazole et activité sur la lipoxygénase	116
II - Inhibition de la lipoxygénase par le BNT et ses dérivés halogénés	118
2.1. Introduction	118
2.2. Influence de la nature des halogènes.	119
2.3. Influence de l'emplacement des halogènes	120
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE	123

RESUME

Les propriétés biologiques des lipoxygénases animales et de leurs métabolites sont complexes. Ils interviennent dans les maladies inflammatoires (atteintes dermatologiques, rhumatismales, digestives,...), les réactions immunologiques, les phénomènes allergiques (asthme, anaphylaxie,...), les pathologies néoplasiques, les maladies métaboliques (diabète, athérosclérose), les sécrétions hormonales, et les médiations intracellulaires. La recherche de nouveaux inhibiteurs des lipoxygénases est donc d'actualité

A partir de l'expérimentation sur la lipoxygénase-1 de soja, modèle d'étude générale de l'activité lipoxygénasique, et par comparaison avec des études précédentes on a pu déterminer que:

- le kétoconazole et certainement le métronidazole sont des inhibiteurs de la 5-lipoxygénase et de la voie des leucotriènes. Ils présentent le double intérêt d'exercer une activité anti-infectieuse et une activité anti-inflammatoire. Il serait donc judicieux de favoriser leur utilisation dans les infections où les germes sont sensibles à ces produits et où le caractère inflammatoire est majeur : infection digestive, infection pulmonaire, infection articulaire... et de développer des formes locales indiquées dans les affections dermatologiques inflammatoires telles que le psoriasis, l'eczéma atopique... ; le métronidazole comme anti-inflammatoire est déjà utilisé dans la rosacée ; le kétoconazole dans la dermatite séborrhéïque.

- le lévamisole agirait comme immunostimulant ayant des applications en cancérologie dans une polychimiothérapie grâce à son activité inhibitrice sur la 15-lipoxygénase. Ceci confirmerait la liaison étroite entre inhibition de la 15-lipoxygénase et activation de la 5-lipoxygénase et ouvrirait une nouvelle voie dans l'immunostimulation et la cancérologie.

- le BNT et ses dérivés sont des inhibiteurs de la lipoxygénase de soja, les molécules les plus lipophiles étant les plus inhibitrices. Il conviendrait de tester leur activité anti-lipoxygénasique sur des lipoxygénases animales et dans des conditions expérimentales différentes pour établir une gamme de concentrations plus étendue (tout en sachant que la plupart des solvants organiques inhibent la lipoxygénase).

Mots clés:

Lipoxygénases animales

Inhibition

Kétoconazole

Lévamisole

Métronidazole

Benzamido-Nitro-Thiazole