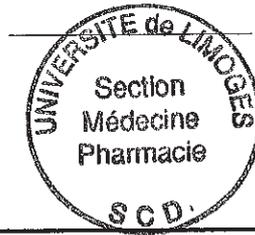


UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1995



THESE N° 301

**MISE EN EVIDENCE D'UNE CORRELATION ENTRE
L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE ET LE POUVOIR
ELECTRODONNEUR DE PHENOTHIAZINES.
RECHERCHE D'UNE
ACTIVITE ANTIRADICALAIRE.**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 9 Janvier 1995

PAR
Jean CHABOT
né le 23 septembre 1967 à Soyaux (Charente)

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur RABY.C......- Président
M. DUROUX.J.L Maître de conférences.....- Juge
M. LAGORCE J.F. Maître de conférences.....- Juge
M. TRAPATEAU J.M. Pharmacien biologiste.....- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

<u>DOYEN DE LA FACULTE:</u>	Monsieur le Professeur RABY Claude
<u>ASSESEURS:</u>	Monsieur le Professeur GHESTEM Axel Monsieur DREYFUSS Gilles – Maître de Conférences
<u>PROFESSEURS:</u>	
BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur **Claude RABY**
Doyen de la faculté de Pharmacie,
Professeur titulaire de Pharmacie chimique et chimie organique,
Licencié ès sciences,
Ancien interne des hopitaux de Bordeaux.

Monsieur, nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de cette thèse.

Nous avons toujours apprécié la qualité et la rigueur de votre enseignement au cours de nos études, et la motivation que vous avez su créer chez nous pour celles-ci.

En nous accueillant au sein de votre laboratoire, vous nous avez permis de réaliser ce travail.

Veillez trouver ici, Monsieur, le témoignage de notre gratitude et de notre profond respect.

A notre directeur de thèse

Monsieur Jean François LAGORCE,
Maître de conférences de chimie Organique et de Chimie Thérapeutique,
Docteur d'état en Pharmacie,
Diplômé d'études Approfondies de Pharmacochimie,
Diplômé du Doctorat ès-sciences pharmaceutiques.

Monsieur, nous avons la chance de travailler avec vous, de bénéficier de votre compétence et de vos conseils judicieux. Vous nous faites partager votre passion pour la recherche. Nous trouvons toujours, grâce à vous, la motivation nécessaire pour surmonter les passages difficiles avec optimisme.

Pour toutes ses raisons, Monsieur, c'est à la fois un honneur et un plaisir de vous compter parmi les membres du jury de notre thèse.

Qu'il nous soit permis, à cette occasion, de vous exprimer toute notre reconnaissance pour votre aide et votre présence.

A Monsieur **Jean Luc DUROUX**,

Maître de Conférences de Biophysique,
Diplômé d'études approfondies d'électronique
et communication optique,
Diplômé du doctorat ès-sciences physiques.

Soyez vivement remercié pour le soutien et l'aide que vous nous avez apporté dans la réalisation de ce travail.

Votre collaboration et vos encouragements dans l'approche et l'utilisation de la spectrométrie par résonance paramagnétique électronique ont été un atout précieux.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur **Jean Marie TRAPATEAU**,

Pharmacien Biologiste,

Praticien Hospitalier,

Chef de service de Biologie Polyvalente du CHG ANGOULEME,

Ancien interne des Hopitaux de Bordeaux.

Monsieur, vous nous faites l'honneur d'accepter de juger cette thèse. Vous nous avez toujours fait partager votre passion pour la biologie. Vous nous avez toujours encouragé tout au long de nos études.

Recevez, par l'intermédiaire de ce travail, nos sincères et chaleureux remerciements.

A mes parents,

A mon frère,

Qui ont su me soutenir tout au long de mes études. Qu'ils soient remerciés de tout ce qu'ils ont fait pour moi. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon affection.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

A tous les membres du laboratoire,

Monsieur le professeur BUXERAUD,

Monsieur Jamal FATIMI,

Madame Marie Laure CHABERNAUD,

Madame Frédérique CLAUDE,

Mademoiselle Frédérique MARTIN,

Mesdames BOUILLAGUET ET CARDE.

Pour leur accueil, leur sympathie, leur efficacité et leurs compétences.

" à mon grand père. "

" à Françoise..".

PLAN

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

1. SYSTEMES PEROXYDASIQUES ET INFLAMMATION

1.1. LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE

1.2. PROSTAGLANDINE SYNTHETASE

1.3. LES PROSTAGLANDINES

1.4. LE THROMBOXANE A₂

2. MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

2.1. TEST IN VIVO: OEDEME A LA CARRAGENINE SUR LA
PATTE DE RAT

2.2. TEST IN VITRO: DEGRADATION DU LIQUIDE SYNOVIAL

DEUXIEME PARTIE

1. AGREGATION PLAQUETTAIRE

1.1. MECANISME DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE

1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

2. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₂

2.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

2.2. EXPRESSION DES RESULTATS

3. RADICAUX LIBRES

3.1. GENERALITES-DEFINITION

3.2. RADICAUX LIBRES OXYGENES

3.3. RADICAUX LIBRES ET INFLAMMATION

3.4. AUTRE IMPLICATION DES RADICAUX LIBRES IN VIVO

3.5. SYSTEMES DE PROTECTION CONTRE LES RADICAUX LIBRES

3.6. MOYEN D'ETUDE DES RADICAUX LIBRES

TROISIEME PARTIE

1. LES PHENOTHIAZINES ET ISOSTERES

1.1. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

1.2. ACTIVITE DES PHENOTHIAZINES SUR LES SYSTEMES
PEROXYDASIQUES

2. ACTIVITE ANTIAGREGANTE PLAQUETTAIRE

3. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₂

4. ACTIVITE ANTIRADICALAIRE

QUATRIEME PARTIE

1. RESULTATS DE LA SERIE

2. CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Les recherches sur les antithyroïdiens de synthèse (ATS) conduites ces dernières années par l'équipe du Pr RABY ont confirmé l'idée que le fort pouvoir électrodonneur de certaines molécules pouvait avoir une influence sur l'hormonogénèse thyroïdienne.

Ces molécules possèdent le pouvoir de former des complexes de transfert de charge avec l'iode, le détournant ainsi de sa voie métabolique normale. La formation de tels complexes au sien du corps thyroïde empêche la poursuite de l'oxydation de l'iode jusqu'à l'état I^+ et son incorporation à la thyroglobuline pour former les hormones thyroïdiennes (figure 1).

La formation de complexes par transfert de charge est quantifiée par la mesure d'une constante, K_c . L'activité antithyroïdienne d'une molécule apparait lorsque cette constante K_c est supérieure à 100 l.mol^{-1} .

Les substances utilisées en thérapeutique antithyroïdienne ont toutes une valeur de K_c assez élevée (tableau I).

	$K_c (\text{l.mol}^{-1})$	Activité antithyroïdienne
Thiocyanate de K	94	+
Mercapto-2 thiazoline	2527	+++
Thiourée	8825	+++
Tétraméthylthiourée	13215	+++
Mercapto-2 méthyl-1 imidazole	23194	++++

Tableau 1: Corrélation K_c /activité antithyroïdienne de quelques composés

(in vivo) .D'après BUXERAUD (1)

D'autres médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques, notamment les phénothiazines, font preuve du même pouvoir de complexation, avec des degrés variables.

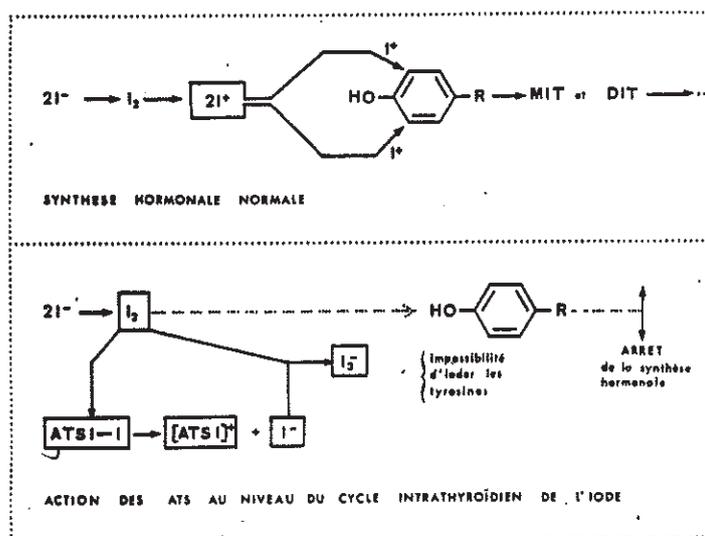


Figure 1: Action de détournement de l'iode intrathyroïdien par les ATS selon RABY et BUXERAUD (1).

L'hormonogénèse thyroïdienne fait intervenir une peroxydase (figure 2), enzyme clé de la synthèse des hormones T_3 et T_4 impliquée à différents niveaux:

- oxydation des iodures.
- couplage des iodotyrosines pour former les hormones T_3 et T_4 .

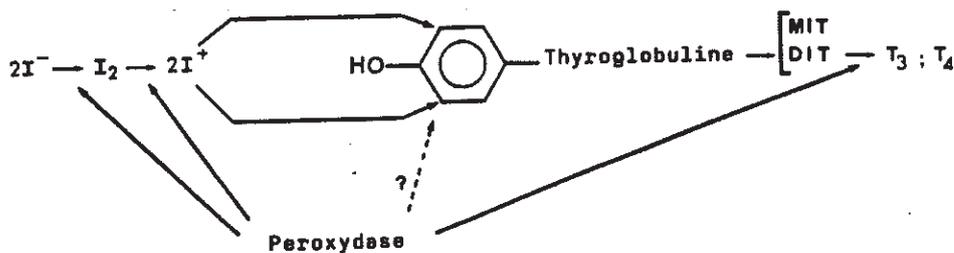


Figure 2: Intervention de la peroxydase dans l'hormonogénèse thyroïdienne.

Considérant les échanges d'électrons au sein des systèmes oxydasiques et peroxydasiques il a été envisagé que le fort pouvoir électrodonneur des molécules à visée antithyroïdienne pouvait avoir des répercussions sur le fonctionnement de la peroxydase thyroïdienne. Cette hypothèse d'un autre mécanisme d'action des ATS a été confirmée.

Par ailleurs, le méthimazole, puissant médicament antithyroïdien, a été cité il y a une vingtaine d'année comme ayant une forte activité anti-inflammatoire (6). Au cours de la réaction inflammatoire, principalement durant la phase d'amplification, interviennent un grand nombre de médiateurs, synthétisés, pour la plupart, par les cellules effectives du processus inflammatoire. Il s'agit des prostaglandines (PG), leucotriènes (LT) et thromboxanes (TX). Ces molécules proviennent toutes d'un précurseur commun: l'acide arachidonique.

L'acide arachidonique peut suivre deux voies métaboliques:

- la voie des prostaglandines et thromboxanes par l'action de la prostaglandine synthétase (PGS).

- la voie des leucotriènes par l'action de la 5-lipoxygénase.

Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'action de la prostaglandine synthétase, complexe enzymatique comprenant une cyclo-oxygénase et une peroxydase.

A partir du constat d'une certaine similitude dans les structures et les réactions des différentes peroxydases animales, nous pouvons imaginer qu'un certain type de molécules montrent un comportement inhibiteur vis-à-vis de l'ensemble des peroxydases.

Ainsi, considérant le pouvoir inhibiteur des ATS sur la peroxydase thyroïdienne, des études ont mis en évidence que ces molécules douées d'un pouvoir électrodonneur possédaient également, à des degrés variables, un pouvoir inhibiteur sur d'autres systèmes peroxydasiques, notamment la prostaglandine synthétase. Ces tests ont porté sur la mesure de l'inhibition de la PGS, de la peroxydase de Raifort et de la lactoperoxydase. Cette dernière enzyme, d'origine animale, présente de grandes homologues de structure avec la peroxydase thyroïdienne et peut catalyser les mêmes réactions.

Ces résultats, complétés par des mesures de l'activité anti-inflammatoire in vivo de ces molécules permettent d'expliquer le pouvoir anti-inflammatoire du méthimazole et d'étendre ce pouvoir aux autres antithyroïdiens de synthèse.

Comme nous l'avons vu plus haut, d'autres médicaments de classes thérapeutiques diverses, notamment les phénothiazines, font preuve d'un pouvoir électrodonneur leur conférant une activité antithyroïdienne. Cette activité antithyroïdienne peut être due, également, à une perturbation de la peroxydase thyroïdienne.

Ainsi, parallèlement à l'étude portant sur les ATS, et suivant les mêmes protocoles expérimentaux, l'effet secondaire anti-inflammatoire des phénothiazines est évoqué, par inhibition de la prostaglandine synthétase.

Nous nous proposons de compléter cette étude par la détermination de leur activité sur des sites d'action précis de l'inflammation:

- Mesure de leur activité anti-agrégante plaquettaire.
- Détermination de leur activité sur la synthèse de la prostaglandine E2.
- Détermination de leur pouvoir de capter les radicaux libres oxygénés.

Nous nous attarderons un peu plus sur ce pouvoir antiradicalaire car les radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses pathologies.

PREMIERE PARTIE

1. SYSTEMES PEROXYDASIQUES ET INFLAMMATION.

Au cours d'une série de réactions complexes qui constituent le processus inflammatoire, les cellules tissulaires traumatisées produisent plusieurs molécules médiateurs de l'inflammation: prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes.

1.1. LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE.

A la suite d'une agression ou d'un dommage cellulaire qui constituent en tout état de cause une rupture d'équilibres physiologiques, cellulaires et/ou moléculaires, on assiste à une série de réactions qu'on peut chronologiquement diviser en trois temps: une phase d'initiation puis d'amplification et enfin de stabilisation.

①. La phase d'initiation:

Le lancement de la réaction se situe dans le tissu interstitiel d'une anse capillaire.

Au niveau cellulaire, deux types de cellules sont susceptibles d'initier une réaction inflammatoire:

- Les mastocytes: cellules résidentes des tissus, principalement prépondérantes aux portes d'entrée éventuelles des agresseurs (peau, muqueuses digestive et respiratoire). Elles sont activées par divers stimuli: physiques (thermiques, mécaniques..) ou chimiques (collagène altéré, anaphylatoxines, allergènes..) et subissent une dégranulation qui libère essentiellement de l'histamine.

- Les plaquettes sanguines: Elles sont activées au contact des collagènes I et III extra vasculaires, ce qui suppose une brèche ou une altération de l'endothélium vasculaire. Le signal membranaire entraîne une redistribution du calcium intraplaquettaire et une activation de divers systèmes enzymatiques (intervention de la calmoduline): phospholipase A₂ - adénylcyclase.

L'action des plaquettes est triple: obturation de la brèche par adhésion à la paroi, initiation de l'hémostase et libération de facteurs phlogogènes.

Au niveau macromoléculaire, les caractéristiques de l'initiation varient selon qu'interviennent des processus immunitaires ou non. L'intervention des cellules immunocompétentes peut être décrite selon quatre grands mécanismes: réaction anaphylactique, cytotoxique, par immuns-complexes et hypersensibilité retardée.

Dès les premières secondes de la réaction inflammatoire, on observe des changements à l'étage de la micro circulation: vasodilatation et augmentation de la perméabilité capillaire, extravasation des cellules.

②. La phase d'amplification:

La phase d'initiation est immédiatement suivie d'une amplification considérable. C'est durant cette phase que vont intervenir la prostaglandine synthétase et les médiateurs qui nous intéressent.

Cette phase est caractérisée par la mise en oeuvre de toutes les cellules effectives et médiatrices de l'inflammation. La traduction clinique de cette phase correspond aux signes principaux de l'inflammation aiguë : rougeur, douleur, chaleur et induration.

Les cellules effectives impliquées sont réparties en deux vagues : les polynucléaires et les monocytes. Ces cellules sont attirées au niveau du foyer inflammatoire par un phénomène de chimiotactisme dû à des substances libérées et/ou activées comme la fraction C_{5a} du complément, le collagène ou le leucotriène LTB₄. Les monocytes gagnent le site inflammatoire et se transforment en macrophages, cellules douées d'une activité phagocytaire leur permettant d'éliminer les agents causaux après opsonisation.

Le processus de phagocytose par les macrophages est étroitement lié à la production de radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$, puissants agents microbicides et cytotoxiques, que nous détaillerons plus loin.

La rougeur et l'oedème associés à la douleur relèvent de phénomènes hémodynamiques locaux liés à l'activité de facteurs vaso-actifs libérés in situ:

* des facteurs d'origine tissulaire:

- L'histamine (mastocytes, polynucléaires basophiles) provoquant des phénomènes favorisant l'extravasation, sa durée d'action est courte.

- Les leucotriènes, dérivés de l'acide arachidonique, possédant un effet algogène et chimiotactique. Ils seraient capables d'activer la synthèse des prostaglandines et de thromboxanes par les macrophages.

- Les prostaglandines, précurseurs de thromboxane A_2 et de la prostacycline PGI_2 , que nous détaillerons plus loin.

* des facteurs d'origine plasmatiques:

- La bradykinine accroît la perméabilité vasculaire et irrite les fibres sensorielles.

- Les dérivés du complément, qui jouent un rôle dans les changements de perméabilité capillaire ainsi que sur le chimiotactisme, l'opsonisation et la phagocytose.

③. La phase de réparation et de stabilisation de la réaction.

Parvenue à un certain niveau, la réaction inflammatoire se stabilise. D'une part on assiste à un renforcement de l'état immunitaire de l'organisme et d'autre part s'installe un contrôle de la réaction. Les molécules phlogogènes étant désactivées, inhibées ou neutralisées, la restauration des tissus altérés pourra normalement s'amorcer. Les macrophages participent à l'activation des fibroblastes qui synthétisent du collagène pour former un tissu fibreux de remplacement.

1.2. PROSTAGLANDINE SYNTHETASE.

les réactions conduisant à la production de prostaglandines (PG), sont effectuées au sein d'un complexe multienzymatique intracellulaire appelé prostaglandine synthétase (PGS), comprenant une activité cyclo-oxygénase et une activité peroxydase.

1.2.1. METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE.

L'acide arachidonique ($C_{20:4}$ (n-6)), est un acide gras insaturé de la série linoléique constituant des phospholipides membranaires . Cet acide gras représente en général 5% des acides gras constituant la membrane cellulaire. Ce taux peut atteindre 20% dans la membrane des macrophages.

Sous l'action de stimuli divers et variables d'une cellule à l'autre, l'acide arachidonique est libéré à l'intérieur de la cellule par l'action d'une enzyme: la phospholipase A_2 . Cette enzyme, calcium dépendante, est sous la dépendance d'une protéine intramembranaire: la lipomoduline. L'activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est due au blocage de la PLA_2 par l'intermédiaire de la lipomoduline.

L'acide arachidonique libéré peut suivre deux voies métaboliques: (figure 2)

- la voie des prostaglandines et thromboxanes par l'action de la PGS
- la voie des leucotriènes par l'action de la 5-lipoxygénase.

Nous ne nous intéresserons qu'à la voie de la PGS .

A partir de l'acide arachidonique, des séquences de réaction mettent en jeu:

- une activité cyclo-oxygénase, responsable de l'incorporation d'oxygène et d'une cyclisation conduisant à l'endoperoxyde PGG_2 , instable.
- une activité hydroperoxydase responsable de la conversion de PGG_2 en PGH_2 .

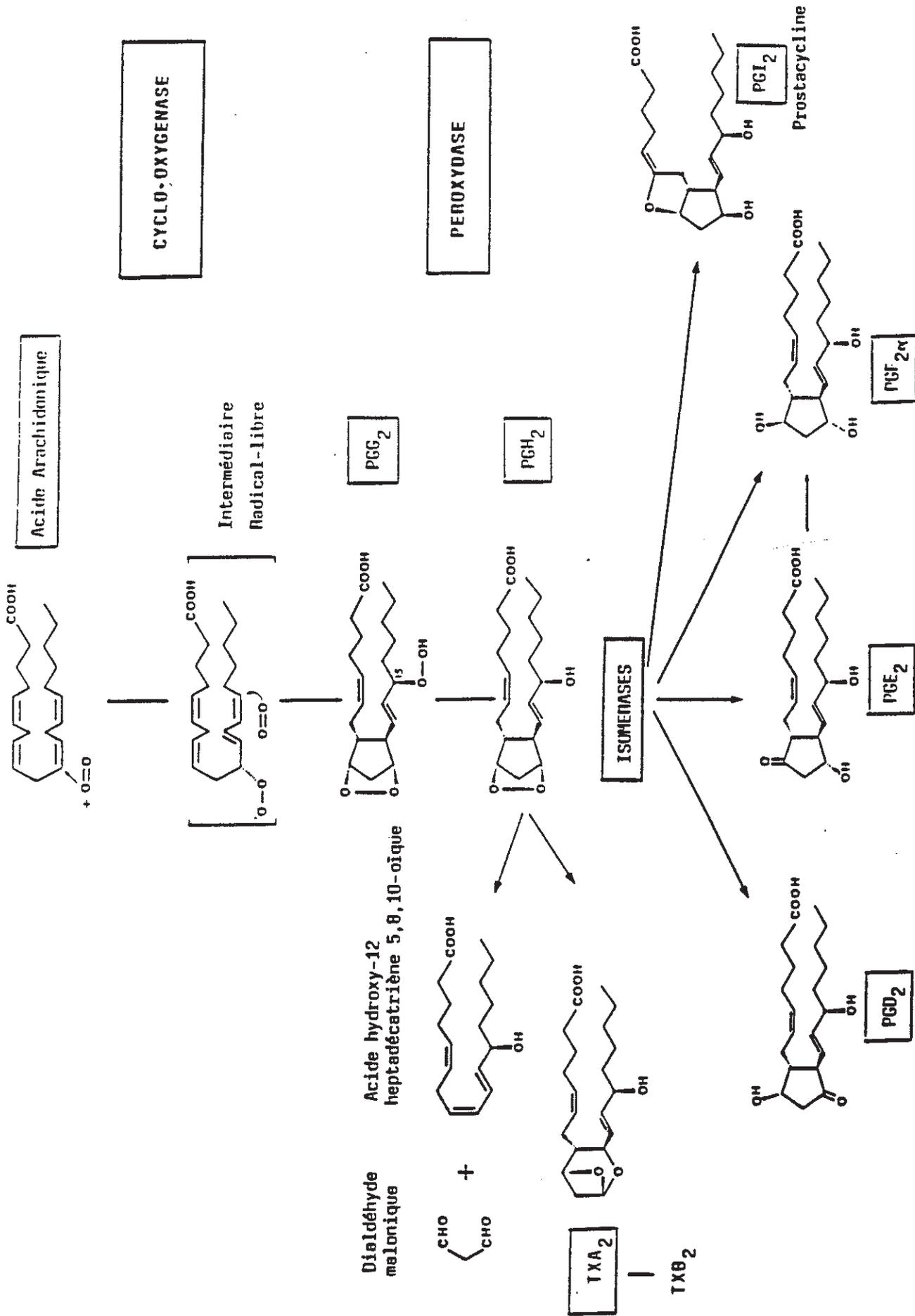


Figure 2 : Synthèse des prostaglandines et dérivés à partir de l'acide arachidonique.

Diverses fractions cellulaires convertissent ensuite PGH_2 en d'autres prostaglandines, en thromboxane ou en prostacycline PGI_2 .

Les études biochimiques effectuées sur la PGS montrent que les deux activités enzymatiques, de cyclisation oxydative et de conversion des endoperoxydes formés, sont indissociables; qu'elles soient attribuées à une même protéine enzymatique ou à deux protéines séparées étroitement liées. La préparation contenant ces deux activités est nommée par les biochimistes PG-endoperoxyde synthétase, il s'agit d'une glycoprotéine de masse moléculaire 126.000 dont la chaîne polypeptidique représente environ 70.000.

Ce complexe enzymatique montre de grandes similitudes avec les hémoperoxydases classiques.

La présence d'hème, en tant que groupement prosthétique, est indispensable aux deux activités cyclo-oxygénase et peroxydase. Les préparations à base de PGS hautement purifiée ne contiennent pas de fer en quantité équimolaire ni d'hème, mais elles exigent la présence d'hématine ou d'hémoglobine ou d'autres métallo protéines.

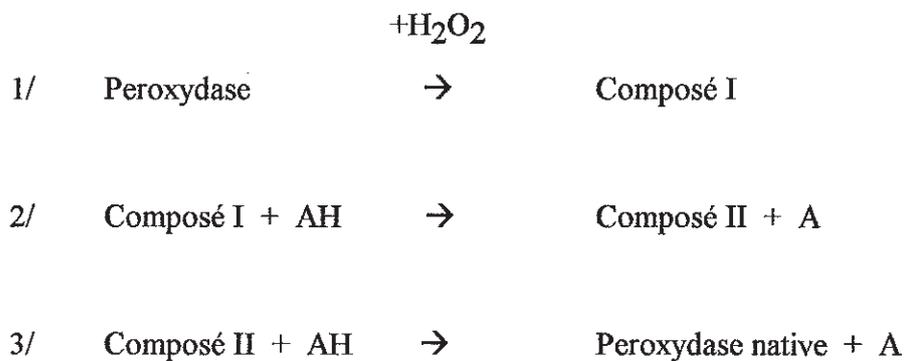
La présence de petites quantités d'hydroperoxydes est nécessaire à l'activation de l'activité cyclo-oxygénase comme de la peroxydase, donnant naissance rapidement au composé I. L'acide arachidonique réagit avec le composé I, donnant naissance à un composé II et à un radical de l'acide arachidonique qui réagit avec O_2 pour former PGG_2 .

L'activité cyclo-oxygénase est également inhibée par un excès d'hydroperoxydes ou d'arachidonate. Il semblerait qu'il y ait un équilibre entre les deux activités car la peroxydase diminue cette quantité d'hydroperoxyde présent dans l'environnement de la cyclo-oxygénase, permettant ainsi le maintien de l'activité globale prostaglandine synthétase.

1.2.2. PRINCIPES GÉNÉRAUX DE L'ACTIVITÉ DES PEROXYDASES.

Les peroxydases sont des enzymes oxydantes pouvant décomposer le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 avec production d'oxygène actif, c'est à dire capables d'oxyder énergiquement les corps voisins.

Il s'agit pour la plupart d'hémoprotéines dont le schéma réactionnel (figure 3), constitué de plusieurs étapes, peut se résumer de la façon suivante:



La réaction 1/ exige 1 mole d' H_2O_2 par mole d'enzyme, et s'effectue très rapidement.

En réalité, plusieurs états d'oxydation intermédiaires peuvent se manifester, mais le composé I constitue la véritable enzyme activée. Le composé I est le véritable facteur limitant, sa concentration détermine la vitesse de la réaction.

Les peroxydases sont des enzymes ferri-héminiques dans lesquelles le groupement prosthétique, et particulièrement le fer en position centrale de l'hème, participe aux échanges d'électrons de la réaction.

Un excès d' H_2O_2 entraîne l'obtention d'un état d'oxydation supérieur de l'enzyme; composé III oxyferreux.

L'activité des peroxydases peut se résumer de la façon suivante:

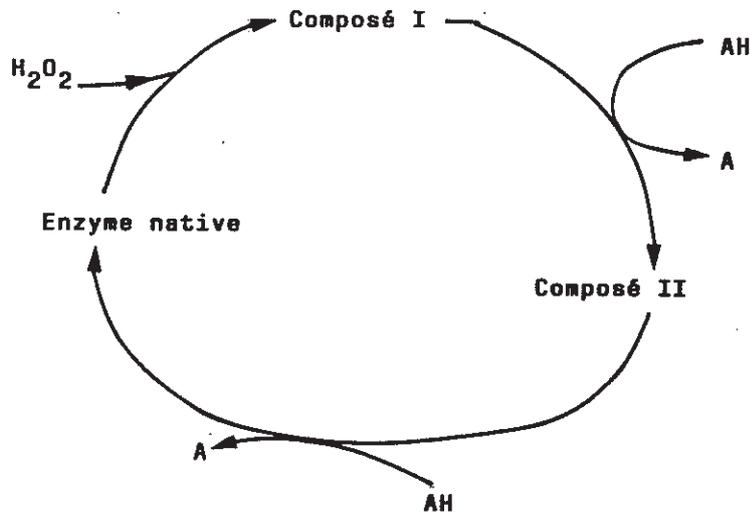


Figure 3

1.2.3. MESURE DES ACTIVITES PEROXYDASIQUES IN VITRO.

1.2.3.1. Mesure de l'activité prostaglandine-synthétase in vitro.

❶ Méthodes spectrométriques (10).

Les méthodes spectrométriques sont utilisées pour déterminer l'activité PGS totale ainsi que l'activité peroxydasique au sein du complexe PGS.

Suivant le schéma de fonctionnement des peroxydases, lors de la cyclisation oxydative des acides gras insaturés en C₂₀, un cosubstrat réducteur est oxydé. Ce donneur d'hydrogène peut donner naissance à un produit coloré, dont on suit l'apparition au spectrophotomètre.

Lorsque la réaction est déclenchée par H₂O₂ c'est l'activité peroxydasique seule qui est testée.

En revanche, en déclenchant la réaction avec de l'acide arachidonique, celui-ci subit d'abord une cyclisation oxydative qui libère un hydroperoxyde, lequel met en activité la peroxydase. L'activité mesurée est alors l'activité PGS totale.

② Mesure de l'activité cyclo-oxygénase.

La prostaglandine synthétase réalise la cyclisation d'acides gras inactivés à longue chaîne en fixant de l'oxygène moléculaire sur cette chaîne. Deux molécules d'oxygène sont consommées par molécule d'acide gras.

Il s'agit là de l'activité cyclo-oxygénase proprement dite: formation de la PGG₂ par incorporation de deux molécules d'O₂ sur l'acide arachidonique.

Cette activité enzymatique est évaluée en mesurant la consommation d'oxygène dissout dans le milieu réactionnel. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe.

1.2.3.2. Mesure de l'activité de la lactoperoxydase (9)(10).

Comme nous l'avons vu, la Lactoperoxydase (LPO) possède de grandes homologies de structure avec la peroxydase thyroïdienne (9) . elle est également capable de catalyser les mêmes réactions chimiques.

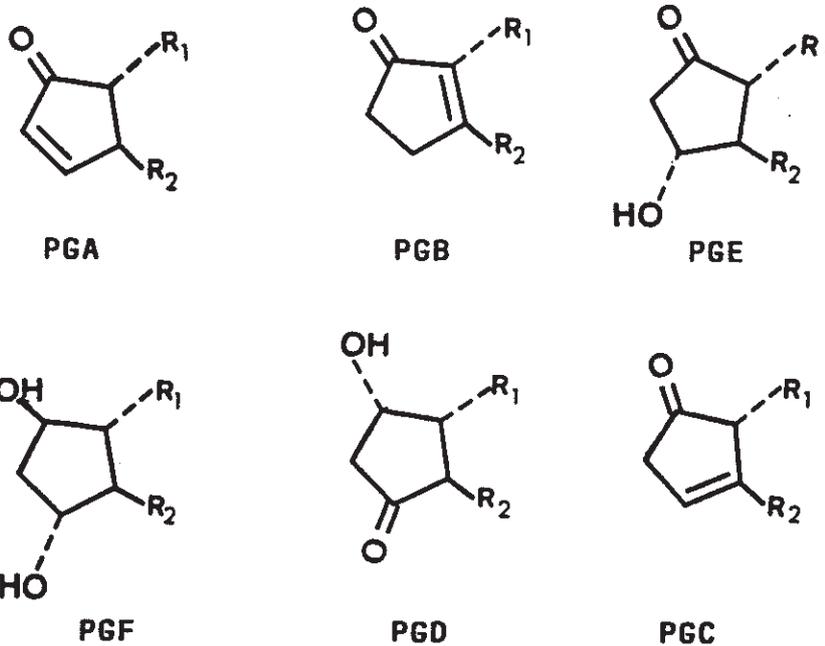
L'étude de l'influence de différentes molécules médicamenteuses sur la LPO constitue une bonne approche expérimentale de leur activité sur la peroxydase thyroïdienne.

L'étude de l'activité de la LPO se fait selon le protocole spectrophotométrique décrit plus haut concernant la PGS.

1.3. LES PROSTAGLANDINES (11)(12).

Du point de vue strictement chimique, les prostaglandines sont des acides carboxyliques en C₂₀ contenant un noyau cyclopentane oxygéné et deux chaînes aliphatiques parallèles insaturées.

Suivant la structure du noyau cyclopentane oxygéné, on distingue 6 familles de PG qui possèdent des activités biologiques variées et puissantes:



❶ Cellules sécrétant des prostaglandines.

Les prostaglandines sont produites par une majorité des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire, notamment les cellules mononucléées, macrophages et lymphocytes, et les plaquettes sanguines.

La membrane des macrophages est très riche en acide arachidonique. A l'état quiescent, les cellules macrophagiques ont une faible activité de synthèse. Au cours de l'inflammation, cette activité de synthèse augmente considérablement sous l'action de divers stimuli: phagocytose des bactéries, fragment Fc des Ig, lymphokines...

Les prostaglandines sont également synthétisées par les lymphocytes B et T dont elles inhibent les fonctions, notamment la mitogénèse.

Les plaquettes activées au cours de la phase d'initiation sécrètent plusieurs substances contenues dans différents types de granules. Parmi ces substances, l'acide arachidonique est à l'origine des prostaglandines et du thromboxane A_2 .

② Effets généraux des prostaglandines.

Les PG sont des substances extrêmement puissantes, souvent en quantité très faibles dans les tissus enflammés. Elles jouent un rôle important lors des réactions inflammatoires généralisées aussi bien que locales.

PGE_2 et PGI_2 augmentent nettement le flux vasculaire. La fièvre provoquée par un pyrogène a été associée à une augmentation de la concentration en $PGF_{2\alpha}$ dans le troisième ventricule.

Les prostaglandines interviennent également dans la douleur, provoquant une hyperalgésie durable pour PGE_2 et PGE_1 , courte mais intense pour PGF_2 . Les hydroperoxydes précurseurs des PGE ont ce même pouvoir.

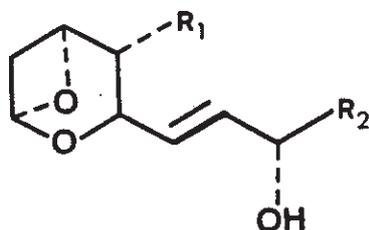
Les PG potentialisent également d'autres médiateurs de l'inflammation, notamment la bradykinine et l'histamine.

Les faits sont en réalité complexes et les effets varient suivant la molécule et les systèmes biologiques touchés. D'une manière générale, le mécanisme d'action des prostaglandines s'explique par une régulation des taux d'AMP-cyclique dans les cellules.

Outre leurs effets au cours de la réponse inflammatoire, les prostaglandines ont un champ d'action considérable; elles sont impliquées dans le fonctionnement et la régulation de nombreux autres systèmes: systèmes reproducteur, cardio-vasculaire, rénal, respiratoire, digestif. Elles ont également des effets hématologiques, endocriniens, oculaires, sur le métabolisme calcique...

Les prostaglandines peuvent également avoir un effet bénéfique utilisé en thérapeutique: sur la muqueuse gastrique, PGE_1 a un effet protecteur. L'abolition de la synthèse des PG par les anti-inflammatoires non stéroïdiens pourrait expliquer leur effet irritant voire ulcérogène.

1.4. LE THROMBOXANE A₂.



TXA₂

Le thromboxane A₂ est synthétisé à partir de la PGH₂ par l'intermédiaire de la thromboxane synthétase. Le thromboxane A₂ (TXA₂) est synthétisé par les polynucléaires activés, les mastocytes et les plaquettes sanguines.

Le TXA₂ est actif au niveau du muscle lisse où il réalise une bronchoconstriction et il induit également une vasoconstriction au niveau de la zone d'inflammation.

Mais sa principale activité est d'induire de façon puissante l'agrégation des plaquettes. Cette action est contrebalancée par l'activité anti-agrégante de la prostacycline PGI₂.

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine entraîne une inhibition de la synthèse de TXA₂ qui permettrait d'expliquer l'activité antiagrégante de ces AINS.

Au cours de la réaction inflammatoire interviennent également des radicaux libres: lors de la synthèse des endoperoxydes précurseurs des prostaglandines, et aux cours des phénomènes de phagocytose par les macrophages.

Leur étude sera développée plus loin.

2. MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE.

2.1. TEST IN VIVO: OEDEME A LA CARRAGENINE SUR LA PATTE DU RAT.

(13)(14)(15)(16)

2.1.1. Principe général.

Le test des médicaments anti-inflammatoires sur l'œdème induit par la carragénine dans la patte arrière du rat est préconisé depuis 1962 (14). L'injection sous-cutanée, dans le tissu plantaire, de cette substance (mucopolysaccharide extrait d'une algue du genre *Chondrus*), donne une réponse de type inflammatoire.

L'œdème provoqué par la carragénine montre deux phases (15) :

- la première phase débute immédiatement après l'injection de l'irritant et dure environ une heure: nous observons une rapide augmentation de volume de la patte, suivie d'une stagnation.

- à partir d'une heure après l'injection, on note une forte accélération de la formation de l'œdème qui se stabilise après la troisième heure. L'hydrocortisone et l'Indométacine, n'affectent pas le développement de la première phase, mais sont de puissants inhibiteurs de la seconde.

Les études menées par WILLIS (13) ont montré que dans les premières heures suivant l'injection, une très faible activité prostaglandine est mesurée. Après trois heures, la concentration en PG s'accroît graduellement jusqu'à un plateau obtenu en 18 à 24 heures.

La mise en évidence de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par l'aspirine et les anti-inflammatoires du même type permet d'expliquer leur inhibition sur l'œdème podal à la carragénine de la patte du rat.

2.1.2. Mode opératoire.

Les animaux utilisés sont des rats WISTAR privés d'eau et de nourriture durant l'expérimentation.

Le produit testé est administré aux animaux, 30 min avant l'injection de la carragénine, par intubation gastrique à raison d'1 ml de solution ou suspension aqueuse. Les rats témoins reçoivent 3 ml d'eau.

La carragénine est injectée à raison de 0,05 ml d'une solution à 1% dans du soluté physiologique stérile. Immédiatement après, le volume de la patte est mesuré, puis toutes les heures suivantes pendant 5 heures.

Le volume de la patte est mesuré à l'aide d'un plethysmomètre équipé d'un système de mesure permettant d'évaluer le volume de liquide déplacé, au centième de ml de précision.

L'oedème de la patte du à l'inflammation provoquée par l'injection atteint son maximum entre 3 et 5 heures et reste à l'état d'oedème pendant plusieurs heures. L'augmentation de volume au bout de 3 heures après l'injection est adoptée comme mesure effective.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée en pourcentage de réduction de l'oedème, par rapport aux animaux témoins ne recevant que de la carragénine.

2.2. TEST IN VITRO: DEGRADATION DU LIQUIDE SYNOVIAL.

2.2.1 PRINCIPE (17)(18)(19)(20)(21).

Le processus de dégradation du liquide synovial est lié à la présence de radicaux libres $O_2^{\bullet-}$. En effet, la dépolymérisation de l'acide hyaluronique, résultat de l'action de ces radicaux libres, se traduit par une perte de viscosité du liquide articulaire.

Des études menées par PUIG-PARRELLADA et PLANAS (21) ont montré une bonne corrélation entre les activités des anti-inflammatoires mesurées sur l'oedème de la carragénine de la patte du rat et leur pouvoir d'inhiber la perte de viscosité du liquide synovial.

Le pouvoir d'inhiber la dégradation du liquide synovial, de certaines molécules comme les anti-inflammatoires, serait alors lié à leur pouvoir de capter les radicaux libres.

2.2.2. MODE OPERATOIRE.

Le modèle expérimental de dégradation du liquide synovial utilise le système hypoxanthine/xanthine pour produire les radicaux libres nécessaires à la dégradation de ce liquide.

Le liquide synovial de boeuf est prélevé à l'abattoir par ponction intra-articulaire sur les pattes des animaux, immédiatement après l'abattage. Les éléments cellulaires sont éliminés par centrifugation (12 000 g pendant 60 minutes à 4 °C).

- Le tube témoin reçoit l'hypoxanthine sans xanthine oxydase et ne subira donc pas de dégradation.

- Le tube de référence reçoit l'hypoxanthine (0,5 ml d'une solution 10 mM) et la xanthine oxydase (0,10 U dans 0,05 ml) sans médicament. On obtiendra alors une dégradation maximale du liquide synovial.

- Les tubes tests sont mis à incuber avec le médicament et reçoivent l'hypoxanthine et la xanthine oxydase.

La viscosité relative du liquide articulaire est mesurée en enregistrant le temps (en secondes) nécessaire à un volume donné (0,7 ml) de liquide pour tomber par gravité, d'une seringue graduée verticale, à travers une aiguille de diamètre approprié.

La variation de viscosité est maximale entre le tube témoin et le tube de référence, et correspond à un temps en seconde appelé R. La variation de viscosité entre les tubes tests et le tube de référence est le reflet de l'activité du médicament sur le phénomène; cette variation est appelée X. Plus on s'éloigne du temps de référence, plus il y a inhibition.

On calcule alors un pourcentage d'inhibition selon la formule:

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{X}{R} \times 100$$

DEUXIEME PARTIE

1. AGREGATION PLAQUETTAIRE (22-27).

Les plaquettes sont des éléments du sang circulant intervenant dans les phénomènes de l'hémostase, processus permettant l'interruption du saignement dû à une lésion vasculaire.

Les plaquettes participent à l'hémostase primaire, réalisant le "clou plaquettaire" constitué de masses adhérentes de plaquettes qui s'accumulent au niveau de la lésion vasculaire. Ce clou plaquettaire est un élément clé du scellement hémostatique permettant le déclenchement des réactions de coagulation sanguine faisant intervenir les facteurs de coagulation plasmatiques.

1.1. MECANISMES DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE.

Les processus de l'agrégation plaquettaire sont des phénomènes actifs et contractiles qui nécessitent de l'énergie et du Ca^{2+} . On assiste à une série de phénomènes qui se développent progressivement en se chevauchant.

Le processus d'agrégation est conventionnellement divisé en quatre étapes:

- l'adhésion
- l'activation
- le release plaquettaire
- l'agrégation

1.1.1. L'adhésion.

Les plaquettes circulantes n'adhèrent pas entre elles ni à l'endothélium normal mais en cas de rupture de la tunique endothéliale, elles se fixent au collagène sous-endothélial exposé, réalisant ainsi l'adhésion plaquettaire. Ce phénomène est immédiat et irréversible in vivo.

1.1.2. L'activation.

Les plaquettes sont activées par des réactions déclenchées par le collagène et les premières traces de thrombine formée au niveau de la lésion.

Plusieurs agents physiologiques peuvent réagir avec des récepteurs spécifiques de la membrane plaquettaire, initiant ainsi la première activation puis l'agrégation:

- adénosine diphosphate (ADP) provenant d'une lésion des cellules endothéliales ou de l'hémolyse des hématies.

- adrénaline

- sérotonine

- thromboxane A₂

L'activation des plaquettes peut être réalisée selon trois voies parallèles; la voie de l'acide arachidonique, la voie de l'ADP et la voie du PAF-acéther.

● La voie de l'acide arachidonique:

L'interaction des plaquettes avec l'ADP, l'adrénaline, le collagène ou la thrombine à faible dose, entraîne la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Cette libération peut se faire selon deux voies enzymatiques parallèles:

- sous l'action d'une phospholipase C et d'une diglycérade lipase; un des phospholipides, le monophosphatidylinositol (MPI), libère l'acide arachidonique.

- la phospholipase A₂ qui libère directement l'acide arachidonique.

Dans les deux cas, l'acide arachidonique libéré peut subir l'action du complexe PGS pour aboutir à la formation du TXA₂ dans les plaquettes.

Le TXA₂ possède un pouvoir biologique intense: en tant que transporteur cytoplasmique du calcium, il augmenterait le taux de calcium libre dans le cytoplasme et provoquerait une

agrégation locale par le release des granulations et l'activation des plaquettes. C'est un puissant activateur des plaquettes qui antagonise les propriétés antiagrégantes de la PGI₂ endothéliale.

② La voie de l'adénosine diphosphate (ADP):

Born et ses collaborateurs (22) ont mis en évidence le fait que l'agrégation des plaquettes est produite par l'ADP à des concentrations de l'ordre de 10⁻⁷ M.

L'ADP est un inducteur spécifique car la courbe qu'il entraîne est biphasique. Les autres nucléotides de l'adénosine sont inactifs ou inhibent l'effet de l'ADP.

La fixation de l'ADP sur le récepteur correspondant induit une diminution du taux d'AMP-cyclique intraplaquettaire. La mobilisation du calcium membranaire modifie la forme des plaquettes. Il s'en suit une agrégation grâce à la conversion du fibrinogène par la thrombine.

③ La voie du PAF acéther:

Le PAF acéther, ou plus simplement le PAF, est le Platelet Activating Factor (facteur activateur des plaquettes). L'existence désormais reconnue de cette voie est due aux travaux de BENVENISTE (23).

En effet, en présence de composés inhibiteurs de la synthèse du TXA₂ et du système détruisant l'ADP sécrété, on observe tout de même une agrégation plaquettaire.

Le PAF, dérivé du glycérol, est un puissant inducteur de l'agrégation puisqu'il suffit d'une concentration de 1 mM pour déclencher le processus avec des plaquettes de lapin. Son effet est diminué par le plasma, mais comme le TXA₂, il semble qu'il soit plutôt sécrété à l'intérieur des plaquettes.

Le mécanisme d'action du PAF n'est pas encore complètement élucidé.

1.1.3. Le release plaquettaire.

Le release, ou sécrétion, est un processus actif et contractile. Le calcium intracellulaire de stockage a été mobilisé par l'activation. Il stimule les protéines contractiles plaquettaires, entraînant l'extrusion des granules vers la membrane plasmique. L'exocytose par fusion des membranes granulaires avec celles du système canaliculaire rejette le contenu des vésicules à l'extérieur.

Tout les inducteurs de sécrétion déclenchent la sécrétion des granules denses et des granules alpha.

- granules denses: ADP, ATP, calcium, pyrophosphate...
- granules alpha: fibrinogène, β thromboglobine, potassium ...
- enzymes lysosomiaux: modifient la perméabilité
- TXA₂ éventuellement.

1.1.4. Agrégation.

La membrane plaquettaire subit une réorganisation. La sécrétion de facteur V plaquettaire permet la formation de quantités croissantes de thrombine à la surface des plaquettes, qui transforme le fibrinogène en filaments de fibrine lesquels rayonnent autour des plaquettes et facilitent la fixation du clou plaquettaire à la lésion.

Un mécanisme intraplaquettaire entraîne la contraction de l'actinomyosine des plaquettes permettant la rétractation et la consolidation du clou plaquettaire qui se fixe plus efficacement à la lésion.

1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'ETUDE DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE.

1.2.1. Matériels et méthodes.

Cette méthode repose sur l'étude de l'agrégation de sang riche en plaquettes en présence de deux agents agrégants différents, d'une part le collagène dilué et d'autre part l'ADP, dont on a vu qu'ils étaient des facteurs déterminants dans le déclenchement des processus de l'agrégation.

L'agrégation est étudiée selon la méthode néphélométrique de Born et Crosss (22). Elle repose sur l'utilisation d'un agrégomètre. L'appareil utilisé est un agrégomètre double faisceau 500 VS distribué par Coultronic's couplé à un micro-ordinateur avec un logiciel d'exploitation d'agrégation MERAP.

Une source lumineuse éclaire, d'une part un tube renfermant du plasma riche en plaquettes (PRP) et d'autre part un tube contenant du plasma pauvre en plaquettes (PPP), maintenus tous les deux à 37°C sous agitation magnétique vigoureuse (1100 tr/mn). Une cellule photoélectrique reçoit la transmission lumineuse à la sortie des échantillons.

En l'absence d'inducteur de l'agrégation, l'opalescence plasmatique observée dans le PRP, due aux plaquettes en suspension, transmet un faible pourcentage du flux lumineux, comparativement à la lumière transmise par le PPP.

En présence d'un agoniste de l'agrégation, les plaquettes se groupent en amas, entraînant un éclaircissement du milieu et une augmentation de la transmission lumineuse. Cela se traduit grâce à l'enregistreur par une courbe d'agrégation.

Les courbes d'agrégation obtenues ont une allure générale différente selon l'inducteur utilisé: collagène ou ADP (figures 4 et 5).

En effet, dans le cas de l'ADP, et selon la dose d'inducteur utilisée, on obtient trois types de courbe dont l'une fait apparaître un phénomène de "double vague" qui nous intéresse:

- avec de fortes concentrations d'ADP, on obtient une courbe semblable à celles obtenues en présence de collagène. Il y a agrégation massive et irréversible due uniquement à l'ADP rajouté dans le tube de mesure.

- avec des concentrations faibles d'ADP, on obtient une agrégation faible et réversible.

- avec une concentration moyenne en ADP (voisine en générale de 2 μM) on obtient une courbe montrant un phénomène de double vague. La première vague d'agrégation est due à l'ADP ajouté dans le milieu; Une deuxième vague d'agrégation due à la libération de l'ADP intraplaquettaire.

1.2.2. Protocole expérimental.

- Préparation des PRP et PPP:

Le sang total est prélevé sur citrate de sodium à 3,8% (P/V) par ponction veineuse au pli du coude, chez des donneurs sains n'ayant absorbé aucun médicament depuis au moins une semaine.

Distribué dans des tubes de 20ml, le sang est centrifugé à 1000 tr/mn pendant 10 mn à 20°C. Le PRP surnageant est prélevé et conservé à la température de la pièce dans des tubes de polystyrène de 10 ml jusqu'à utilisation (1 à 2 h maximum après le prélèvement).

Le PPP s'obtient en centrifugeant le culot de la première centrifugation pendant 15 min. à 400 trs/mn au maximum, afin de ne pas détruire les globules rouges ce qui entraînerait la



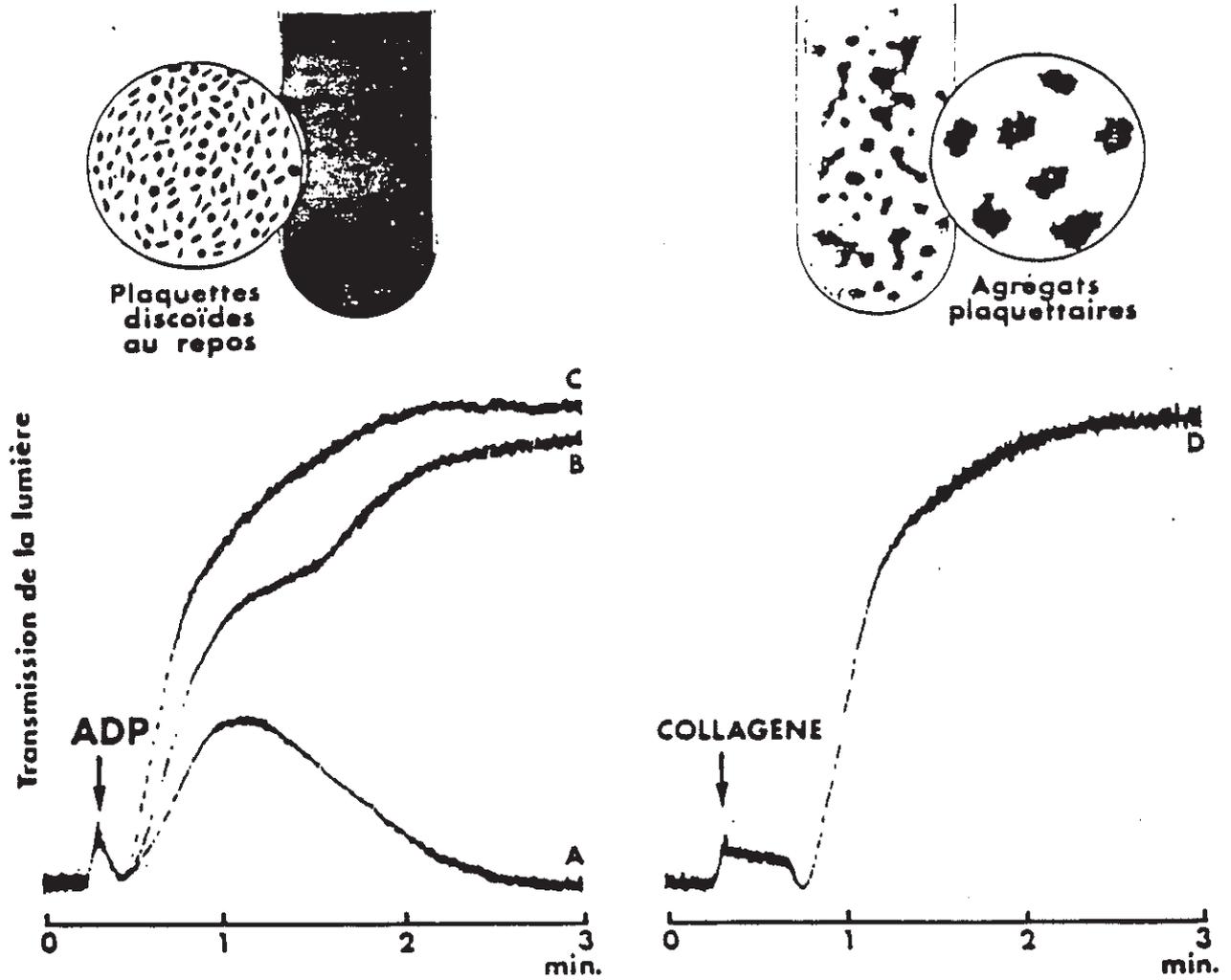


Fig. 4

Fig. 5

Figures 4 et 5 : Mesure de l'agrégation plaquettaire.

L'agrégation des plaquettes humaines en plasma citraté (PRP) est étudiée par la mesure continue dans un agrégomètre des changements de la transmission d'un faisceau de lumière au travers du PRP après addition d'un stimulus (1). L'addition d'une faible dose d'ADP ($1 \mu M$) entraîne le changement de forme des plaquettes puis leur agrégation réversible, sans sécrétion (A). L'addition d'une plus forte dose d'ADP ($2,5 \mu M$) s'accompagne, après la première phase d'agrégation, d'une deuxième vague qui correspond à la formation de thromboxane A_2 et à la sécrétion du contenu des granules plaquettaire (B). Cette deuxième vague est inhibée par l'aspirine. A une concentration d'ADP de $5 \mu M$, les 2 vagues sont fusionnées et l'agrégation qui s'accompagne de formation de thromboxane A_2 et de sécrétion est irréversible (C). L'addition de fibres de collagène au PRP (D), entraîne l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène, puis après un temps de latence le changement de forme, puis l'agrégation qui s'accompagne de formation de thromboxane A_2 et de la sécrétion plaquettaire.

D'après LAGORCE

libération d'inducteurs contenus dans les hématies et pourrait provoquer des perturbations dans l'agrégation plaquettaire.

- Cas du collagène dilué:

On introduit dans un tube de mesure, 450 μl de PRP, 3 μl de solution dans le DMSO du composé étudié (de concentration variable) et 37 μl de tampon TRIS 0,05M pH=7. Après une minute d'incubation, on ajoute 20 μl de solution de collagène à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$. On mesure l'agrégation plaquettaire par la détermination de la hauteur de la courbe au bout de 6mn.

- Cas de l'ADP:

On place sous agitation magnétique 340 μl de PRP à 37°C dans l'agrégomètre. Le composé à étudier, solubilisé dans le DMSO, est introduit dans le milieu (3 μl à différentes concentrations) en présence de 37 μl de tampon TRIS 0,05M pH=7. Après 1 mn d'incubation, on ajoute 20 μl de solution d'ADP (à la concentration nécessaire préalablement déterminée pour provoquer un phénomène de double vague, dans un tube témoin contenant 340 μl de PRP et 3 μl de DMSO pur). La hauteur de la courbe d'agrégation obtenue est mesurée 90 secondes puis 6 mn après l'addition de l'inducteur. ces deux paramètres correspondant respectivement aux deux phases de l'agrégation induite par l'ADP.

1.2.3. Expression des résultats.

Parallèlement aux molécules testées, nous avons étudié, dans les mêmes conditions opératoires, une substance de référence connue pour ses propriétés antiagrégantes plaquettaires: l'aspirine.

Pour chaque concentration de produit essayé, on calcule l'activité antiagrégante plaquettaire d'après la relation:

$$I = \frac{100 \cdot hx}{ht}$$

où I = pourcentage d'inhibition de l'agrégation.

hx = hauteur de la courbe obtenue avec le composé témoin.

ht = hauteur de la courbe obtenue avec le témoin (PRP contenant 3 µl de DMSO pur).

Pour chaque produit on établit une courbe d'activité de la forme suivante: pourcentage d'inhibition de l'agrégation plaquettaire en fonction du logarithme de la concentration finale de produit étudié dans le milieu exprimée en mM .

Les résultats sont exprimés de deux façons:

- Par la CI₅₀ , concentration entraînant 50% d'inhibition de l'agrégation.
- Par le coefficient d'activité du produit par rapport à la substance de référence

$$\frac{CI_{50} \text{ aspirine}}{CI_{50} \text{ composé étudié}}$$

Concernant les phénothiazines que nous avons étudiées, les résultats sont regroupés dans la troisième partie.

2. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₂.

Comme nous l'avons vu précédemment, les prostaglandines dérivent de l'acide arachidonique par la voie de la cyclo-oxygénase. La prostaglandine E₂ est formée à partir de la prostaglandine H₂ par l'action d'une isomérase spécifique.

La PGE₂ a été décrite comme étant le métabolite prédominant de l'acide arachidonique dans le rein de nombreuses espèces. Elle est également produite par les macrophages et peut être le médiateur de certains effets des macrophages sur les cellules voisines. Elle influence l'état fonctionnel du macrophage lui-même.

Nous nous proposons donc de doser la PGE₂ par l'iode ¹²⁵I en utilisant le kit de dosage commercialisé par AMERSHAM.

2.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE.

Il s'agit d'un dosage radioimmunologique (RIA) basé sur la compétition entre la prostaglandine E₂ non marquée et une quantité fixe de prostaglandine E₂ marquée à l'iode ¹²⁵I pour un nombre de sites de fixation d'un anticorps spécifique aux prostaglandines.

La quantité de ligand radioactif fixée par l'anticorps sera inversement proportionnelle à la concentration de ligand non radioactif ajouté. La mesure de la radioactivité fixée sur l'anticorps permet de déterminer la quantité de prostaglandine E₂ non marquée, présente dans l'échantillon.

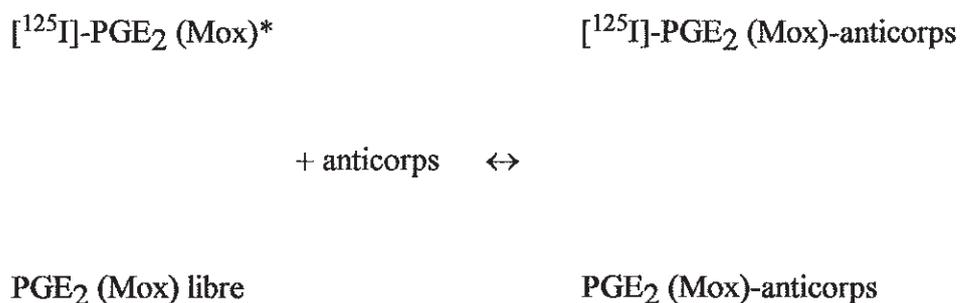
La séparation de la prostaglandine E₂ fixée à l'anticorps et du ligand libre est réalisée par l'adsorption de la fraction liée sur le réactif AMERLEX-M, contenant un second anticorps de singe anti-lapin fixé sur des particules de polymères magnétiques.

La séparation peut être réalisée soit par l'application d'un champ magnétique, soit par centrifugation, suivie de décantation du surnageant. La mesure de la radioactivité dans le culot quantifie le taux de ligand fixé par l'anticorps. La concentration de prostaglandine E₂ est alors déterminée par extrapolation à partir d'une courbe standard.

Le technique est basée sur la conversion de la prostaglandine E₂ en un dérivé méthyl-oximate par l'hydrochloride méthoxyamine . La technique utilise alors la compétition entre la méthyl-oximate prostaglandine E₂ non marquée et une quantité fixée de prostaglandine E₂ marquée à l'iode ¹²⁵I (dérivé méthyl oximate) pour un anticorps spécifique aux méthyl oximate prostaglandine E₂.

Les bases de la technique peuvent être illustrées par la réaction suivante:

(Mox = méthyl oximate)



2.2. EXPRESSION DES RESULTATS.

La concentration des prostaglandines dosée dans les échantillons biologiques est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec les standards correspondants et construite sur un papier semi-logarithmique; La valeur %B/Bo est portée sur l'axe des ordonnées et les concentrations en PGE₂ (µg/tube) sur l'axe des abscisses .

B = standard - NSB en cpm.

Bo = zéro standard - NSB en cpm.

NSB = site de liaison non spécifique (non specific bound)

$$\%B/Bo = \frac{\text{standard } (\mu\text{g/tube}) - \text{NSB}}{Bo - \text{NSB}}$$

On effectue les mêmes calculs pour les phénothiazines que nous avons testées en remplaçant la valeur du standard par la valeur du composé dans la formule ci-dessus.

A partir de la courbe d'étalonnage, on obtient les quantités correspondantes en PGE₂ en pg/tube. Le calcul du pourcentage d'inhibition se fait par la formule:

$$\frac{\text{quantité de PGE}_2 \text{ dans le tube témoin} - \text{quantité de PGE}_2 \text{ dans le tube du composé}}{\text{quantité de PGE}_2 \text{ dans le tube témoin}} \times 100$$

3. RADICAUX LIBRES (28-39).

3.1. GENERALITES - DEFINITION (28-31).

Les radicaux libres constituent un domaine d'étude relativement récent qui connaît de nos jours un regain d'intérêt considérable. Les industries alimentaire, cosmétique et des matières plastiques se préoccupent de ce domaine chimique dans des buts variés mais les radicaux libres intéressent également de nombreux biologistes et médecins car ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies ayant, pour la plupart, un rapport avec le vieillissement.

Nous citerons quelques domaines où sont impliqués les radicaux libres:

- Cardiologie: phénomènes d'ischémie-reperfusion du myocarde, athérosclérose, hyperagrégabilité plaquettaire, vasospasme cérébral..
- Neurologie: maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson..
- Cancérologie
- Ophtalmologie: cataracte, dégénérescence rétinienne .
- Maladies auto-immunes: thyroïdite de Hashimoto, polyarthrite rhumatoïde..

Un radical libre est une espèce chimique (molécule ou atome), neutre ou chargée, dont la couche périphérique contient un électron non couplé, dit célibataire.

La présence de cet électron célibataire, confère au radical libre une grande instabilité et une extrême réactivité. Pour retrouver la stabilité, les radicaux libres tendent à ne plus avoir d'électron célibataire dans leur cortège électronique. Ce résultat peut être atteint:

- Soit par perte d'un électron; le radical est alors réducteur comme $\text{RCOO}^{\bullet-}$.
- Soit par gain d'un électron; le radical est alors oxydant comme OH^{\bullet} .

Un radical libre peut naître à partir de tout atome, soit par gain d'un électron générant un radical chargé négativement, soit par perte d'un de ses électrons avec création d'un radical chargé positivement.

Les formes chimiques des radicaux libres sont nombreuses mais ce sont les radicaux libres oxygénés qui sont les plus importants et les plus toxiques.

3.2. RADICAUX LIBRES OXYGENES.

Parmi les radicaux libres oxygénés, on distingue les formes actives de l'oxygène, molécules de petite taille non carbonées et les radicaux libres oxygénés proprement dits, molécules de plus grande taille.

3.2.1. Formes actives de l'oxygène.

a) L'anion radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$

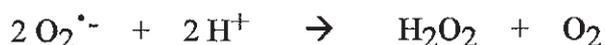
Il s'agit d'un monoradical chargé négativement. Il provient de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron (e^-).



Cette réaction nécessite un apport énergétique qui se fait essentiellement de façon enzymatique:

- par la NADPH oxydase lors de la phagocytose.
- par la cytochrome oxydase mitochondriale au cours de la respiration cellulaire.
- par la xanthine oxydase et le cytochrome P₄₅₀ dans les réactions de détoxication.

L'anion $O_2^{\bullet-}$ est relativement peu réactif. En présence d'ions H^+ , l'anion superoxyde subit une réaction de dismutation conduisant à la formation d'oxygène moléculaire et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Il s'agit d'un processus d'oxydo-réduction entre molécules de même nature dont l'une s'oxyde et l'autre est réduite:



L'effet toxique de $O_2^{\bullet-}$ peut s'exercer in vitro indirectement car, en présence de H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ serait le précurseur du radical hydroxyle OH^{\bullet} par la réaction dite d'Haber-Weiss.

b) Le peroxyde d'hydrogène.

H_2O_2 peut être formé secondairement à la dismutation de $O_2^{\bullet-}$. Il peut également être produit à partir de l'eau sous l'action de radiations ionisantes apportant l'énergie nécessaire.

H_2O_2 n'est pas un radical libre mais il est très réactif et possède un fort pouvoir oxydant.

En présence d'ions ferreux Fe^{2+} , il se décompose en ions OH^- et en radical hydroxyle OH^{\bullet} selon la réaction dite de Fenton. De même, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ selon la réaction d'Haber Weiss énoncée précédemment:



c) Le radical hydroxyle OH^{\bullet}

OH^{\bullet} est le plus instable des radicaux libres oxygénés car il est le plus réactif. Il peut être produit par les réactions décrites plus haut, mais également directement ou indirectement par l'action de différents polluants comme l'amiante, CCl_4 , le paraquat... et la cigarette.

La décomposition de l'eau sous l'action de radiations ionisantes peut également conduire à la production de radicaux hydroxyles.

La réactivité d' OH^\bullet est très nettement supérieure à celle de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Il réagit sur les lipides, les protéines, l'ADN et les oses, causant des dommages multiples. Son action destructrice s'exerce en particulier au niveau des structures membranaires, faisant intervenir les radicaux peroxy ROO^\bullet .

3.2.2. Radicaux libres oxygénés.

Il s'agit essentiellement des radicaux alcooxy RO^\bullet et peroxy ROO^\bullet .

Ils sont produits en majeure partie à partir des acides gras insaturés comme l'acide arachidonique. Il s'agit, là encore, de formes radicalaires instables et extrêmement réactives.

Les radicaux libres ROO^\bullet sont impliqués dans la désorganisation des membranes cellulaires par l'attaque d'un radical hydroxyle. l'attaque d'un acide gras par OH^\bullet entraîne la formation d'un radical peroxy lui même à la recherche d'un électron stabilisateur.

Le radical ROO^\bullet va chercher à se stabiliser en arrachant à son tour un hydrogène à une autre molécule d'acide gras. Il se met alors en place une réaction en chaîne de peroxydation lipidique entraînant une désorganisation totale de la membrane cellulaire (figure 6).

Cette réaction en chaîne est caractérisée par:

- une phase d'initiation
- une phase de propagation
- une phase de terminaison

La réaction s'arrête lorsque deux radicaux libres interagissent, créant entre eux deux ponts.

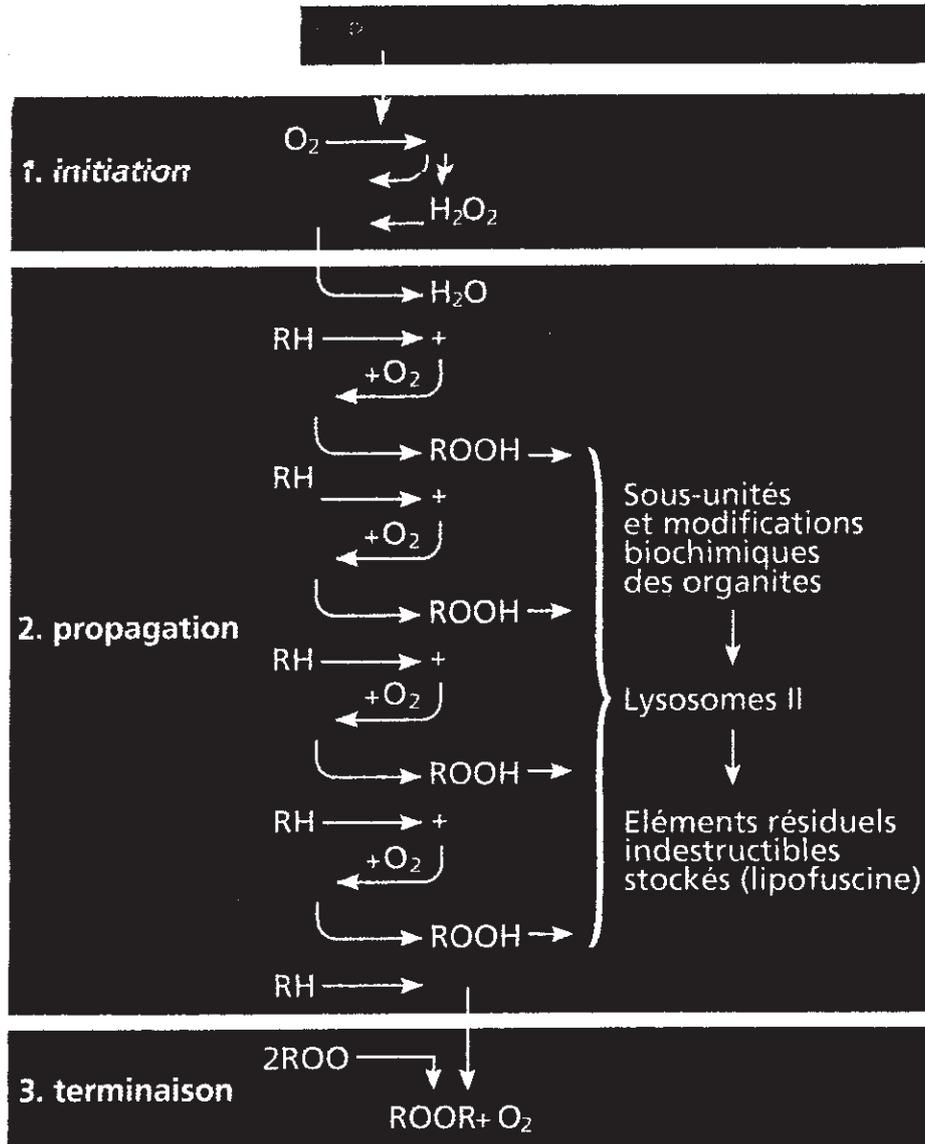


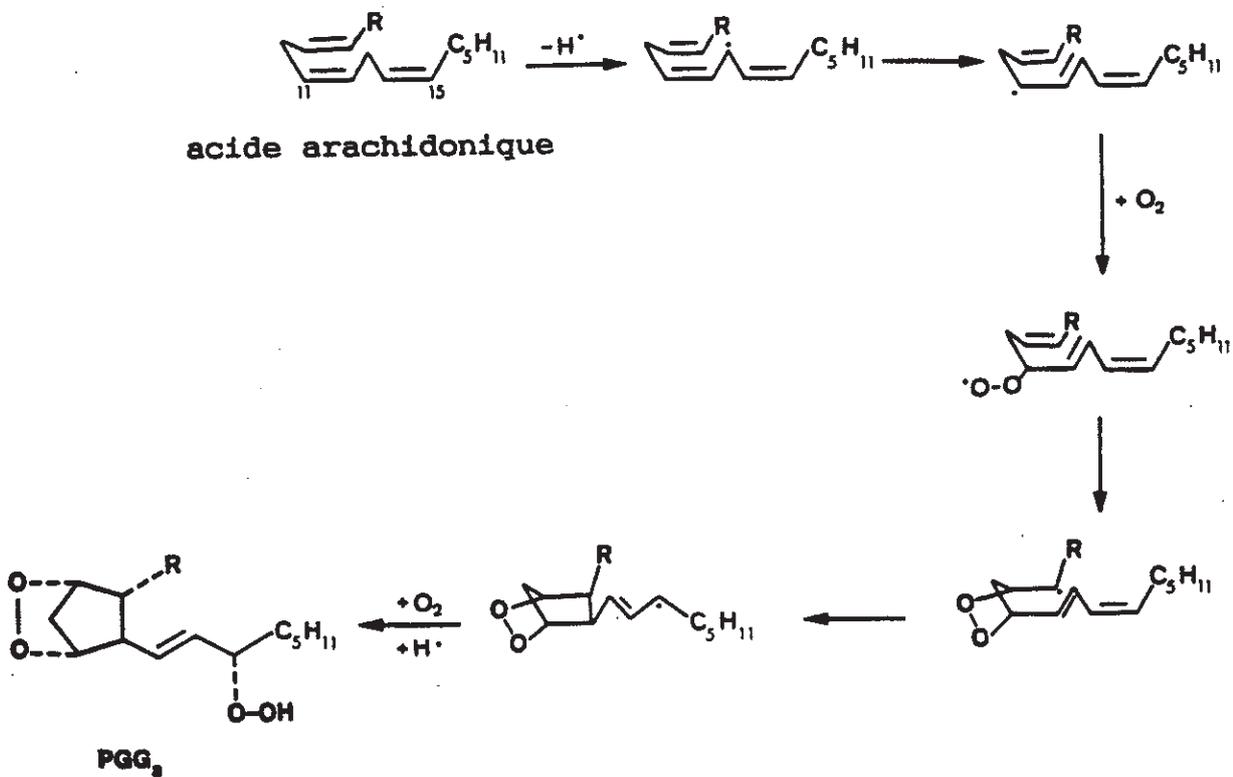
Figure 6: Réaction en chaîne de lipidoperoxydation membranaire.

3.3. RADICAUX LIBRES ET INFLAMMATION (33)(35).

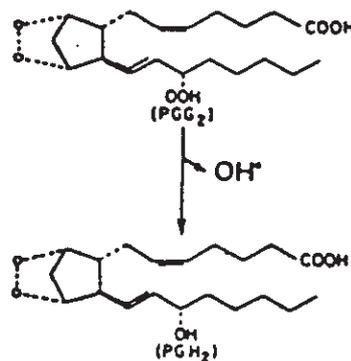
3.3.1. Intervention des radicaux libres au cours du métabolisme de l'acide arachidonique.

Lors de la métabolisation de l'acide arachidonique par l'action de la prostaglandine synthétase, des intermédiaires radicaux libres assurent une extension rapide de la réaction

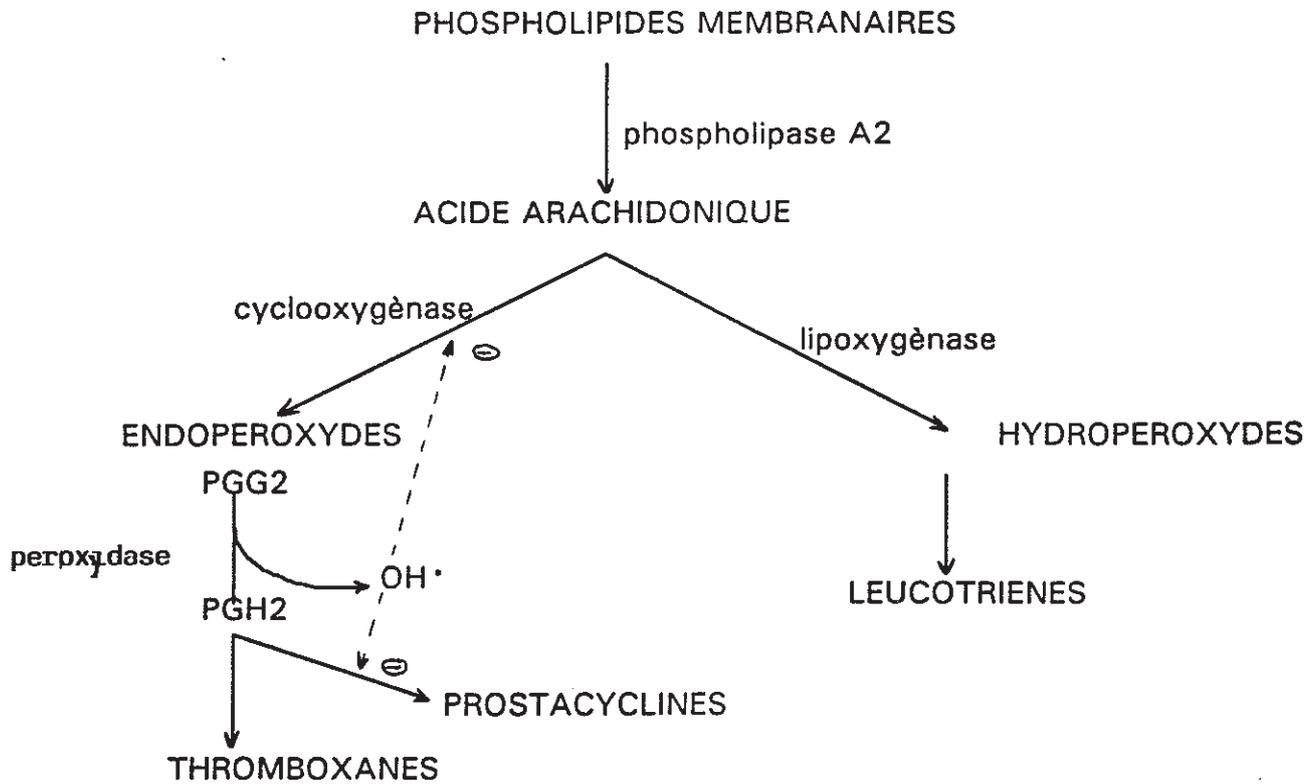
Le mécanisme suivant peut être proposé:



De plus, les radicaux hydroxyles OH^\bullet sont produits au cours de la transformation de la PGG₂ en PGH₂ par l'intermédiaire de l'activité peroxydase du complexe prostaglandine synthétase:



Ces radicaux hydroxyles formés interviendraient secondairement sur le métabolisme de l'acide arachidonique en inhibant la cyclo-oxygénase et en privilégiant la voie du thromboxane TXA_2 pro-agrégant sur celle de la prostacycline PGI_2 anti agrégante.

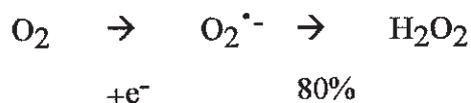


3.3.2. La phagocytose (figure 7 et 8).

Comme nous l'avons vu, au cours de la phase d'amplification de la réaction inflammatoire, interviennent des cellules phagocytaires chargées d'éliminer les corps étrangers ainsi que les débris cellulaires et macromoléculaires de différentes natures.

Dès la stimulation du processus phagocytaire, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages passent d'un état quiescent à une phase d'hyperactivité métabolique. Cette phase est appelée "poussée d'activité respiratoire" (respiratory burn) car la consommation d'oxygène est multipliée par 10 ou 20. Cette augmentation de consommation d' O_2 est essentiellement liée à la synthèse de radicaux libres superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$ microbicides et cytotoxiques.

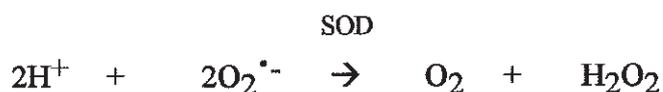
❶ La réaction primaire: formation de $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2



La quantité de peroxyde d'hydrogène formée est parallèle à celle d' $O_2^{\bullet-}$ consommée.

Deux systèmes enzymatiques sont susceptibles de catalyser la formation des radicaux superoxydes: la NADH oxydase et la NADPH oxydase (ayant un rôle prépondérant). Le NADPH étant régénéré par une augmentation du cycle des pentoses phosphate au sein de la cellule phagocytaire.

A l'intérieur de la cellule, la superoxyde dismutase (SOD) préviendrait les effets toxiques de $O_2^{\bullet-}$ sur la cellule elle même:

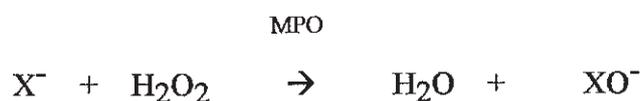


Un système de protection cytoplasmique contre la toxicité des radicaux superoxyde et du peroxyde d'hydrogène fait intervenir d'autres systèmes enzymatiques: catalases et surtout peroxydases (glutathion peroxydase et myéloperoxydase).

❷ Dérivés secondaires:

Le radical OH^{\bullet} et l'oxygène singulet 1O_2 dérivent directement d' H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ selon la réaction d'Haber-Weiss.

L'activité microbicide peut s'exercer directement par ces radicaux libres mais la cellule phagocytaire utilise principalement la myéloperoxydase, H_2O_2 et un halogénure X^- (iodure, chlorure, bromure..)



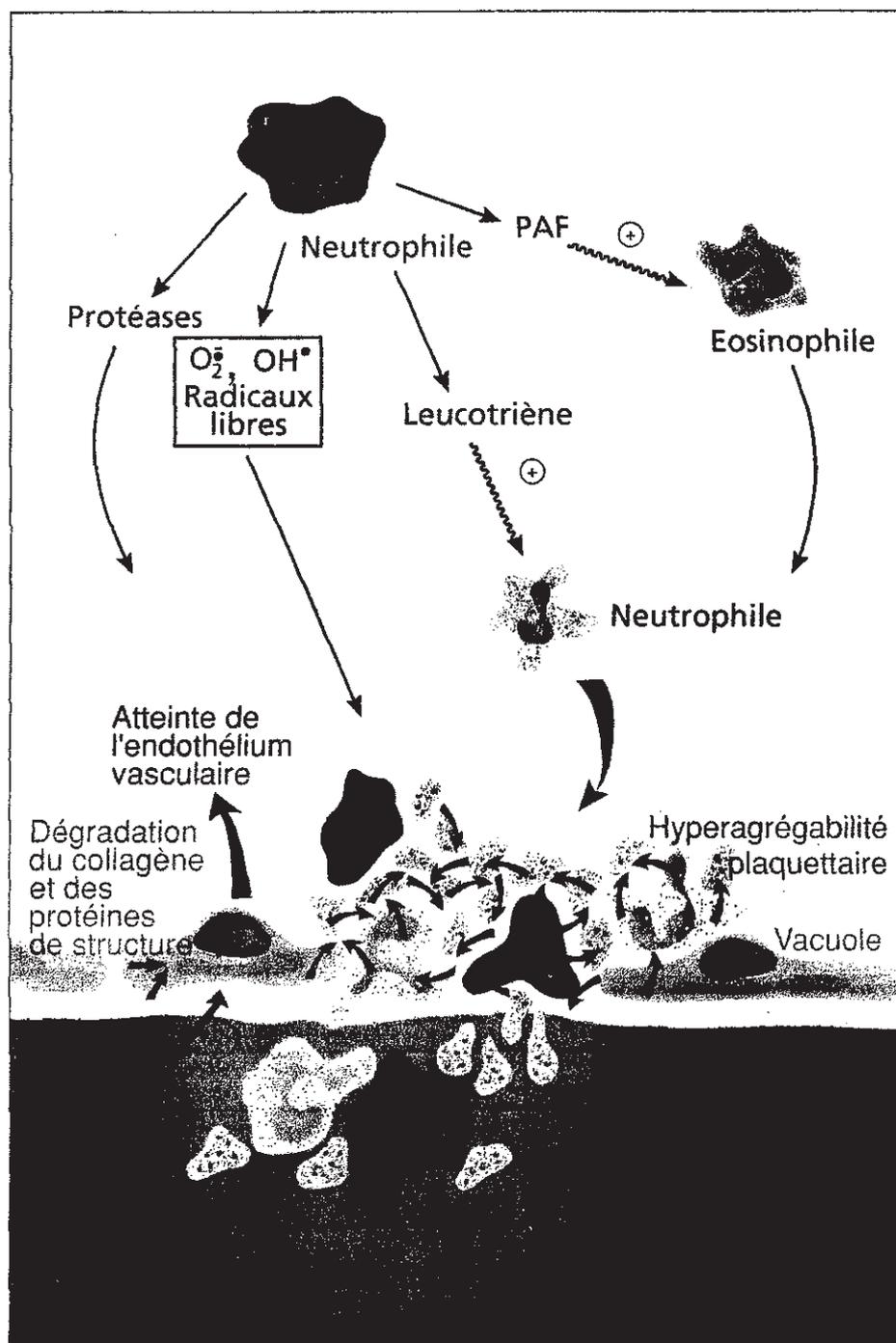


Figure 7: Réaction inflammatoire - conséquences de la libération des radicaux libres.

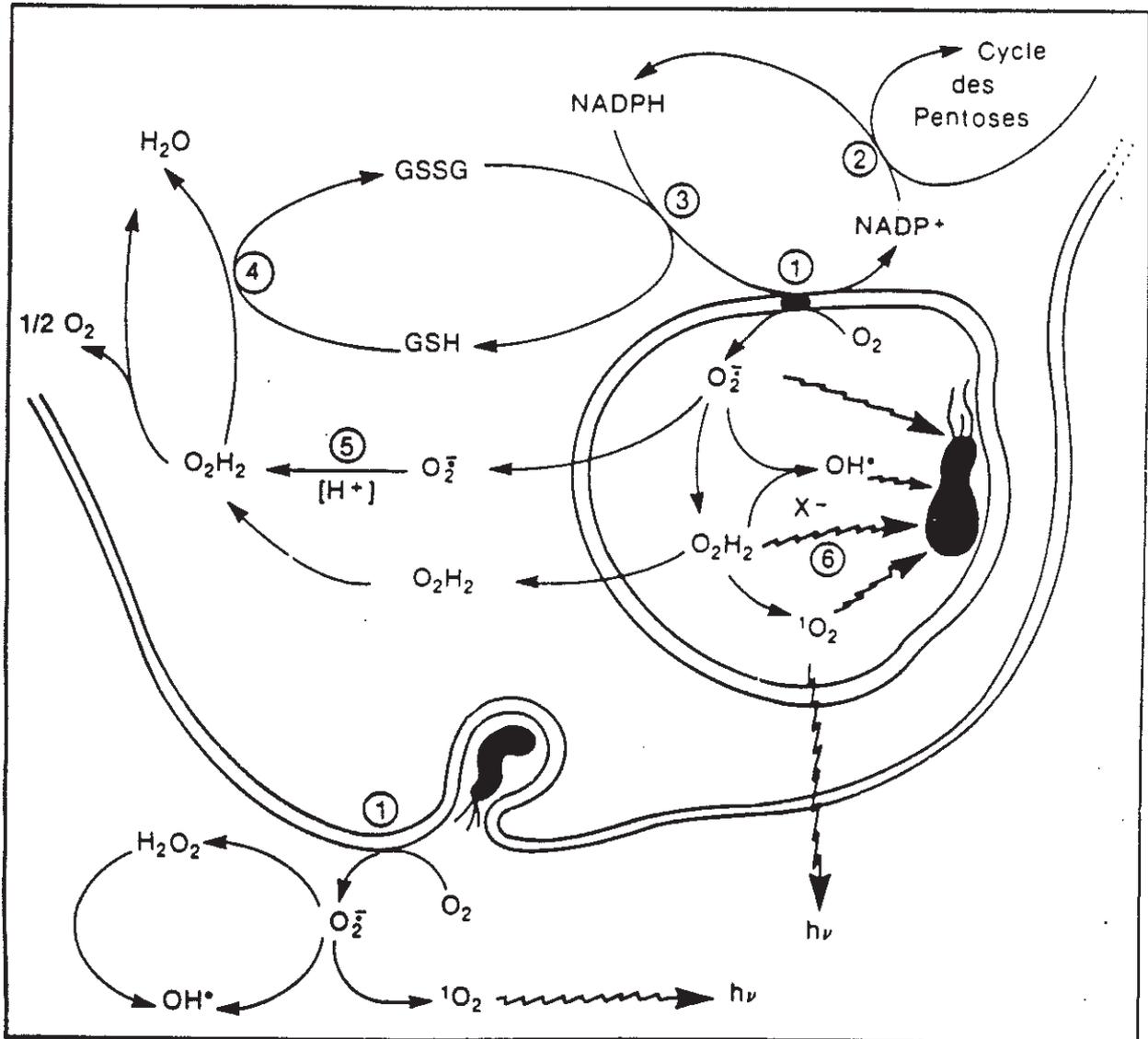


Figure 8: Représentation des lieux de synthèse et d'action des dérivés superoxydes et des mécanismes cytoplasmiques de protection par la glutathion peroxydase et la superoxyde-dismutase (SOD)

- 1) NADPH Oxidase
- 2) Glucose-6-P-déshydrogénase (G_6PDase)
- 3) Glutathion réductase
- 4) Glutathion peroxydase
- 5) Superoxyde-dismutase (SOD)
- 6) MPO : myéloperoxydase

L'abondance du chlore lui confère un rôle quantitativement plus important que l'iode et intrinsèquement plus efficace. La captation et la déiodination des hormones thyroïdiennes sont fortement accrues dans les phagocytes activés, permettant l'utilisation de l'iode comme agent microbicide.

Les hypohalogénures XO^- seraient capables d'halogéner les membranes bactériennes et les déstabiliseraient, mais l'action microbicide pourrait être liée à la formation de l'oxygène singulet.

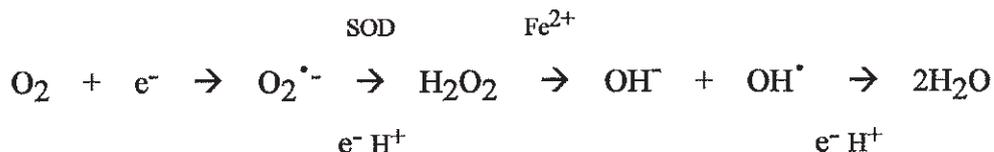


L'oxygène singulet peut entraîner, comme OH^\bullet la peroxydation des lipides membranaires de diverses cellules.

3.4. AUTRE IMPLICATION DES RADICAUX LIBRES IN VIVO.

La production de radicaux libres peut intervenir dans d'autres phénomènes physiologiques que la phagocytose. Nous citerons ici la production de radicaux libres au sein de la mitochondrie lors de la respiration cellulaire.

Les réactions biochimiques constituant la respiration cellulaire comportent une réduction de l'oxygène moléculaire conduisant à la formation d'eau. Au cours de cette réaction, les électrons sont déplacés par paire, mais pour une faible part, environ 5%, l'oxygène fait l'objet d'une réduction partielle monovalente avec production de radicaux superoxydes, de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyles.



3.5. SYSTEMES DE PROTECTION CONTRE LES RADICAUX LIBRES.

L'organisme possède des systèmes de défense contre la toxicité des radicaux libres. Ces moyens de défense sont de natures variées et peuvent être séparés en deux catégories:

- les systèmes enzymatiques.
- Les systèmes non enzymatiques.

3.5.1. Les systèmes de défense enzymatiques.

Les enzymes peuvent utiliser deux substrats différents: les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène.

● Enzymes de destruction des superoxydes:

- Les superoxydes dismutases (SOD).

Les superoxydes dismutases sont des métallo-enzymes contenant selon le cas, du fer, du cuivre, du manganèse ou du zinc.

Elles transforment le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en eau oxygénée et en oxygène moléculaire sans consommer ni énergie ni cofacteur. La réaction de dismutation de $O_2^{\cdot-}$ peut se produire spontanément à pH=7, mais elle est multipliée par un facteur 10 en présence de SOD.

A l'heure actuelle, trois types de SOD sont connues:

- les SOD type Cu-Zn (plasma)
- les SOD à Mn (bactéries, mitochondries)
- les SOD à Fe (périplasma des bactéries)

Leur mode d'action est similaire; le métal du site actif participe aux phénomènes d'oxydoréduction de la réaction. Il est oxydé ou réduit lors de sa rencontre avec l'anion

superoxyde. Pour les SOD à Fe par exemple, le métal oscille entre les états d'oxydation +II et +III.

- La ceruloplasmine

Il s'agit d'une protéine sérique jouant un rôle dans l'inflammation. Elle peut également catalyser la dismutation de l'ion superoxyde mais avec moins d'efficacité que les SOD.

- L'indolamine-2,3 dioxygénase.

Cette enzyme utilise l'anion superoxyde pour oxyder le tryptophane en formyl-cynurénine, dans le cytosol des kératinocytes.

❶ **Enzymes de destruction des peroxydes.**

Comme nous l'avons dit, le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre, mais il est très réactif et donne, notamment, très facilement des radicaux hydroxyles (responsables de peroxydation lipidique). La cellule dispose de plusieurs moyens de l'éliminer.

- Les peroxydases.

Nous ne reviendrons pas sur le principe de fonctionnement de ces enzymes, mais nous citerons cependant différentes peroxydases que nous n'avons pas abordées dans la première partie.

Les glutathion peroxydases à sélénium:

Ce sont des enzymes cytosoliques et intramitochondriales qui sont constituées par quatre sous unités identiques contenant chacune un atome de sélénium. Au cours du fonctionnement de l'enzyme, le sélénium passe par plusieurs degrés d'oxydation différents.

Cette enzyme dégrade la plus grande partie du peroxyde d'hydrogène en le transformant en présence de glutathion réduit (GSH), en eau et en glutathion oxydé.



Les glutathion transférases:

Ces enzymes ont un rôle de détoxification d'un grand nombre de composés électrophiles (médicament, agents cancérigènes).

Elles ont également une activité peroxydasique mais vis-à-vis des peroxydes organiques uniquement; elles n'agissent pas sur H_2O_2 .

La thiorédoxine réductase:

Cette enzyme est localisée au niveau des membranes des cellules épidermiques. Elle semble active sur le peroxyde d'hydrogène et sur l'anion superoxyde.

3.5.2. Les systèmes de défense non enzymatiques.

Si l'activité enzymatique est insuffisante, les ions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène s'accumulent, entraînant des peroxydations en chaîne des lipides membranaires. L'organisme ne possède pas de système enzymatique capable de dégrader les radicaux peroxy et alcooxy formés au cours des réactions de lipoperoxydation. Il existe cependant des molécules dites piègeuses de radicaux libres capables d'atténuer ou de stopper ces réactions en chaîne. Ces molécules sont dites "SCAVENGER" ou "QUENCHER".

Les "SAVENGERS" (terme anglais signifiant nettoyeur) sont des molécules facilement oxydables présentes dans le cytosol (glutathion, acide ascorbique..) ou dans les membranes cellulaires (α -tocophérol, vitamine A..) et qui forment avec les radicaux libres très réactifs des composés stables.

Les "QUENCHERS" (amortisseurs) neutralisent l'oxygène singulet. C'est une des activités de la vitamine E.

- Les caroténoïdes et la vitamine A:

Il s'agit de composés liposolubles (provitamines) apportés par l'alimentation. Le système de doubles liaisons conjuguées présent dans ces molécules leur confère une importante activité antioxydante. Ils piègent l'oxygène singulet, inactivent les radicaux libres et inhibent la lipoperoxydation. Ils remplissent cette fonction au niveau de la peau où ils se montrent photoprotecteurs.

- L'acide ascorbique (Vit.C)

La vitamine C a un rôle de vecteur d'hydrogène. C'est un puissant agent réducteur qui réagit avec l'ion superoxyde, le radical hydroxyle, les radicaux peroxy ainsi que les radicaux thiyls et tocopheryls. Son action reste cependant assez controversée quand à son effet protecteur vis-à-vis de la toxicité de l'oxygène. Son emploi en tant qu'antioxydant reste limité.

- Le glutathion

Il agit comme cofacteur d'un grand nombre d'enzymes antioxydantes mais il peut exercer une action directe contre les radicaux libres avec formation d'un radical GS[•] qui n'est pas inerte mais reste beaucoup moins réactif que le radical OH[•].

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des antioxydants d'origine végétale, largement représentés en thérapeutique en tant que vasculoprotecteurs et veinotoniques. Ils libèrent spontanément un atome d'hydrogène au contact d'un radical libre pour le neutraliser.

- La vitamine E ou α -tocophérol.

La vitamine E est présente dans la double couche phospholipidique des membranes cellulaires et mitochondriales, ainsi que dans les lipoprotéines. son rôle antioxydant est connu depuis longtemps puisqu'elle est utilisée comme additif alimentaire (E306, E307, E308, E309) pour éviter le rancissement des graisses insaturées.

Elle agit en bloquant la lipidoperoxydation en chaîne en bloquant les radicaux peroxy à l'endroit même de leur formation pour donner un radical tocopheryl plus stable et de faible réactivité. Elle réagit également avec l'oxygène moléculaire, $O_2^{\bullet -}$ et OH^{\bullet} .

3.7. MOYEN D'ETUDE DES RADICAUX LIBRES.

3.7.1. Spectrométrie par resonance paramagnétique électronique (RPE).

La RPE, découverte en 1945 par Zavoïsky, concerne les molécules ou ions possédant au moins un électron non apparié. Il s'agit d'une technique spectroscopique qui consiste à mesurer l'absorption d'une onde électromagnétique traversant un échantillon soumis à un champ magnétique.

On observe ainsi les propriétés des électrons célibataires. Ceci n'est observé que dans trois cas:

- les semi conducteurs.
- les ions des éléments de transition.
- les radicaux libres.

L'électron est un corpuscule chargé électriquement, qui par un mouvement de rotation sur lui-même induit un champ magnétique appelé "spin".

Ce spin est associé à un nombre quantique m_s appelé nombre quantique de spin qui ne peut prendre que deux valeurs: $+1/2$ ou $-1/2$, dans le cas de l'électron.

Le moment magnétique μ_e est lié au spin S par la relation:

$$\vec{\mu}_e = - \text{constante} \cdot \vec{S} = - g_e \cdot \beta_e \cdot \vec{S}$$

$g_e \cdot \beta_e$ est le rapport gyromagnétique de l'électron.

On en déduit que le vecteur moment magnétique de l'électron est de sens opposé à celui du vecteur spin.

Quand un électron est dans un champ magnétique, son moment magnétique a deux orientations possibles qui correspondent aux deux orientations possibles du vecteur de spin, parallèle et anti parallèle au champ magnétique.

L'orientation dans laquelle le moment magnétique est anti parallèle, est l'orientation possédant le maximum d'énergie.

L'énergie de l'électron dans un champ magnétique est donnée par la relation:

$$E = - \vec{\mu}_e \cdot \vec{H} \quad \text{où } \vec{H} \text{ est le champ magnétique.}$$

Sachant que μ_e peut prendre deux valeurs opposées, il s'en suit que l'électron, selon son spin, peut prendre deux valeurs d'énergie E_1 ou E_2 opposées mais égales en valeur absolue.

L'application du champ magnétique permet la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie de l'électron. L'application d'un champ de radiofréquence perpendiculaire au champ magnétique induit une transition entre les deux états de l'électron. La coïncidence entre l'énergie apportée par l'onde et la différence énergétique entre les deux états de l'électron, ΔE , est appelée la résonance.

Il existe deux procédés pour faire apparaître la résonance:

- Soit on garde une valeur du champ magnétique fixe et on fait varier la valeur de la fréquence de l'onde électromagnétique.

- Soit on fixe une valeur pour la fréquence de l'onde et on fait varier le champ magnétique. C'est le procédé qui est utilisé en pratique dans les appareils de RPE.

Le principe que nous venons d'exposer ne faisait intervenir qu'un seul électron isolé.

Les faits sont en réalité plus complexes. Il faut notamment considérer les interactions entre les spins des électrons et du noyau. Ce type d'interactions est appelé en anglais: "hyperfine coupling".

Nous ne pouvons plus, alors, nous baser sur les deux niveaux d'énergie dégénérés de l'électron seul. Il est nécessaire de considérer plusieurs niveaux d'énergie relatifs à l'électron et au(x) proton(s) ou autre(s) noyau(x) (figure 9).

En effet, comme nous l'avons vu dans le cas de l'électron, le moment magnétique du proton peut également prendre deux orientations qui affectent les deux niveaux d'énergie magnétique de l'électron et les divise en quatre sous-niveaux d'énergie.

Cependant, comme le montre la figure 10, le spectre d'absorption dans le cas d'une interaction électron-proton ne fait apparaître que deux pics, car bien qu'il y ait quatre niveaux d'énergie, il existe des règles qui régissent les possibilités de transitions entre ces différents niveaux d'énergie. Ainsi, dans le cas d'une interaction électron-proton, seules deux transitions énergétiques sont possibles sur les quatre existantes.

3.7.2. Appareillage (figure 11).

Nous avons utilisé un appareil de type BRUCKER ESP 300E dont les principaux composants sont:

- un émetteur hyperfréquence, le klystron, stabilisé sur la fréquence de résonance de la cavité résonante.
- une cavité résonante contenant l'échantillon, placé dans la partie la plus homogène du champ magnétique.
- un électro-aimant dont le champ peut varier de quelques Gauss à plusieurs milliers de Gauss ($1\text{G} = 10^{-4}\text{ T}$).

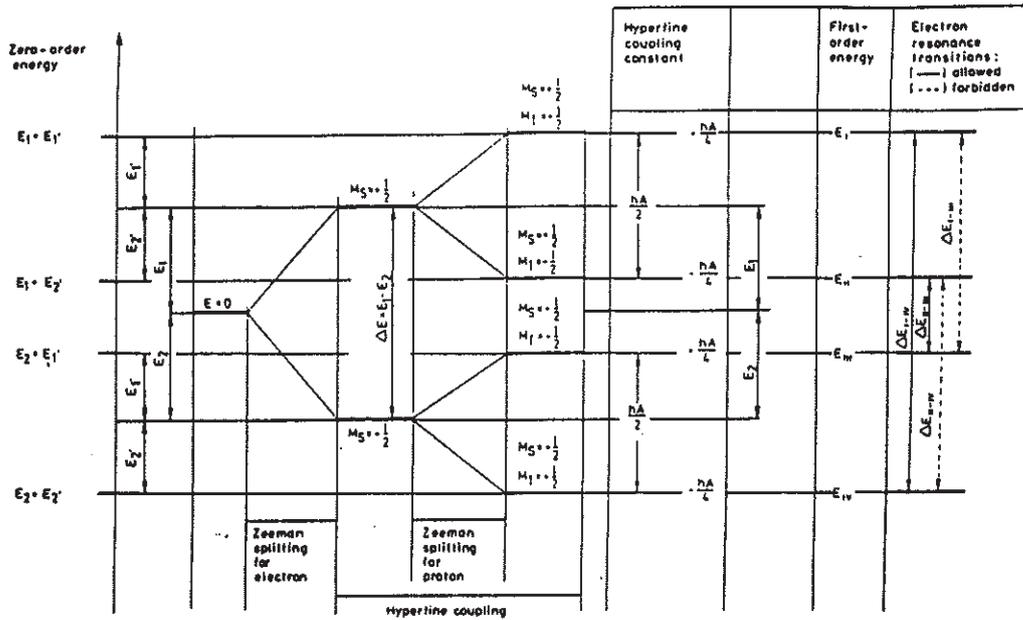


Figure 9 : Niveaux d'énergie dans le cas d'une interaction électron-proton. Quatre niveaux sont possibles. Seules deux transitions énergétiques résonantes sont permises (traits pleins) sur les quatre transitions possibles (traits pointillés).

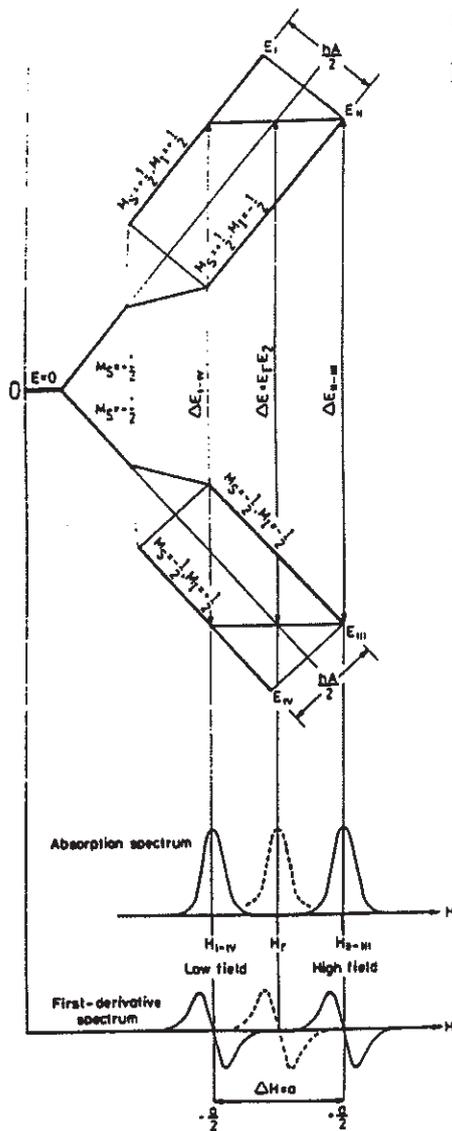
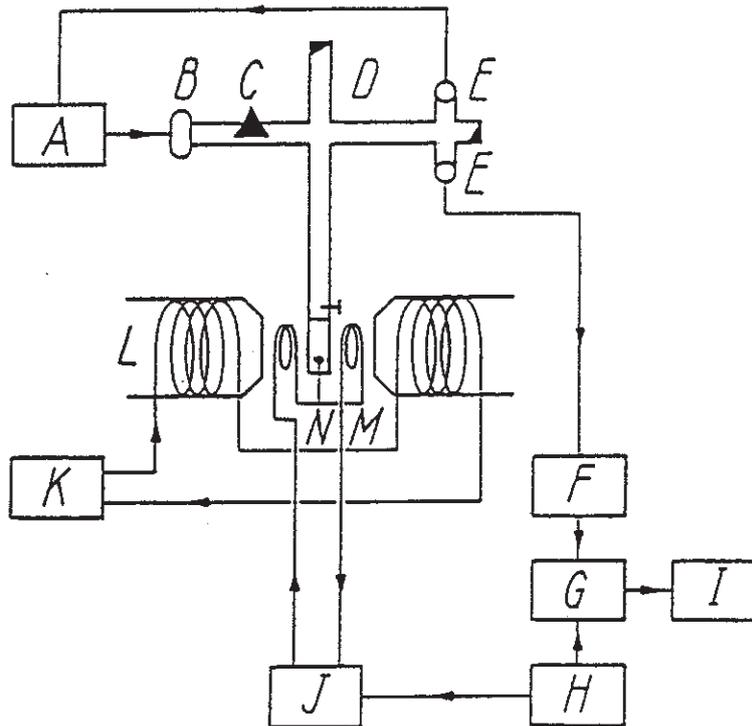


Figure 10: Spectres d'absorption obtenus dans le cas d'un électron seul (traits pointillés) et dans le cas d'une interaction électron-proton (traits pleins).



- A alimentation et contrôle automatique de fréquence du klystron
- B klystron
- C atténuateur
- D T magique
- E diodes détectrices
- F préamplificateur
- G amplificateur synchrone
- H oscillateur audiofréquence (10 à 100 kHz)
- I enregistreur
- J amplificateur de modulation
- K alimentation stabilisée de l'électroaimant
- L électroaimant
- M bobines de modulation
- N cavité résonnante

Figure 11: Schéma de principe d'un spectromètre RPE.

- un amplificateur synchrone accordé sur la fréquence de modulation du champ magnétique, assuré par une bobine de Helmutz fixée à la cavité.

Le klystron est relié à la cavité par un pont hyper-fréquence dont l'élément principal est un T magique séparant l'onde incidente de celle réfléchie par la cavité qui est dirigée vers la diode détectrice du signal, connectée à l'amplificateur.

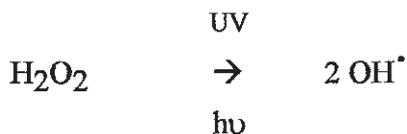
Le signal est généralement enregistré sous forme de dérivée première et parfois de dérivée seconde selon que l'on utilise une simple ou une double modulation du champ magnétique.

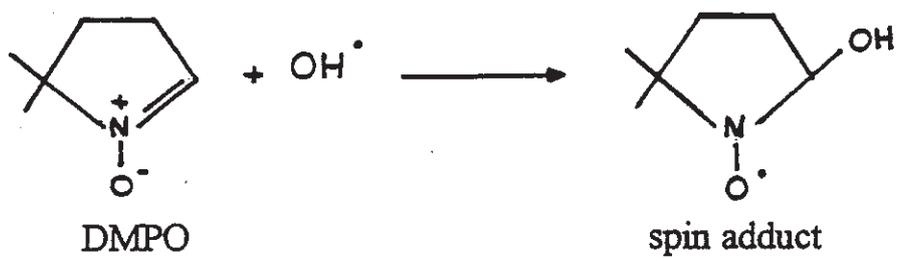
3.7.3. Protocole expérimental.

Le protocole que nous avons utilisé est la méthode du "SPIN-TRAP", qui a été mise au point en 1960.

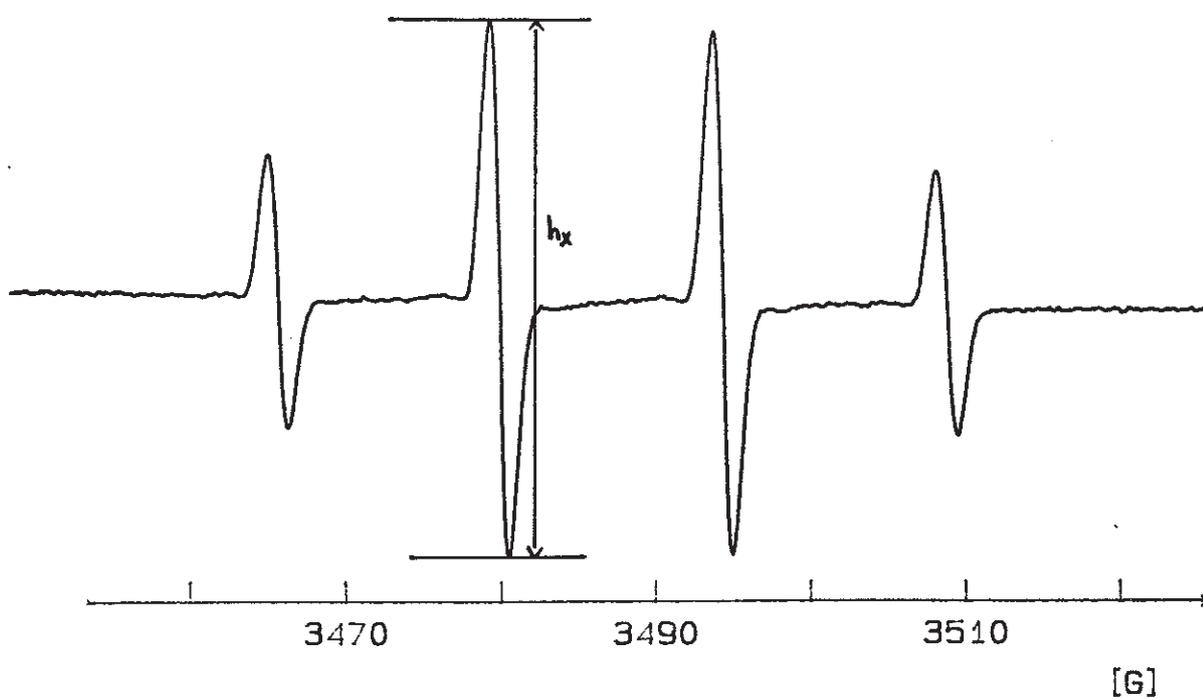
Les radicaux libres oxygénés ont une demi-vie très courte, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-19} seconde. Le principe consiste à utiliser une molécule très avide de ces radicaux libres oxygénés, devenant à son tour une espèce radicalaire, appelée "SPIN-ADDUCT", dont la durée de vie est très augmentée, permettant son étude en RPE.

Le SPIN-TRAP utilisé ici est une nitroxe: la DMPO = 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde qui va réagir avec les radicaux hydroxyles OH^\bullet produits par photolyse du peroxyde d'hydrogène:





Le spectre RPE en solution aqueuse du spin-adduct formé à partir de la DMPO est de la forme suivante:



Les conditions optimales de réalisation du spectre du spin-adduct dependent:

- du temps d'irradiation par les UV
- du temps séparant la fin de l'irradiation et l'enregistrement du spectre déterminé en fonction de la durée de stabilité du spin-adduct formé.

Les conditions opératoires au cours de notre étude sont les suivantes:

- 10 μl H_2O_2 à 30 volumes
- 5 μl de DMPO pure
- 88 μl de tampon phosphate (SORENSEN) pH=7 ou de produit testé en solution dans le même tampon.

Le temps d'irradiation UV est de 4 mn sous une lampe de 100W Bioblock, l'acquisition du spectre se faisant 3 mn après l'irradiation UV.

Les paramètres que nous avons utilisés, lors de l'acquisition des spectres RPE sont les suivants

- gain: $G = 4.10^{-4}$.
- modulation d'amplitude: $MA = 0,987$ G.
- temps: $TC = 10,24$ s et $CT = 5,12$ s.
- balayage = 80 G.
- atténuation = 15 dB.

La quantité de radicaux libres formés étant constante pour un temps d'irradiation donné, il y a une compétition entre la capture des radicaux OH^\bullet formés dans le milieu réactionnel d'une part par la DMPO et d'autre part par le produit testé.

Le spectre obtenu montre la présence de quatre pics caractéristiques du spin-adduct de la DMPO. Nos mesures sont faites sur la valeur de hauteur (ht) d'un des pics centraux. A partir de la variation d'amplitude de ce pic nous déterminons le pourcentage d'inhibition des radicaux libres formés à partir du peroxyde d'hydrogène.

La hauteur pic à pic obtenue à partir de la DMPO seule, sans produit, correspondant à notre valeur de référence équivalente à 100% de radicaux libres présents dans le milieu.

L'étude porte sur différentes concentrations des produits testés en vue d'obtenir une concentration correspondant à 50% d'inhibition des radicaux libres formés, CI₅₀.

Les résultats sont exprimés de la façon suivante:

$$\% \text{ radicaux formés} = Y = \frac{100 \times hx}{ht}$$

où hx = hauteur pic à pic obtenue pour le produit testé.

ht = hauteur pic à pic obtenue avec la DMPO seule.

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - Y$$

A partir des pourcentages d'inhibition obtenus pour les différentes concentrations d'un même produit, nous établissons une représentation graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, nous permettant de déterminer la CI₅₀.

Les résultats concernant les phénothiazines que nous avons testées sont regroupés dans la troisième partie, il comprennent la détermination de la CI₅₀ pour chaque molécule ainsi que la détermination du coefficient d'activité par rapport à une molécule de référence: le méthimazole.

TROISIEME PARTIE

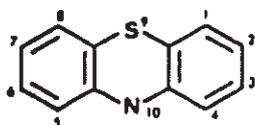
1. LES PHENOTHIAZINES ET ISOSTERES.

La phénothiazine (ou thiodiphénylamine ou dibenzoparathiazine) est une substance inscrite à la liste II des substances vénéneuses qui a été utilisée en thérapeutique pour ses propriétés anthelminthiques notamment vis-à-vis des oxyures.

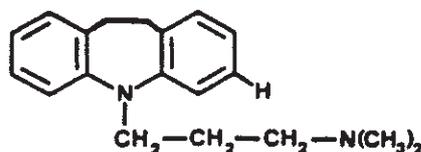
Cependant, le noyau de ce composé a pris une importance considérable en pharmacologie par ses dérivés antihistaminiques, neuroleptiques et antiparkinsoniens.

Les phénothiazines que nous avons testées, appartiennent à deux classes thérapeutiques: les antihistaminiques et les neuroleptiques (Tableau 2).

Nous avons également testé deux molécules à structure imipraminique, appartenant, elles, à la classe thérapeutique des antidépresseurs tricycliques, dont nous verrons plus loin que la structure chimique n'est pas très éloignée de celle des phénothiaziniques (figure 12).



Phénothiazine



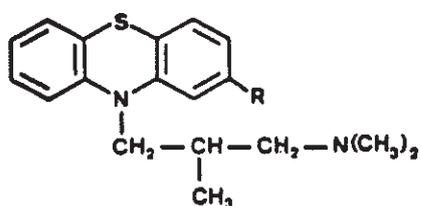
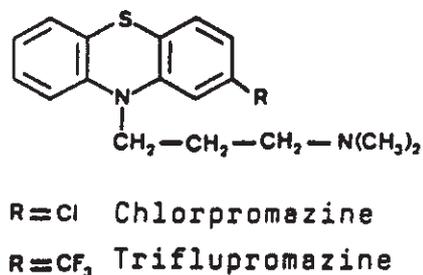
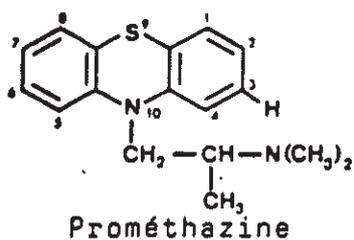
Imipramine

1.1. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES (figure 12).

Comme nous l'avons dit, la phénothiazine est la dibenzo-p-thiazine. Nous retrouvons donc, sur le noyau de base les caractéristiques suivantes:

- deux cycles benzéniques encadrant un cycle para-thiazine.
- la présence d'un atome de soufre et d'un atome d'azote intracycliques (cycle para-thiazine).

Les dérivés de l'imipramine montrent la perte de l'atome de soufre intracyclique qui est remplacé par une chaîne $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ donnant au noyau de base une structure dibenzo-azepine.



R=H Aliméazine
R=OCH₃ Lévomépromazine (Lévogyre)

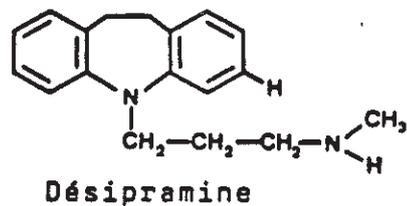
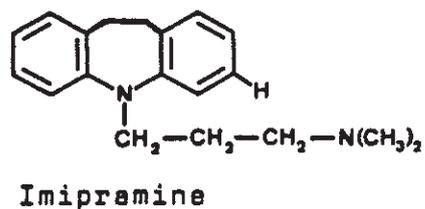
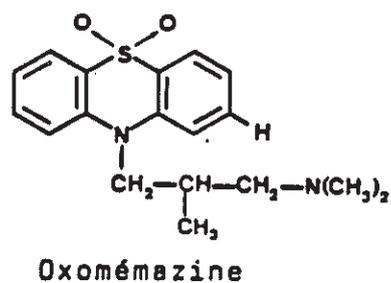
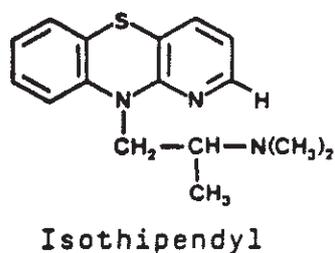


Figure 12 : Structures chimiques des molécules étudiées dans la série des phénothiazines et apparentées.

Les phénothiazines que nous avons testées présentent des substitutions du noyau de base en position 3 du cycle benzénique et en position 10, sur l'azote du cycle thiazine.

Deux exceptions apparaissent cependant, concernant l'isothipendyl et l'oxoméazine:

- dans la molécule d'isothipendyl, un noyau benzénique est remplacé par un noyau pyridine, faisant apparaître un second atome d'azote intracyclique.
- l'oxoméazine possède en plus deux oxygènes reliés au soufre par des liaisons datives.

PHENOTHIAZINES		IMIPRAMINIQUES
Antihistaminique H ₁	Neuroleptique	Antidépresseur
Prométhazine	Chlorpromazine	Imipramine
Alimémazine	Triflupromazine	Désipramine
Isouthipendyl	Lévomépromazine	
Oxoméazine		

Tableau 2 : Classes thérapeutiques des différentes molécules testées.

1.2. ACTIVITE DES PHENOTIAZINES SUR LES SYSTEMES

PEROXYDASIQUES (tableau 3).

Les résultats des activités des phénothiazines et isostères sur les systèmes peroxydasiques et sur le métabolisme thyroïdien sont regroupés dans le tableau 3 .

1.2.1. Effets sur le métabolisme thyroïdien et sur la lactoperoxydase.

Les études sur la perturbation de la fonction thyroïdienne effectuées par RABY et collaborateurs (4), ont montré pour certaines molécules des effets importants. On retrouve un pouvoir de complexation de l'iode assez important avec des valeurs de constante Kc souvent supérieures à 1000 l.mol⁻¹ et pouvant aller jusqu'à 4 907 l.mol⁻¹.

Les solutions de ces mêmes médicaments, testés sur le système lactoperoxydase/H₂O₂, ont montré des résultats variables d'une molécule à l'autre. On peut noter cependant que ces

D.C.I	Activité sur la thyroïde		Action sur la Lactoperoxydase	Activité sur la PGS			Activité anti-inflammatoire in vivo % inhibition de l'œdème	Effet sur la dégradation du liquide synovial % d'inhibition
	Fonction thyroïdienne	Kc		Peroxydase CI50	Cylooxygénase %pour 100 µM	PGS totale CI50		
Prométhazine	Perturbation	4 259	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	peu d'effet 14,3 %	peu d'effet 11,8 %
Chlorpromazine	diminution de T3 et T4	3 168	Pas d'effet à faible dose activation à partir de 100µM	Inhibition 475 µM	Activation + 27 %	Inhibition 230 µM	anti-inflammatoire 31,8 %	Inhibition 95,6 %
Triflupromazine		2 803	Activation	Inhibition 1 000 µM	Petite activation + 21 %	Inhibition 1 000µM	Anti-inflammatoire 44,5 %	Petite inhibition 19,2 %
Alimémazine	diminution de T3 et T4	788	pas d'effet à faible dose inhibition à partir de 1000µM	protège de l'auto-inactivation	Activation + 59 %	Inhibition 320 µM	Anti-inflammatoire 45 %	Petite inhibition 15,2 %
Lévomépromazine		741	pas d'effet à faible dose inhibition à partir de 1000µM	Inhibition 70 µM	Activation + 22 %	Inhibition 180 µM	anti-inflammatoire 35,8 %	Petite inhibition 20,9 %
Isothipendyl	diminution de T3 et T4	2 683	Légère inhibition	Très légère inhibition	Activation + 29,5 %	Très légère inhibition	Anti-inflammatoire 41,3 %	Petite inhibition 13,1 %
Oxoméazine			activation	Pas d'effet	Inhibition - 33 %	Inhibition	Peu d'effet 12,9 %	Inhibition
Imipramine	Perturbation	4 907	Inhibition	Pas d'effet	Petite inhibition	Inhibition 375 µM	Anti-inflammatoire 69,2 %	Inhibition
Désipramine	Perturbation	2 987	Inhibition	Pas d'effet		petite inhibition	Anti-inflammatoire 63,3 %	inhibition

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de l'activité des phénothiazines sur la fonction thyroïdienne et sur les systèmes peroxydasiques. (Ø' après MOULARD)

molécules ont peu ou pas d'effets sur ce système peroxydasique, à l'exception de la lévomépromazine qui se montre inhibitrice à une concentration supérieure à 1 mM.

Ces résultats amènent à penser que l'activité antithyroïdienne des ces molécules serait davantage liée à une activité sur l'iode qu'à une inhibition de la peroxydase thyroïdienne.

1.2.2. Activité sur la PGS.

① Activité sur la peroxydase.

Les tests sur la peroxydase de la PGS montrent une activité inhibitrice pour certaines molécules qui ont en commun:

- la présence d'une fonction amine tertiaire sur une chaîne à trois carbones gréffée sur l'azote du cycle thiazine.

- la présence du soufre intracyclique.

L'inefficacité des imipraminiques peut être expliquée par la perte de l'atome de soufre intracyclique.

② Activité sur la PGS totale.

Toutes les molécules, à part la prométhazine, montrent une activité inhibitrice sur la PGS totale. L'apparition, pour certaines molécules, d'une activité inhibitrice sur le complexe pourrait être due à une inhibition de la cyclo-oxygénase.

③ Activité sur la cyclo-oxygénase.

L'ensemble des molécules montre une activité variable sur la cyclo-oxygénase, avec soit une activation soit une inhibition de l'activité.

Tous ces résultats montrent pour l'ensemble des molécules une activité inhibitrice de l'activité de la PGS totale. Il faut cependant constater que certaines molécules n'ont pas d'activité inhibitrice sur chaque activité enzymatique mesurée séparément mais se révèlent inhibitrices de l'activité enzymatique globale du complexe PGS.

1.2.3. Activité anti-inflammatoire.

① Inhibition de l'œdème podal à la carragénine chez le rat.

A part la prométhazine et l'oxoméazine, l'ensemble des molécules montre une activité anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème supérieur à 30% et pouvant aller jusqu'à près de 70%. Cette inhibition concerne les mesures faites à la troisième heure après l'injection de carragénine, au moment où l'augmentation de l'œdème correspond à la synthèse de prostaglandines.

Cependant, considérant l'implication directe de l'histamine dans le développement précoce de l'œdème induit par la carragénine (première heure), les phénothiazines à fort pouvoir antihistaminique H₁ ont montré une inhibition importante du développement de l'œdème dans la première heure suivant l'injection de la carragénine. C'est le cas notamment de la prométhazine.

Ces molécules inhibent ensuite la deuxième phase de l'œdème (liée à la synthèse de prostaglandines) à des degrés variables. Cette inhibition n'est due qu'à leur action sur le complexe PGS entraînant une inhibition de synthèse des prostaglandines.

② Essai in vitro sur la dégradation du liquide synovial.

Les résultats obtenus montrent une activité globalement assez faible de l'ensemble des molécules, à l'exception de la chlorpromazine qui donne un pourcentage d'inhibition de plus de 95%.

1.2.4. Conclusion.

Le screening de ces molécules à partir de leur pouvoir électrodonneur a confirmé, pour certaines d'entre elles, une inhibition des divers systèmes peroxydasiques testés. Leur activité anti-inflammatoire concernant l'inhibition de synthèse des prostaglandines et leur activité vis-à-

vis des radicaux superoxydes ont été le point de départ de notre travail. Après avoir exposé les résultats de nos expérimentations, nous verrons si les sites d'action que nous avons envisagés permettent d'expliquer l'effet secondaire anti-inflammatoire de ces molécules.

2. ACTIVITE ANTIAGREGANTE PLAQUETTAIRE.

Les résultats concernant l'activité antiagrégante plaquettaire des phénothiazines sont regroupés dans les tableaux 4 et 5.

PHENOTHIAZINE	CI ₅₀ en mM	Coeff.activité/Aspirine
Chlorpromazine	22	1,63
Triflupromazine	24,3	1,48
Alimémazine	0,46	78,26
Lévopromazine	17,5	2,05
Isothipendyl	19,6	1,83
Oxomémazine	26	1,38
Imipramine	27,5	1,30
Désipramine	12,4	2,9
MMI	37,2	0,96
Aspirine	36	1

Tableau 4: Activité antiagrégante plaquettaire des phénothiazines vis à vis du collagène.

Vis-à-vis de l'ADP comme du collagène, les phénothiazines et les dérivés imipraminiques montrent une activité antiagrégante souvent plus élevée que l'aspirine.

L'alimémazine et la désipramine sont les molécules les plus actives, quel que soit l'inducteur utilisé.

Avec l'ADP, aucun des produits étudiés, ainsi que l'aspirine, n'ont manifesté d'action significative au niveau de la première vague d'agrégation. Au niveau de la deuxième vague, les effets observés sont d'intensité variable selon les substituants. Deux paramètres semblent intervenir sur le pouvoir antiagrégant: l'électronégativité et l'encombrement stérique.

PHENOTHIAZINE	CI ₅₀ en mM	Coeff.activité/Aspirine
Chlorpromazine	10,3	0,87
Triflupromazine	5,4	1,66
Alimémazine	3	3
Lévopromazine	5,75	1,56
Isothipendyl	6,3	1,42
Oxoméazine	7	1,28
Imipramine	9,4	0,95
Désipramine	0,75	12
MMI	10,5	0,85
Aspirine	9	1

Tableau 5: Activité antiagrégante plaquettaire des phénothiazines vis à vis de l'ADP.

D'un point de vue relation structure-activité, la faible différence d'activité entre les phénothiazines et les imipraminiques laisse supposer que la disparition de l'atome de soufre intracyclique n'influence pas l'activité antiagrégante. Les résultats obtenus pour l'oxoméazine, pour laquelle le doublet électronique du soufre est impliqué dans des liaisons datives avec l'oxygène, confirment la faible importance du soufre dans l'activité antiagrégante.

Le soufre ne serait alors pas l'atome électrodonneur. L'azote pourrait jouer ce rôle et être le site d'action de ces molécules.

Dans le cas des phénothiazines, l'étude de l'influence du substituant (R) en position 3 (chlorpromazine, triflupromazine, et lévomépromazine) montre que l'activité antiagrégante varie dans le même sens que l'électronégativité.

Concernant les imipraminiques, l'apparition d'une fonction amine secondaire par la perte d'un groupement CH_3 au niveau de la fonction amine sur la chaîne latérale de l'imipramine entraîne une augmentation de l'activité antiagrégante.

Le MMI montre une activité antiagrégante légèrement inférieure à l'aspirine.

3. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₂

Pour cette étude, les phénothiazines ont été rajoutées au sang immédiatement après le prélèvement à raison de 0,5 ml d'une solution 0,04M du médicament, dans du soluté physiologique, par tube de 5 ml de sang.

Nous avons également utilisé l'arachidonate de Na comme inducteur de la synthèse de la prostaglandine E₂ à raison de 4 μl par tube de 5 ml de sang.

Nous avons déterminé un pourcentage d'inhibition de la synthèse de la prostaglandine E₂ par rapport à un témoin contenant seulement le sang et l'arachidonate de Na.

La figure 13 représente la courbe d'étalonnage obtenue avec la gamme étalon de prostaglandine E₂. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 6.

Certaines molécules n'ont pas ou peu d'effet sur la synthèse de la PGE₂: prométhazine, chlorpromazine, triflupromazine, lévomépromazine et oxomépromazine.

Les autres molécules ont par contre un effet inhibiteur assez important, notamment la désipramine.

Pourcentage du traceur $\frac{B}{B_0}$

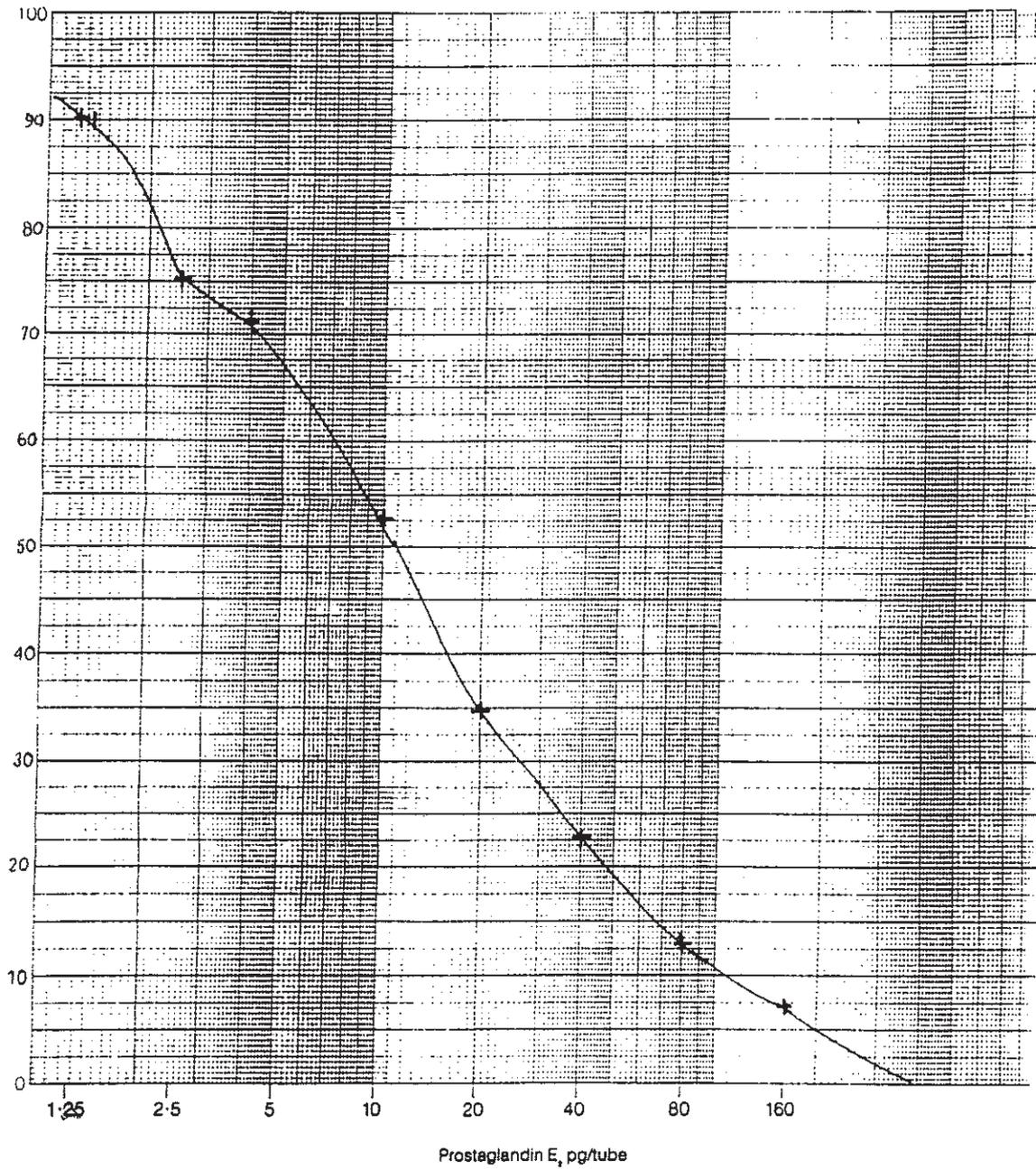


Figure 13 : Courbe d'étalonnage du standard PGE₂.

Nous pouvons noter que le MMI se révèle être un inhibiteur plus puissant que les phénothiazines que nous avons testées.

Molécule	Taux de PGE ₂ en pg/tube	% d'inhibition de synthèse/témoin
Prométhazine	43	0
Chlorpromazine	42	2,32
Triflupromazine	42,1	2,09
Alimémazine	25	41,86
Lévomépromazine	43	0
Isothipendyl	24	44,18
Oxoméazine	43	0
Imipramine	30	30,23
Désipramine	17	60,46
MMI	10	76,74
Témoin	43	

Tableau 6: Activité des phénothiazines sur la synthèse de la prostaglandine E₂ induite par l'arachidonate de Na.

4. ACTIVITE ANTIRADICALAIRE.

Les figures 14 et 15 montrent des exemples de spectres RPE obtenus avec respectivement: l'isothipendyl et l'oxoméazine. Les résultats de la mesure de l'activité antiradicalaire des molécules que nous avons testées sont regroupés, pour chaque molécule dans les figures 16 à 24.

84

Date : 8-NOV-1994

Comment :

Filename : Isothipendyl

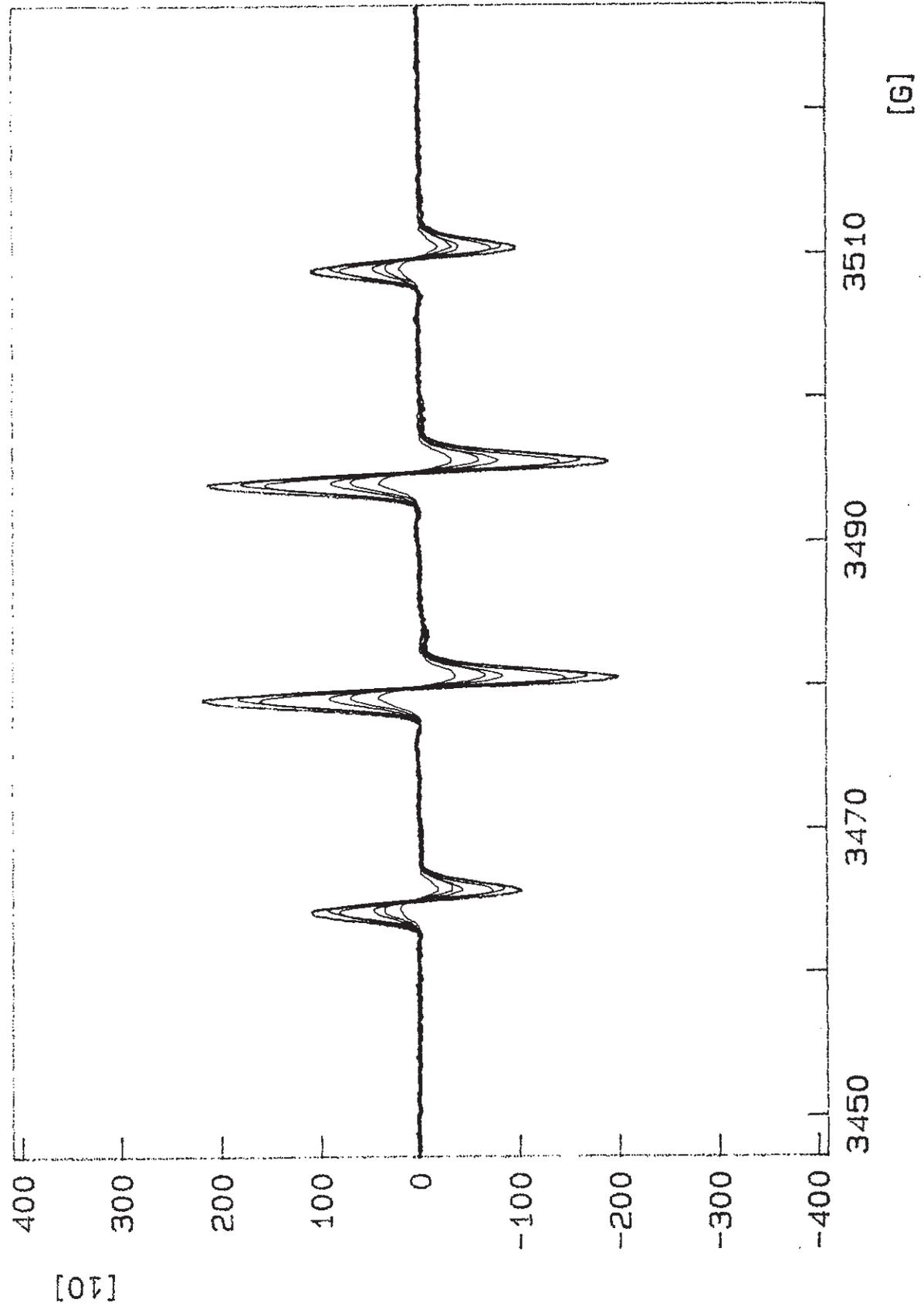


Figure 14: Spectres RPE de la DMPO (noir) et du mélange DMPO-Isothipendyl (rouge) avec des concentrations variables du médicament.

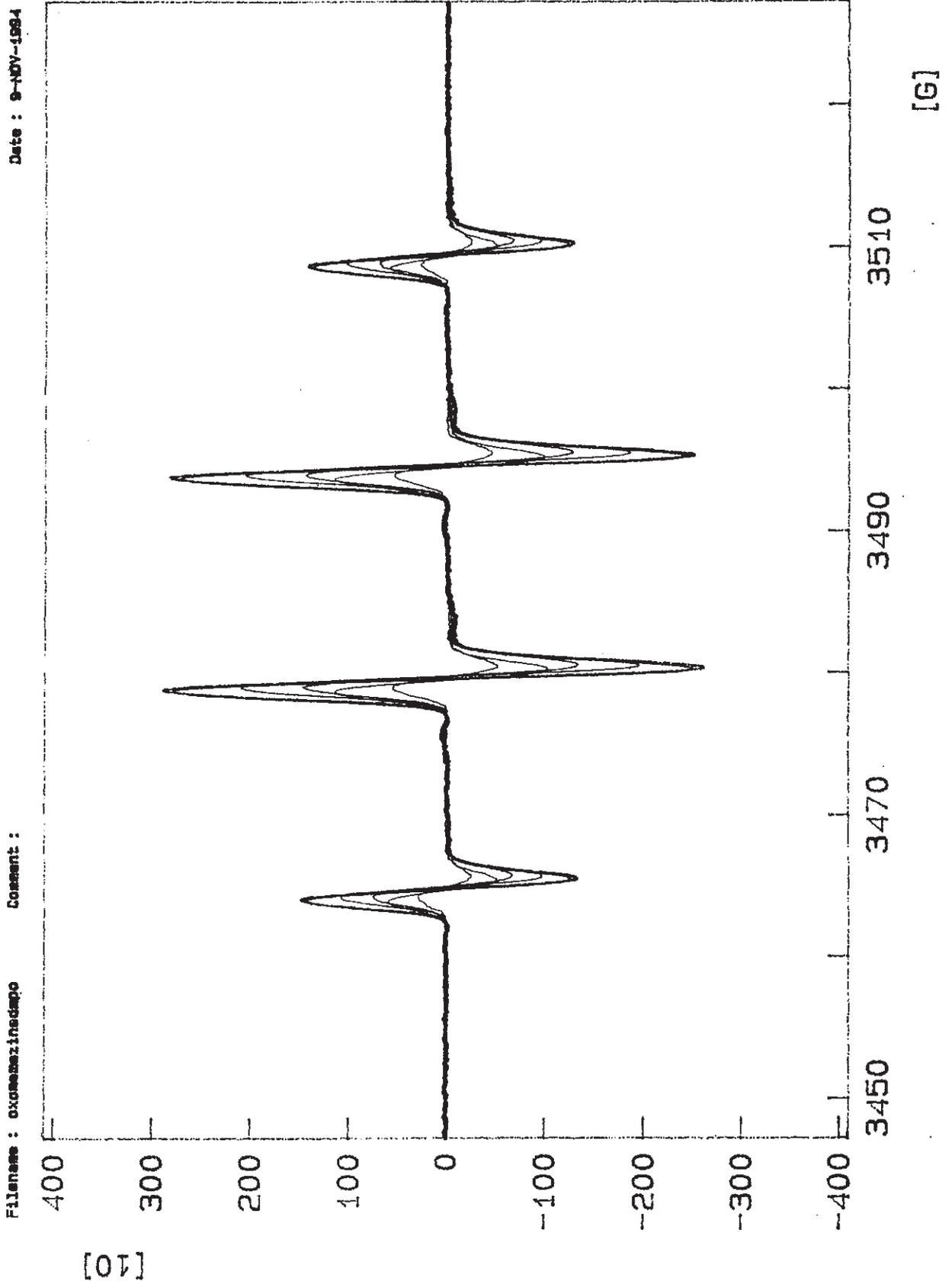


Figure 15: Spectres RPE de la DMPO (noir) et du mélange DMPO-oxomémazine (rouge) avec des concentrations variables du médicament.

promethazine

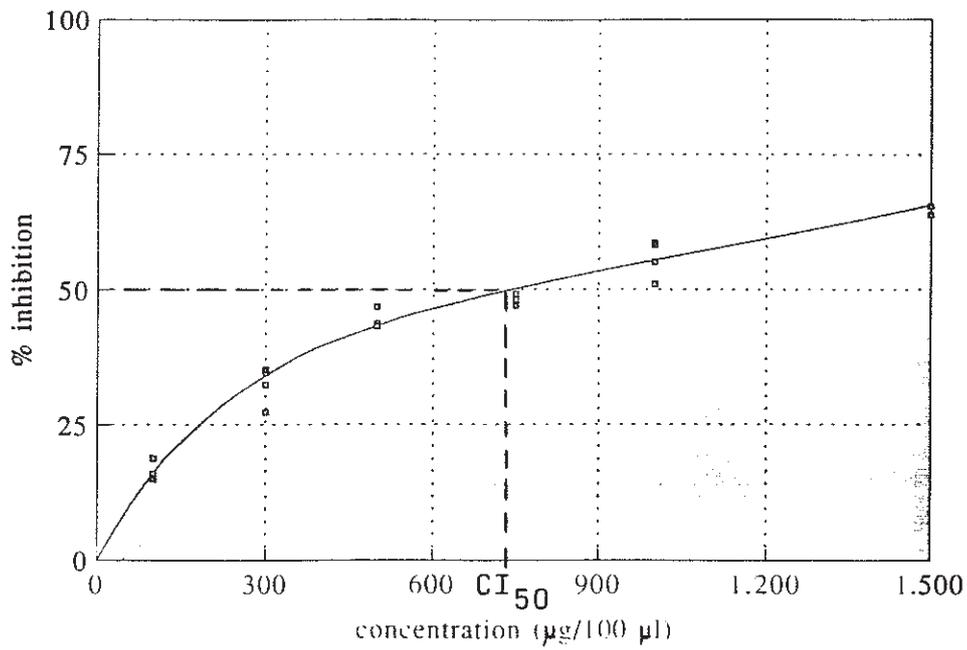


Figure 16 : % d'inhibition des radicaux OH^\bullet en fonction de la concentration en prométhazine.

CHLORPROMAZINE

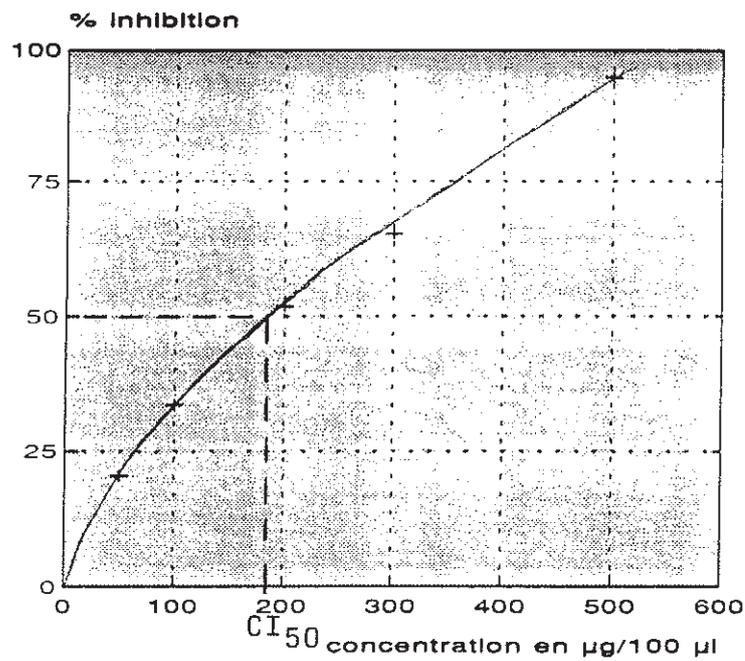


Figure 17 : % d'inhibition des radicaux OH^\bullet en fonction de la concentration en chlorpromazine.

triflupromazine

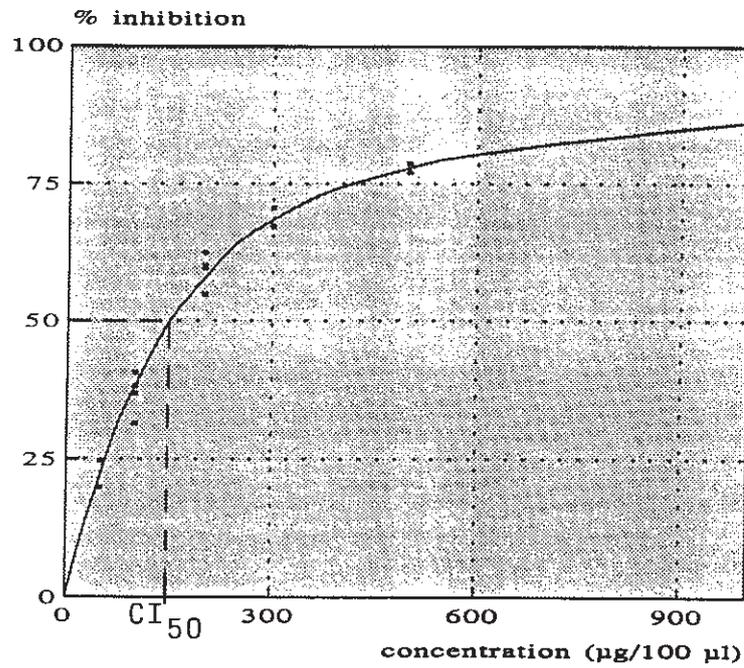


Figure 18 : % d'inhibition des radicaux OH^\bullet en fonction de la concentration en triflupromazine.

alimémazine

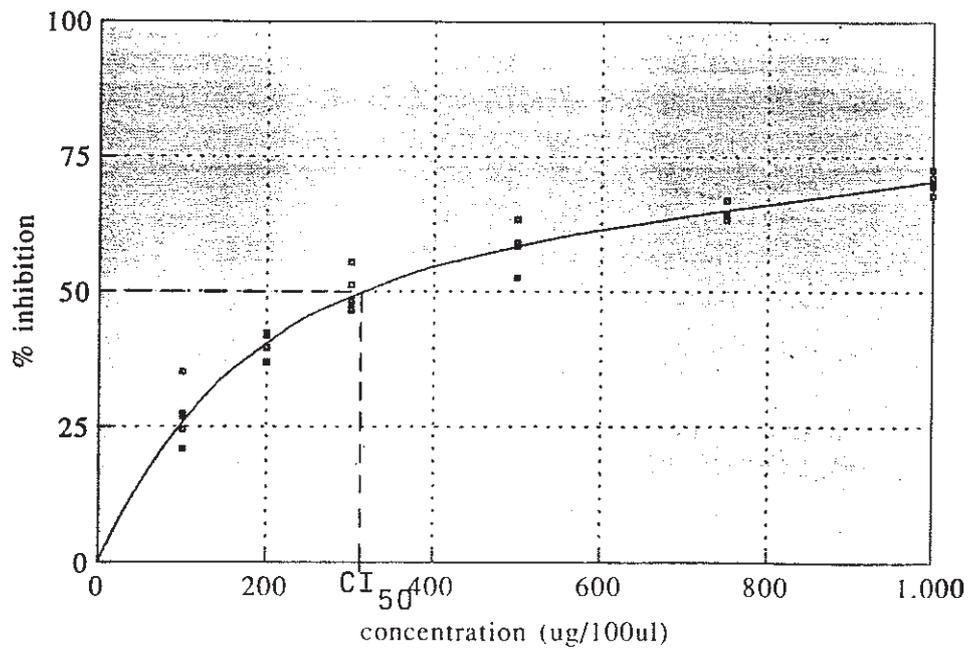


Figure 19 : % d'inhibition des radicaux OH^\bullet en fonction de la concentration en alimémazine.

Levomepromazine

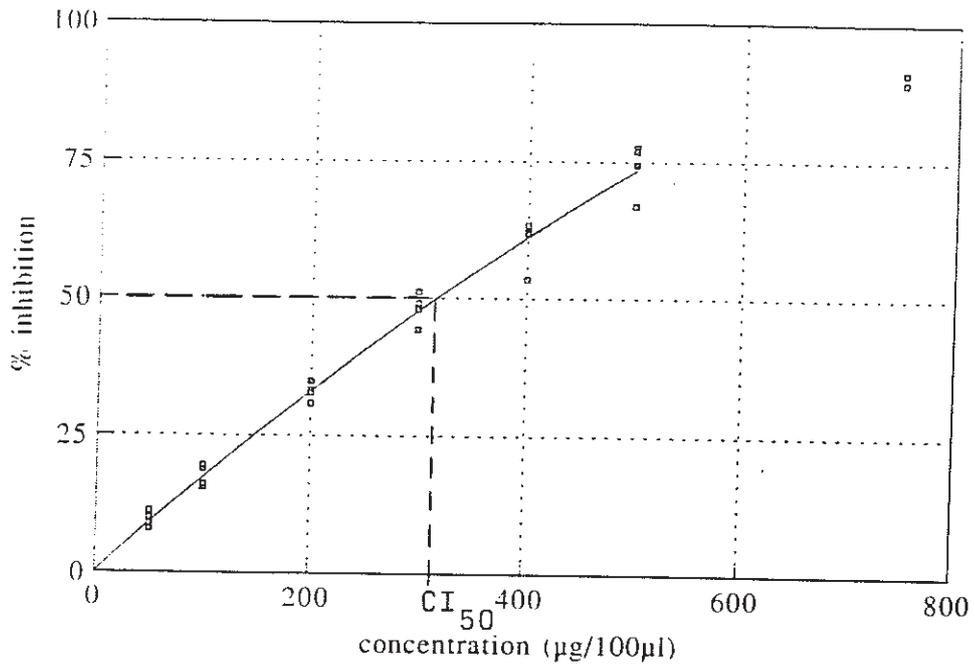


Figure 20 : % d'inhibition des radicaux OH[•] en fonction de la concentration en lévomépromazine.

ISOTHIPENDYL

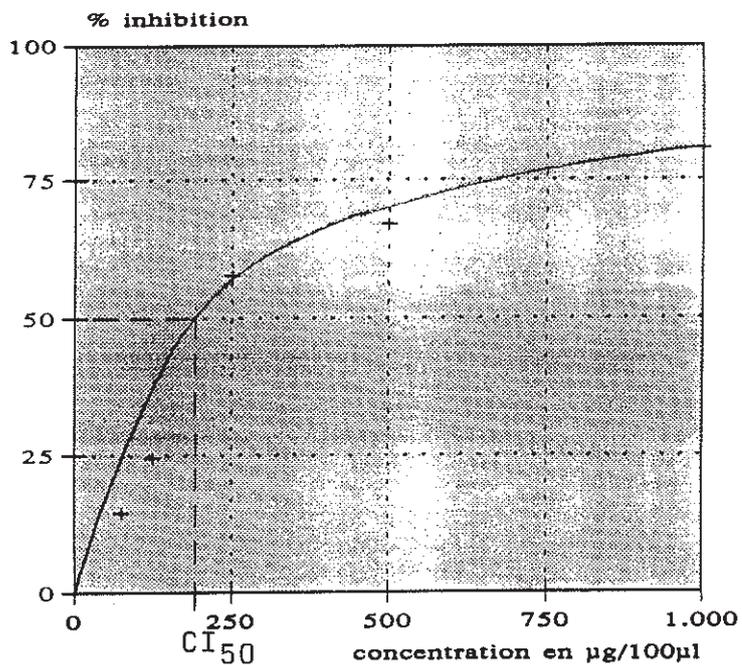


Figure 21 : % d'inhibition des radicaux OH[•] en fonction de la concentration en isothipendyl.

OXOMEMAZINE

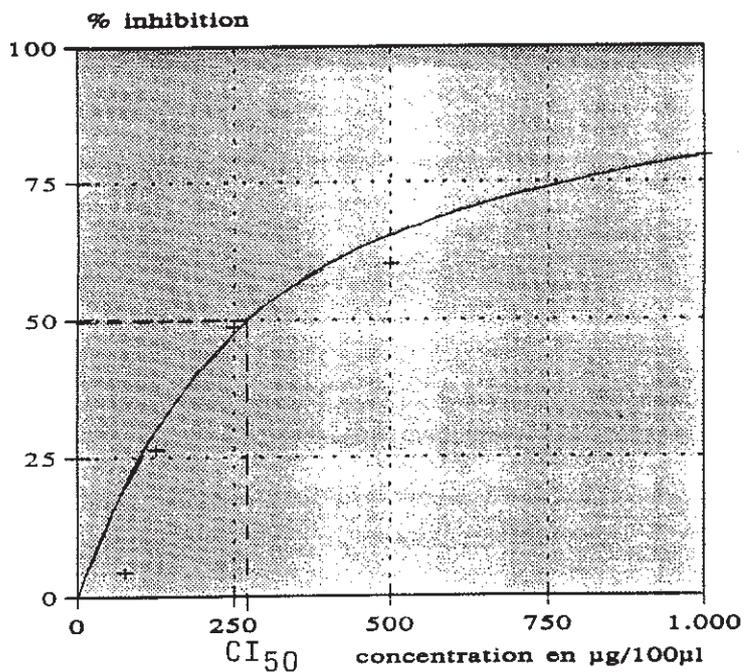


Figure 20 : % d'inhibition des radicaux OH[•] en fonction de la concentration en oxomémazine.

imipramine

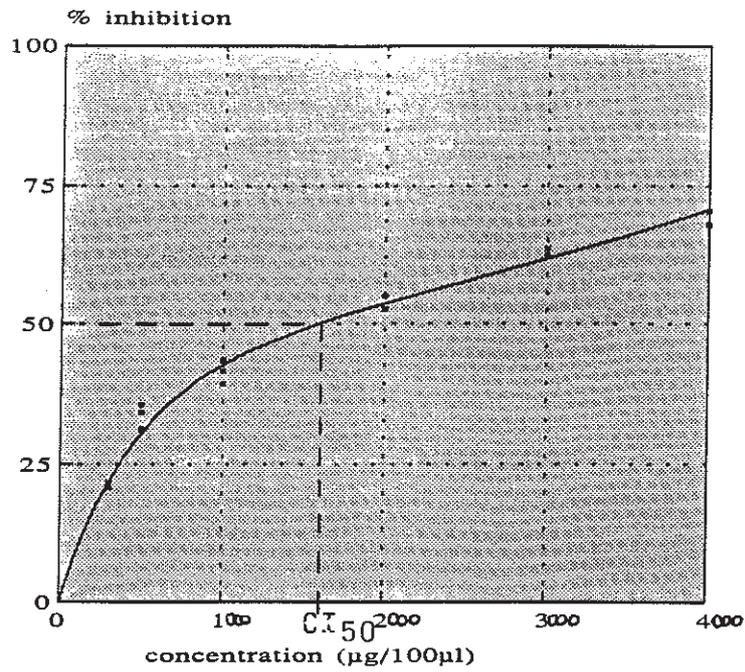


Figure 23 : % d'inhibition des radicaux OH^\bullet en fonction de la concentration en imipramine.

DESIPRAMINE

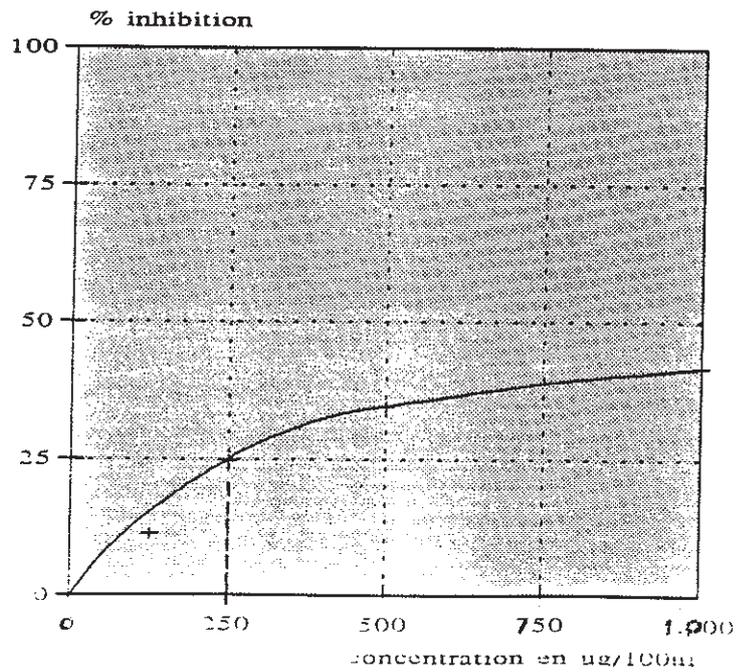


Figure 24 : % d'inhibition des radicaux OH^\bullet en fonction de la concentration en désipramine.

Tous les résultats sont regroupés dans le tableau 7.

Nous prendrons en compte deux paramètres:

- la CI_{50} de chaque molécule (exprimée en mM) excepté pour la désipramine pour laquelle nous n'avons pu déterminer que la CI_{25} en raison de sa faible solubilité dans le solvant utilisé.

- le coefficient d'activité par rapport au MMI que nous avons utilisé comme référence tout au long de notre étude.

Toutes les molécules que nous avons testées montrent, à des degrés divers, une activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux libres oxygénés.

Comme nous l'avons vu dans la deuxième partie, notre protocole expérimental est basé sur la formation de radicaux hydroxyles OH^\bullet , produits par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

MOLECULE	CI_{50} en mM	Coef.Activité/ MMI
Prométhazine	0,26	0,576
Chlorpromazine	5,17	0,029
Triflupromazine	4,3	0,034
Alimémazine	10,6	0,014
Levomépromazine	9,5	0,015
Isothipendyl	6,7	0,022
Oxoméazine	7,2	0,020
Imipramine	57	0,0026
MMI	0,15	1
Désipramine	$CI_{25} = 9,38$ mM	

Tableau 7: Activité antiradicalaire des phénothiazines vis-à-vis des radicaux libres oxygénés.

Au cours du métabolisme de l'acide arachidonique, la transformation de la PGG₂ en PGH₂ produit des radicaux OH[•]. Ces radicaux OH[•] inhibent la synthèse des prostaglandines et de la prostacycline.

La capture de ces radicaux par les phénothiazines tendrait donc à lever l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, entretenant de ce fait l'extension du processus inflammatoire.

L'activité antiradicalaire des phénothiazines vis-à-vis des radicaux OH[•] correspondrait alors à une activité pro-inflammatoire.

Cependant, nous avons également évoqué le rôle extrêmement néfaste de ces radicaux hydroxyles lors des réactions de peroxydations lipidiques.

La réaction en chaîne de lipoperoxydation peut être déclenchée par les radicaux superoxydes O₂^{•-}. La présence de ces radicaux libres au sein des tissus biologiques peut entraîner des réactions de peroxydations lipidiques, catalysées par les radicaux OH[•], extrêmement destructrices.

Ainsi, la capture des radicaux hydroxyles par les phénothiazines pourrait avoir un rôle bénéfique de prévention des attaques des structures membranaires par les radicaux libres oxygénés.

QUATRIEME PARTIE

1. RESULTATS DE LA SERIE.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude, concernant l'agrégation plaquettaire, le dosage de la PGE₂ et la détermination d'une activité antiradicalaire, confirment l'existence d'un effet secondaire anti-inflammatoire des différentes molécules que nous avons testées. Cependant, les phénothiazines et apparentées que nous avons étudiées, agissent à des degrés divers sur les différents sites de l'inflammation que nous avons explorés.

Nous allons donc tenter, à partir du pouvoir électrodonneur, calculé vis-à-vis de l'iode, d'établir une relation structure-activité nous permettant d'expliquer les différences d'activité des molécules que nous avons testées.

Nous tenterons alors de faire ressortir une "structure chimique idéale" comprenant:

- une activité antithyroïdienne liée au pouvoir électrodonneur de la molécule.
- une activité anti-inflammatoire.

La prométhazine:

Parmi les molécules que nous avons étudiées, la prométhazine présente l'une des valeurs de Kc les plus élevées (4 259 l.mol⁻¹) lui conférant un fort pouvoir électrodonneur .

La prométhazine n'a cependant aucune activité sur les systèmes peroxydasiques: Lactoperoxydase et PGS.

L'absence d'activité sur la PGS explique la faible inhibition de l'oedème de la patte du rat par une faible inhibition de la synthèse des prostaglandines. Cette hypothèse est confirmée par l'absence d'effet sur la synthèse de la prostaglandine E₂.

En revanche, concernant l'activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux libres oxygénés, la prométhazine possède la CI₅₀ la plus faible de la série. Elle est donc la plus active vis-à-vis des radicaux OH[•] .

Cette activité sur les radicaux OH[•] pourrait expliquer l'absence d'inhibition de la synthèse de prostaglandine E₂. En effet, la capture des radicaux OH[•] lèverait leur inhibition sur la

R	D.C.I	Kc en l.mol ⁻¹	Action sur la Lactoperoxydase	Activité anti-inflammatoire % d'inhibition de l'oedème	Dégradation liq. synovial % d'inhibition	Agrégation plaquettaire CI ₅₀ en mM ADP collagène	Dosage de la PGE ₂ % d'inhibition avec AA	RPE CI ₅₀ en mM
	Prométhazine	4 259	pas d'effet	14,3	11,8	39,8	0	0,26
-Cl	Chlorpromazine	3 168	pas d'effet à faible dose. Activation à 100µM	31,8	95,6	22	2,32	5,17
-CF ₃	Triflupromazine	2 803	Activation	44,5	19,2	24,3	1,9	4,3
-H	Alimémazine	788	Pas d'effet à faible dose. Activation à 1000µM	45	15,2	0,46	41,86	10,6
-OCH ₃	Lévomépromazine	741	pas d'effet à faible dose. Inhibition à 1000µM	35,8	20,9	17,5	0	9,5
	Isothipendyl	2 683	Légère inhibition	41,3	13,1	19,6	44,18	6,7
	Oxoméazine	3 401	Activation	12,9	inhibition	26	0	7,2
	Imipramine	4 907	Pas d'effet	69,2	inhibition	27,5	30,23	57
	Désipramine	2 987	Pas d'effet	63,3	inhibition	12,4	60,46	18,7
	MMI	23 194	Inhibition CI ₅₀ = 2,1 µM	76	57	37,2	76,74	0,15

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats.

transformation de la PGG₂ en PGH₂ augmentant ainsi la synthèse de PGE₂ à partir de la PGH₂.

La prométhazine n'a que très peu d'effet sur la dégradation du liquide synovial (liée à la production de radicaux O₂^{•-}).

Il semble donc qu'il y ait une différence d'affinité de la prométhazine pour les OH[•] et pour les O₂^{•-}.

Nous pouvons conclure que la prométhazine, bien qu'ayant un pouvoir électrodonneur élevé se révèle avoir une activité anti-inflammatoire très faible.

Elle possède cependant une activité antiradicalaire très élevée, assez proche de celle du MMI.

La Chlorpromazine et la Triflupromazine:

Les résultats de ces deux molécules seront analysés ensemble car elles ne diffèrent que par les substituants en position 3 sur le noyau phénothiazine qui sont respectivement: un chlore et un groupement trifluorométhyle (CF₃).

La différence des substituants ne semble pas influencer le pouvoir électrodonneur car les deux molécules ont des valeurs de constante Kc assez proches: 3 168 et 2 803 l.mol⁻¹ respectivement.

Les deux molécules n'ont pas d'activité inhibitrice sur la lactoperoxydase. Elles ont en revanche une activité sur la PGS; activité plus élevée pour la chlorpromazine. Cette inhibition du complexe PGS leur confère une activité anti-inflammatoire in vivo assez élevée, avec respectivement 31 et 44 % d'inhibition de l'oedème podal à la carragénine.

Nous n'avons pas observé d'inhibition de la synthèse de la prostaglandine E₂ (une inhibition de 2 % retrouvée n'est pas significative pour conclure à une inhibition de synthèse, même très faible).

Pour les deux molécules, nous avons trouvé une activité antiagrégante assez moyenne, légèrement supérieure pour la chlorpromazine.

Concernant l'activité antiradicalaire, ces molécules ont des CI_{50} plus élevées que pour la prométhazine, mais ces deux molécules se révèlent être les plus actives de la série après la prométhazine. De façon semblable à la prométhazine, la capture des radicaux OH^\bullet pourrait expliquer la levée de l'inhibition de synthèse de la prostaglandine E_2 .

La différence la plus nette entre ces deux molécules se situe au niveau de leur activité sur la dégradation du liquide synovial. En effet, la chlorpromazine induit 95 % d'inhibition de dégradation du liquide alors que la triflupromazine n'induit que 19 % d'inhibition.

Nous pouvons donc conclure que les deux substituants Cl et CF_3 n'entraînent pas de modifications du pouvoir anti-inflammatoire des molécules excepté sur la capture des radicaux $O_2^{\bullet-}$ pour laquelle la présence du chlore en position 3 semble jouer un rôle très important.

L'alimémazine:

Par rapport à la prométhazine, l'alimémazine possède un $-CH_2-$ supplémentaire sur la chaîne latérale.

Ces deux molécules sont relativement proches chimiquement. Il existe cependant de grandes différences quant à leurs activités antithyroïdienne et anti-inflammatoire. L'allongement de la chaîne latérale d'un atome de carbone ainsi que l'encombrement stérique entraînent une diminution considérable du pouvoir électrodonneur puisque l'alimémazine possède une valeur de constante K_c inférieure à 1000 l.mol^{-1} .

L'alimémazine inhibe le complexe PGS, ce qui lui confère une activité anti-inflammatoire in vivo assez élevée, avec 45% d'inhibition de l'oedème à la carragénine.

Cette activité est confirmée par les résultats que nous avons obtenus:

- une inhibition assez forte de la synthèse de la prostaglandine E₂ (41 % d'inhibition).
- une forte activité antiagrégante plaquettaire.

L'alimémazine possède également une activité antiradicalaire vis à vis des radicaux OH[•] mais sa CI₅₀ (10,6 mM) est l'une des plus faibles de la série.

Nous pouvons en conclure que l'alimémazine possède une activité anti-inflammatoire et antiagrégante plaquettaire assez élevée.

Comparativement à la prométhazine, l'allongement de la chaîne latérale confère une augmentation de l'activité anti-inflammatoire et l'apparition d'une activité antiagrégante plaquettaire assez importante. Elle semble cependant entraîner une diminution de l'activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux OH[•].

La lévomépromazine:

Du point de vue chimique, la lévomépromazine ne diffère de l'alimémazine que par la présence d'un substituant methoxy (-OCH₃) en position 3 du noyau phénothiazine.

Ce substituant ne modifie pas le pouvoir électrodonneur de la molécule. La valeur de la constante K_c est quasiment identique à celle de l'alimémazine: 741 l.mol⁻¹

L'activité inhibitrice sur le complexe PGS est légèrement plus élevée pour la lévomépromazine mais l'activité anti-inflammatoire in vivo est plus faible que celle de l'alimémazine.

La lévomépromazine possède une activité antiagrégante plus élevée que l'alimémazine mais n'a aucune activité sur la synthèse de la prostaglandine E₂.

Cette différence d'activité sur la synthèse de la prostaglandine E₂ ne peut pas s'expliquer par une différence entre leur activité antiradicalaire car les CI₅₀ (activité antiradicalaire) des deux molécules sont extrêmement proches (9,5 et 10,6 mM). Il semblerait donc que la diminution de l'inhibition de synthèse de la PGE₂ soit due à la présence du substituant -OCH₃.

Nous pouvons donc conclure que la présence du substituant $-OCH_3$ dans la molécule de lévomépromazine n'entraîne pas d'augmentation de l'activité anti-inflammatoire.

L'isothipendyl:

Comme nous l'avons déjà vu, l'isothipendyl montre une modification de la structure de base des phénothiazines, avec le remplacement d'un noyau benzénique par une pyridine.

La chaîne latérale sur l'azote du cycle para-thiazine est identique à celle de la prométhazine. Nous confronterons donc les résultats obtenus pour l'isothipendyl avec ceux de la prométhazine pour déterminer l'intérêt de la présence d'un noyau pyridine dans l'activité anti-inflammatoire.

Le pouvoir électrodonneur de l'isothipendyl est diminué de près d'un tiers par rapport à celui de la prométhazine (avec respectivement 2 683 et 4 259 $l \cdot mol^{-1}$).

Concernant l'activité sur les systèmes peroxydasiques (lactoperoxydase et PGS), l'isothipendyl montre une légère inhibition des deux systèmes qui n'existait pas avec la prométhazine.

Cette inhibition permet de retrouver une activité anti-inflammatoire *in vivo* assez élevée avec 41% d'inhibition de l'oedème de la patte du rat.

Cette inhibition de l'oedème est en accord avec la forte inhibition de la synthèse de la prostaglandine E_2 que nous avons trouvée: 44 % d'inhibition.

L'isothipendyl possède également une activité antiagrégante comparable à celle de la lévomépromazine.

L'activité antiradicalaire trouvée est inférieure à celle de la prométhazine mais la CI_{50} de l'isothipendyl est assez élevée (6,7 mM) et reste dans la moyenne des CI_{50} que nous avons trouvées pour l'ensemble de la série.

Nous pouvons conclure que la présence d'un cycle pyridine apporte une amélioration de l'activité anti-inflammatoire par augmentation de l'inhibition de synthèse des prostaglandines et une augmentation de l'activité antiagrégante plaquettaire.

L'oxoméazine:

L'oxoméazine montre une nouvelle modification de structure chimique avec l'apparition d'un groupement SO_2 au niveau du cycle para-thiazine. Nous comparerons les résultats de l'oxoméazine avec ceux de l'alimémazine dont elle ne diffère que par la présence du groupement SO_2 .

Il n'est pas possible, dans le cas de l'oxoméazine, de déterminer une constante de complexation avec l'iode. Nous ne pouvons donc pas comparer les pouvoirs électrodonneurs des deux molécules.

L'oxoméazine montre une inhibition du complexe PGS très inférieure à l'inhibition par l'alimémazine.

Cette différence d'activité est encore accentuée au niveau de la synthèse de la prostaglandine E_2 pour laquelle l'oxoméazine ne montre aucune inhibition alors que l'alimémazine possède une activité assez élevée.

L'oxoméazine possède une activité antiagrégante qui est cependant plus faible que l'alimémazine.

Concernant l'activité antiradicalaire, l'oxoméazine montre une CI_{50} plus faible que celle de l'alimémazine, mais cette affinité légèrement supérieure de l'oxoméazine pour les radicaux OH^\bullet ne semble pas pouvoir expliquer la différence d'activité sur la synthèse de la prostaglandine E_2 .

Nous pouvons donc conclure que la présence du groupement SO_2 au niveau du cycle para-thiazine n'apporte pas d'amélioration de l'activité anti-inflammatoire.

L'imipramine:

Comme nous l'avons vu, les dérivés imipraminiques (imipramine et désipramine) que nous avons testés montrent une modification de la structure chimique de base des phénothiazines avec le remplacement du noyau dibenzo-para-thiazine par un noyau dibenzo-azepine. Il s'agit alors de la perte de l'atome de soufre intracyclique et son remplacement par un groupement $-CH_2-CH_2-$.

Concernant l'imipramine, nous confronterons les résultats avec ceux obtenus pour la chlorpromazine afin de déterminer l'importance du remplacement du cycle para-thiazine par le cycle azepine.

L'imipramine possède le pouvoir électrodonneur le plus élevé de la série, avec une valeur de constante K_c de $4\,907\text{ l.mol}^{-1}$.

L'activité inhibitrice de l'imipramine sur les système peroxydasiques (lactoperoxydase et PGS) sont en accord avec son activité anti-inflammatoire in vivo qui est la plus élevée de la série (69% d'inhibition de l'oedème à la carragénine).

Ce résultat de l'inhibition de la synthèse de la prostaglandine E_2 que nous avons trouvé (30 % d'inhibition) semble assez faible par rapport à l'activité anti-inflammatoire mesurée in vivo.

Cependant, la détermination de l'activité antiradicalaire de l'imipramine montre une CI_{50} très élevée. Ainsi, la faible affinité de l'imipramine pour les radicaux OH^\bullet entraîne un maintien de l'inhibition de la synthèse de la prostaglandine E_2 par ces radicaux. Malgré cela, l'imipramine montre un pouvoir d'inhibition de synthèse de la PGE_2 encore assez élevé.

La détermination de l'activité antiagrégante plaquettaire montre une activité moyenne pour l'imipramine.

Nous pouvons donc conclure que l'apparition de la structure dibenzo-azepine entraîne une amélioration:

- du pouvoir électrodonneur, entraînant une augmentation de l'activité antithyroïdienne.
- une augmentation de l'activité anti-inflammatoire.

La désipramine:

Dans la molécule de désipramine, nous retrouvons la structure dibenzo-azépinique des dérivés imipraminiques. Nous venons de voir que l'introduction de cette nouvelle structure entraînait une nette augmentation des activités antithyroïdienne et anti-inflammatoire.

Dans la molécule de désipramine apparaît une nouvelle particularité chimique que nous n'avons pas retrouvée dans les autres molécules que nous avons testées. En effet, la chaîne latérale greffée sur l'azote du cycle azépinique présente une fonction amine secondaire. Cette différence par rapport à l'imipramine nous permettra d'estimer l'importance de la fonction amine.

Le pouvoir électrodonneur de la désipramine est inférieur à celui de l'imipramine avec une valeur de la constante K_c de $2\,987\text{ l.mol}^{-1}$.

Sur les systèmes peroxydasiques, la désipramine possède des effets assez faibles: pas d'effet sur la lactoperoxydase et une inhibition faible sur la PGS.

Cependant, on retrouve un effet anti-inflammatoire *in vivo* très élevé (63 % d'inhibition de l'œdème à la carragénine) semblable à celui de l'imipramine.

Cet effet est un accord avec la forte inhibition de la synthèse de la prostaglandine E_2 que nous avons trouvée: 60 % d'inhibition.

Nous n'avons pas pu, pour des raisons de solubilité, déterminer la CI_{50} concernant la capture des radicaux OH^\bullet . Cependant, la détermination de la CI_{25} montre une activité assez faible de la désipramine: $CI_{25} = 9,38\text{ mM}$. Par extrapolation, nous pouvons imaginer que la CI_{50} est de l'ordre de 20 mM.

Nous pouvons donc en conclure que la désipramine possède une activité antiradicalaire plus élevée que l'imipramine. Ainsi, l'inhibition par les radicaux OH^\bullet de la synthèse de la PGE_2 est moindre pour la désipramine par rapport à l'imipramine.

Nous retrouvons cependant une inhibition de synthèse de la PGE₂ deux fois supérieure pour la désipramine.

La désipramine semble donc être douée d'une activité d'inhibition de la synthèse des prostaglandines très supérieure.

Concernant l'activité antiagrégante plaquettaire, la désipramine montre une activité très supérieure à celle de l'imipramine et se rapprochant de celle de l'alimémazine.

Nous avons vu, avec l'imipramine, que l'introduction de la structure imipraminique améliorait très nettement l'activité anti-inflammatoire.

La désipramine montre des effets anti-inflammatoires encore supérieurs à ceux obtenus avec l'imipramine.

Nous pouvons donc en conclure que l'apparition d'une fonction amine secondaire sur la chaîne latérale est responsable d'une augmentation de l'activité anti-inflammatoire.

2. CONCLUSION.

Les résultats que nous avons obtenus, pour la série des phénothiazines et apparentées, sont en faveur d'une activité anti-inflammatoire. Cependant nous pouvons noter que:

- Le pouvoir électrodonneur n'est pas le seul facteur déterminant l'activité anti-inflammatoire car la prométhazine a une activité anti-inflammatoire très faible malgré une valeur de K_c des plus élevées. Inversement, l'alimémazine montre une activité anti-inflammatoire assez élevée avec une valeur de K_c inférieure à 1 000 l.mol⁻¹.

- Dans le groupe des phénothiazines, certains substituants en position 3 semblent désactiver la molécule. Il s'agit notamment des substituants : -Cl, -CF₃ et -OCH₃.

- Les molécules à structure imipraminique montrent une activité anti-inflammatoire supérieure à celle des phénothiazines.

Il semblerait donc, à la vue des résultats de toutes les molécules que nous avons testées que l'effet secondaire anti-inflammatoire de ces molécules est plus important dans le cas où la molécule possède:

- *une structure de base imipraminique.*
- *une fonction amine secondaire sur la chaîne latérale (à trois carbones) greffée sur l'azote du cycle azépinique.*

**CONCLUSION
GENERALE**

La mise en évidence du pouvoir électrodonneur des ATS ainsi que leur capacité à inhiber les systèmes peroxydasiques ont été le point de départ de notre étude.

Ces recherches ont en effet mis en évidence que d'autres molécules, de classes thérapeutiques diverses, comme les phénothiazines, possédaient également un pouvoir électrodonneur assez élevé et une certaine activité sur des systèmes peroxydasiques comme la lactoperoxydase et la prostaglandine synthétase.

Ainsi, dans le cadre d'une recherche d'un effet secondaire anti-inflammatoire de quelques phénothiazines et imipraminiques, nous avons tenté de déterminer plus précisément l'activité de ces molécules en explorant des sites précis de l'inflammation. Différentes techniques ont permis l'évaluation de cette activité anti-inflammatoire:

- mesure de l'agrégation plaquettaire qui repose sur le métabolisme intraplaquettaire de l'acide arachidonique.

- mesure de l'inhibition de la biosynthèse de la prostaglandine E₂ par test RIA.

- recherche d'une activité antiradicalaire évaluant le pouvoir "scavenger" des composés vis-à-vis des radicaux hydroxyles OH[•].

Les résultats obtenus sont globalement en faveur d'un effet secondaire anti-inflammatoire des différentes molécules que nous avons testées. Cependant, nous avons remarqué que les molécules à structure imipraminique possèdent une activité anti-inflammatoire supérieure aux phénothiazines sur l'ensemble des sites de l'inflammation que nous avons étudiés.

Nous pouvons déduire de cette étude que les phénothiazines et dérivés imipraminiques possèdent deux effets secondaires:

- un effet secondaire antithyroïdien.

- un effet secondaire anti-inflammatoire.

Il apparaît alors important de noter qu'une inhibition de synthèse des hormones thyroïdiennes peut être un effet secondaire beaucoup plus gênant qu'un effet anti-inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **RABY C. et BUXERAUD J.**
Antithyroïdiens: relations structure-activité. I. formation de complexes moléculaires iodés.
Eur. J. Med. Chem. - Chimica Therapeutica, 1980, 15 (5), 425-430.

- 2 - **BUXERAUD J., ABSIL A.C., CLAUDE J., RABY C., CATANZANO G. et BECK C.**
Antithyroïdiens: relation structure-activité :II. Interprétation du mécanisme d'action des ATS par complexation de transfert de charge.
Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther., 1985, 20 (1), 43-51.

- 3 - **BUXERAUD J., ABSIL A.C. and RABY C.**
Secondary antithyroid action of drugs in relation to structure.
J. Pharm. Sciences, 1984, 73 (12), 1687-1690.

- 4 - **JAMBUT-ABSIL A.C., BUXERAUD J. and RABY C.**
Phenothiazine type drugs: secondary antithyroid effect.
J. Pharm. Clin., 1986, 5 (4), 359-375.

- 5 - **JAMBUT-ABSIL A.C., BUXERAUD J., CLAUDE J. and RABY C.**
Drugs derived from thiazole and imidazole or with Nitrogen-Carbon-Sulfur or tertiary amino groups.
Arzneim-Forsch/Drug Res., 1987, 37, 772-777.

- 6 - **VAN ZYL A., LUBBE S., POTGEITER A. and VAN ZYL J.**
The influence of non steroidal anti-inflammatory and antithyroid agents on myeloperoxidase-catalysed activities of human leucocytes.
S. Afr. Med. J., 1979, 55, 1082-1087.

- 7 - **VAN ZYL A. and LOUW A.**
Inhibiton of peroxidase activity by some non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Bioch. Pharm., 1979, 28, 2753-2759.

- 8 - **VENO S. and RYUJI Y.**
Requirements of heme by prostaglandin synthetase.
Keijo Igabu (Japan), 1984, 61 (5), 114-116.
- 9 - **TAUROG A., DORRIS M. J.L. and LAMAS L.**
Comparison of lactoperoxidase and thyroid peroxidase-catalysed iodination and coupling.
Endocrinology, 1974, 94, 1286-1294.
- 10 - **TAKEGUCHI C. and SIH S.J.**
A rapid spectrophotometric assay for prostaglandin synthetase: application to the study of non-steroidal anti-inflammatory agents.
Prostaglandins, 1972, 2 (3), 169-184.
- 11 - **TAKEGUCHI C., KOHNO K. and SIH S.J.**
Mechanism of prostaglandin biosynthesis -I- characterisation and assay of bovine prostaglandin synthetase.
Biochemistry, 1971, 10, 2372-2376.
- 12 - **SMITH W.L. and LANDS W.E.M.**
Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular glands.
Biochemistry, 1972, 11, 3276-3285.
- 13 - **WILLIS A.L.**
Prostaglandins peptides and amines.
London New-York Academic Press. 1969, 33-38.
- 14 - **WINTER C.A., RISLEY E.A. and NUSS G.**
Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat, as an assay for anti-inflammatory drugs.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 111, 544-547.
- 15 - **DI ROSA M., GIROUD J.P. and WILLOUGHBY D.A.**
Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenin and turpentine.
J. Path., 1971, 104, 15-29.

16 -VANE J.R.

Inhibition of PG synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs.
Nature, 1971, 231, 232-235.

17 -OYANAGUI Y.

Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot oedema.
Bioch. Pharm., 1976, 25, 1465-1472.

18 -PANGANAMALA R.V., SHARMA H.M., HEILIKA R.E., GEER J.C. and CORNWELL D.G.

Role of hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis.
Prostaglandins, 1976, 11, 599-607.

19 -HELMER M.E. and LANDS W.E.M.

Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis.
J. Biol. Chem., 1980, 255, 6253-6261.

20 -MAC CORD J.M.

Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase.
Science, 1974, 185, 529-531.

21 -PUIG-PARELLADA P. and PLANAS J.M.

Synovial fluid degradation induced by free radicals. In vitro action of several free radicals scavengers and anti-inflammatory drugs.
Bioch. Pharm., 1978, 27, 535-537.

22 -BORN G.V.R. and CROSS M.J.

The aggregation of blood platelets.
J. Physiol., 1963, 168, 178-195.

23 -VARGAFTIG B.B, CHIGNARD M. and BENVENISTE J.

Present concept on the mechanism of platelet aggregation.
Biochem. Pharmacol., 1981, 30, 263-271.

- 24 -**HAMBERG M., SVENSSON J. and SAMUELSON B.**
Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 1975, 72, 2994-2998.
- 25 -**SILVER M.J., SLITH J.B., INGERMAN. and KOCSIS J.J.**
Arachidonic acid-induced human platelet aggregation and prostaglandin formation.
Prostaglandins, 1973, 4 (6), 863-875.
- 26 -**SEUTER F.**
Inhibition of collagen-induced thrombocyte aggregation in vivo and in vitro with particular regard to acetylsalicylic acid.
Mod. Thromboprophyl. Angiol. Symp. Kitzbuehel 9th, 1974, 116-124.
- 27 -**VERSTRAETE M.**
A pharmaceutical approach to the inhibition of platelet adhesion and platelet aggregation.
Haemostasis, 1982, 12, 317-336.
- 28 -**BAGREL A.**
Radicaux libres et systèmes anti-oxydants.
Revue Française des Laboratoires, 1992, 233, 108.
- 29 -**BOURRE J.M.**
Radicaux libres, acides gras polyinsaturés, mort cellulaire, vieillissement cérébral.
C.R. Soc. Biol., 1988, 182, 5-36.
- 30 -**CLOAREC M., CAILLARD P., KOUBI G., DESVAUX P. et ARRAITZ D.**
Interêt des anti-oxydants et des radicaux libres.
Lettre du cardiologue, 1990, 147, 2-14.
- 31 -**CRATES DE PAULET A.**
Radicaux libres et vieillissement.
Ann. Biol. Clin., 1990, 48, 323-330.

32 -CHACHATY C.

Spectrométrie par resonance paramagnétique électronique.
Technique de l'ingénieur, 1984, 2885-2891.

33 -Les radicaux libres.

Actualités Pharmaceutiques, 1994, 321, 37-46.

34 -FATIMI J., LAGORCE J.F., DUROUX J.L., CHABERNAUD M.L., BUXERAUD J. and RABY C.

1,4,5-Trialkyl imidazole system anti-inflammatory properties of new substituted derivated.
Chem. Pharm. Bull., 1994, 42 (3), 698-701.

35 -FRIDOVICH I.

Overview: Biological sources of $O_2^{\bullet-}$.
Methods in Enzymology, 1984, 105, 59-61.

36 -BIELSKI BENON H.J.

Generation of superoxide radicals in aqueous and ethanolic solutions by vacuum - UV photolysis.
Methods in Enzymology, 1984, 105, 81-88.

37 -CZPSKI GIDON Y.

Reaction of OH^{\bullet} .
Methods in Enzymology, 1984, 105, 209-215.

38 -JANZEN EDWARD G.

Spin trapping.
Methods in Enzymology, 1984, 105, 188-198.

39 -ROSEN GERALD M. and RAUKMAN ELMER J.

Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals.
Methods in Enzymology, 1984, 105, 198-209.

OUVRAGES CONSULTÉS

- **CEROU S.**
Radicaux libres et pathologie humaine. actualisation et perspectives d'avenir.
Thèse D.E.: Pharm, Limoges, 1994.

- **DROY-LEFAIX M.T., FERRADINI C. et GARDES-ALBERT M.**
Les radicaux libres en dix questions.
Ed. IPSEN.

- **FATIMI J.**
Synthèse et évaluation pharmacologique de dérivés du 1,4,5-trialkyl-2-
mercaptoimidazole, à visée antithyroïdienne, anti-inflammatoire et antiagrégante
plaquettaire.
Thèse de diplôme de Doctorat ès-Sciences Pharmaceutiques, Limoges, 1993.

- **GIRAUDET P., FAURE A. et FROT J.C.**
La réaction inflammatoire. Physiopathologie et exploration clinique.
Ed. VIGOT, 1984.

- **LAGORCE J.F.**
Synthèse et évaluation pharmacologique des dérivés du triazole et de la thiazoline.
Thèse de diplôme de Doctorat ès-Sciences Pharmaceutiques, Limoges, 1989.

- **LAKDHAR M.**
Synthèse et évaluation pharmacologique de dérivés du thiobenzothiazole,
thiobenzoxazole et thiobenzimidazole.
Thèse de diplôme de Doctorat ès-Sciences Pharmaceutiques, Limoges, 1993.

- **MOULARD-RAVOISIER T.**
Influence de médicaments à fort pouvoir électrodonneur sur les systèmes oxydasiques et
peroxydasiques.
Thèse de diplôme de Doctorat ès-Sciences Pharmaceutiques, Limoges, 1990.

- **RANBY B.** and **RABEK J.F.**

ESR spectroscopy in Polymer research.

Polymers/properties and Applications 1, Spinger-Verlag, Berlin Heidelberg New York,
1977.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	14
PREMIERE PARTIE	
1. SYSTEMES PEROXYDASIQUES ET INFLAMMATION	19
1.1. LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE	19
❶ La phase d'initiation	19
❷ La phase d'amplification	20
❸ La phase de réparation et de stabilisation de la réaction	21
1.2. PROSTAGLANDINE SYNTHETASE	22
1.2.1. Metabolisme de l'acide arachidonique	22
1.2.2. Principe généraux de l'activité des peroxydases	25
1.2.3. Mesure des activités peroxydasiques in vitro	26
1.2.3.1. Mesure de l'activité prostaglandinesynthétase in vitro	
❶ Méthodes spectrométriques	26
❷ Mesure de l'activité cyclooxygénase	27
1.2.3.2. Mesure de l'activité de la Lactoperoxydase	27
1.3. LES PROSTAGLANDINES	27
❶ Cellules sécrétant les prostaglandines	28
❷ Effets généraux des prostaglandines	29
1.4. LE THROMBOXANE A ₂	30
2. MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE	31
2.1. TEST IN VIVO: OEDEME A LA CARRAGENINE SUR LA PATTE DE RAT	31
2.1.1. Principe général	31
2.1.2. Mode opératoire	32
2.2. TEST IN VITRO: DEGRADATION DU LIQUIDE SYNOVIAL	32
2.2.1. Principe	32
2.2.2. Mode opératoire	33

DEUXIEME PARTIE

1. AGREGATION PLAQUETTAIRE	36
1.1. MECANISME DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE	36
1.2.1. L'adhésion	36
1.2.2. L'activation	37
① La voie de l'acide arachidonique	37
② La voie de l'adénosine diphosphate	38
③ La voie du PAF acéther	38
1.2.3. Le release plaquettaire	39
1.2.4. Agrégation	39
1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	40
1.2.1. Matériels et méthodes	40
1.2.2. Protocole expérimental	41
1.2.3. Expression des résultats	43
2. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₂	45
2.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE	45
2.2. EXPRESSION DES RESULTATS	46
3. RADICAUX LIBRES	48
3.1. GENERALITES-DEFINITION	48
3.2. RADICAUX LIBRES OXYGENES	49
3.2.1. Formes actives de l'oxygène	49
a) L'anion radical superoxyde O ₂ ^{•-}	
b) Le peroxyde d'hydrogène	
c) Le tradical hydroxyl OH [•]	
3.2.2. Radicaux libres oxygénés	51
3.3. RADICAUX LIBRES ET INFLAMMATION	53
3.3.1. Intervention des radicaux libres au cours du métabolisme de l'acide arachidonique	53
3.3.2. la phagocytose	54
① La réaction primaire	55
② dérivés secondaires	55
3.4. AUTRE IMPLICATION DES RADICAUX LIBRES IN VIVO	58
3.5. SYSTEMES DE PROTECTION CONTRE LES RADICAUX LIBRES	
3.5.1. Les systèmes de défense enzymatiques	59
① Enzymes de destruction des superoxydes	59
② Enzymes de destruction des peroxydes	60

3.5.2. Les systèmes de défense non enzymatiques	61
3.6. MOYEN D'ETUDE DES RADICAUX LIBRES	63
3.6.1. Spectrométrie par résonance paramagnétique électronique	
3.6.2. Appareillage	65
3.6.3. Protocole expérimental	68

TROISIEME PARTIE

1. LES PHENOTHIAZINES ET ISOSTERES	73
1.1. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES	73
1.2. ACTIVITE DES PHENOTHIAZINES SUR LES SYSTEMES PEROXYDASIQUES	75
1.2.1. Effet sur le métabolisme thyroïdien	75
1.2.2. Activité sur la PGS	77
1.2.3. Activité antiinflammatoire	78
1.2.4. Conclusion	78
2. ACTIVITE ANTIAGREGANTE PLAQUETTAIRE	79
3. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E₂	81
4. ACTIVITE ANTIRADICALAIRE	83

QUATRIEME PARTIE

1. RESULTATS DE LA SERIE	94
La Prométhazine	94
La Chlorpromazine et la Triflupromazine	96
L'Alimémazine	97
La Lévomépromazine	98
L'isothipendyl	99
L'Oxoméazine	100
L'Imipramine	101
La Désipramine	102
2. CONCLUSION	103
CONCLUSION GENERALE	106
BIBLIOGRAPHIE	108



CHABOT (jean). - Mise en évidence d'une corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et le pouvoir électrodonneur de phénothiazines. Recherche d'une activité antiradicalaire. - (Thèse; Pharm. ; Limoges ; 1995).

RESUME:

Les recherches sur les antithyroïdiens de synthèse menées depuis plusieurs années ont confirmé l'idée que le fort pouvoir électrodonneur de ces molécules permettait la formation de complexes avec l'iode moléculaire intrathyroïdien, perturbant ainsi l'hormonogénèse thyroïdienne.

Il a été également mis en évidence une activité inhibitrice de ces molécules vis à vis de la peroxydase thyroïdienne. Considérant les échanges électroniques au sein des systèmes peroxydasiques, l'inhibition portant sur la peroxydase thyroïdienne pourrait être due également au pouvoir électrodonneur des antithyroïdiens de synthèse.

Les recherches se sont axées, alors, sur un complexe enzymatique, contenant une activité peroxydasique, au centre de la synthèse des médiateurs de l'inflammation: la prostaglandine synthétase. L'étude du comportement des antithyroïdiens de synthèse sur ce complexe enzymatique a permis la mise en évidence d'un effet secondaire anti-inflammatoire de certaines molécules.

Parallèlement, les recherches ont montré que d'autres molécules médicamenteuses possédaient un fort pouvoir de complexation de l'iode, en relation avec leur pouvoir électrodonneur, leur conférant un effet secondaire antithyroïdien.

Il apparaissait alors intéressant de déterminer l'activité de ces molécules sur les systèmes peroxydasiques, notamment la prostaglandine synthétase.

Nous nous proposons de compléter cette étude par la détermination de l'activité de quelques phénothiazines et imipraminiques sur des sites précis de l'inflammation:

- mesure de l'activité antiagrégante plaquettaire.
- détermination de leur activité sur la synthèse de prostaglandine E₂.
- recherche d'une activité antiradicalaire vis à vis des radicaux libres oxygénés.

MOTS CLES: - Phénothiazine
- Imipramine
- Peroxydase
- Prostaglandine
- Radicaux libres

JURY: Président : Monsieur le Professeur RABY.

Juges : Monsieur DUROUX.
Monsieur LAGORCE.
Monsieur TRAPATEAU.