

50376
1995
75

50376
1995
75

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Année Universitaire 1994-1995

N° d'ordre :

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

par

Corinne AUDOUIN

**DERIVES DE LA N-AMINO INDOLINE POTENTIELLEMENT ACTIFS
DANS LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DE
L'ATHEROSCLEROSE, DE LA RESTENOSE ET DE L'ASTHME**

présentée devant la commission d'examen le 9 mai 1995

JURY

Président : Pr. Jean-Luc BERNIER
Rapporteurs : Pr. Véronique CLAVEY
Dr. Marie-Agnès LASSOIE
Membres : Dr. Jean-Pierre HENICHART
Dr. Raymond HOUSSIN
Pr. Daniel LESIEUR

*A mes parents et à mes sœurs
A toute ma famille et à tous mes amis*

A Marc

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille, en collaboration avec la société UCB et sous la direction scientifique de Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Head of Drug Discovery à UCB, Secteur pharmaceutique. Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour la confiance que vous m'avez témoignée, pour l'aide et le soutien que vous m'avez apportés tout au long de ce travail, mais aussi pour m'avoir incitée à entreprendre une thèse.

Monsieur Jean-Luc BERNIER, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, me fait l'honneur de présider ce Jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Mademoiselle Marie-Agnès LASSOIE, Docteur d'Etat, a bien voulu juger ce travail et en être un rapporteur. Je l'en remercie très sincèrement, et je tiens à lui adresser toute ma reconnaissance pour les conseils et la rigueur qu'elle a su m'inculquer.

Madame Véronique CLAVEY, Professeur de biologie cellulaire à la Faculté de Pharmacie de Lille, a bien voulu juger ce travail et en être un rapporteur. De par votre expérience en biologie cellulaire et votre connaissance de l'athérosclérose, je vous remercie de bien vouloir apporter un regard critique à ce travail.

Monsieur Raymond HOUSSIN, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Lille, me fait l'honneur de siéger à ce Jury. Je vous remercie pour tous les conseils que vous m'avez prodigués au cours de ce travail ainsi que pour votre disponibilité permanente et votre patience de tous les jours.

Monsieur Daniel LESIEUR, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Lille, me fait l'honneur de siéger à ce Jury. Je vous remercie de m'avoir si bien accueillie dans votre laboratoire.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué, de par leur aide précieuse, à ce travail, en particulier à Monsieur E. DIFFERDING, Monsieur E. CAVOY, Monsieur A. FAUCONNIER, Monsieur C. DOGIMONT, Mademoiselle N. MESTDAGH, Monsieur M. GILLARD, Monsieur P. DANHAIVE, Monsieur J. DALIERS, Monsieur K. ROOBOL, Monsieur Y. LABERTY, Monsieur J.-C. HAYEZ, Monsieur L. KISS, Monsieur S. YOUS, Madame L. GOOSSENS, Madame K. BERTRAND, Mademoiselle E. MEULON, Mademoiselle A. MAURIN, Mademoiselle F. LEROUX, Mademoiselle A. MANNIER, Madame N. BOITTE et j'en oublie encore...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
ATHEROSCLEROSE ET RESTENOSE	4
I - Maladies cardiovasculaires : importance économique.....	5
II - Pathologie de l'athérosclérose.....	6
II -1- Les différents types de lésions vasculaires.....	6
II -2- Transport du cholestérol dans l'organisme.....	6
II -2-1- Les différentes lipoprotéines.....	7
II -2-2- Voie normale du cholestérol des LDL.....	9
II -2-3- Voie pathologique du cholestérol des LDL.....	10
II -3- La plaque d'athérome.....	11
II -3-1- Principales cellules impliquées.....	11
II -3-1-1- Cellules endothéliales.....	11
II -3-1-2- Monocytes / macrophages.....	12
II -3-1-3- Cellules musculaires lisses vasculaires.....	13
II -3-2- Mécanismes de formation de la plaque d'athérome.....	14
II -3-3- Lésions avancées de l'athérosclérose.....	16
III - La resténose après angioplastie.....	17
III -1- Angioplastie et conséquences.....	17
III -2- Deux hypothèses concernant le développement de la resténose.....	18
III -2-1- La resténose : une forme accélérée d'athérosclérose.....	18
III -2-2- La resténose : la manifestation d'un processus de cicatrisation exacerbée.....	19
III -2-2-1- Première phase : l'inflammation.....	20
III -2-2-2- Deuxième phase : la granulation.....	21
III -2-2-3- Troisième phase : la formation de la matrice.....	21
IV - Réflexions pour une conception rationnelle de médicaments.....	22
IV -1- Moyens de lutte actuels.....	22
IV -1-1- Cas de l'athérosclérose.....	22
IV -1-1-1- Diminution des facteurs de risque.....	22
IV -1-1-2- Médicaments hypolipémiants.....	22
IV -1-1-3- Agents antithrombotiques.....	24
IV -1-2- Cas de la resténose.....	25
IV -2- Lutte contre l'oxydation des LDL.....	26
IV -2-1- Mécanismes d'oxydation des LDL.....	26

IV -2-2- Réflexion sur les moyens théoriques de lutte contre l'oxydation des LDL.....	30
IV -2-3- Démarche synthétique : l'indapamide comme modèle.....	31
IV -2-4- Modifications apportées à ce modèle.....	35
IV -2-4-1- Utilisation du caractère capto-datif.....	35
IV -2-4-2- L'activité antioxydante est-elle augmentée par l'apport d'un groupement hydroxyle ?	37
IV -3- Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.....	38
IV -3-1- Activation et prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.....	38
IV -3-2- Quelques inhibiteurs connus de la tyrosine kinase.....	40
IV -3-3- Conception d'inhibiteurs "multisubstrats" de l'activité PTK.....	43
ASTHME	47
I - Introduction.....	48
I -1- Inducteurs de l'inflammation et de l'obstruction bronchique.....	48
I -2- Réponse asthmatique immédiate et réponse asthmatique retardée.....	49
II - L'asthme : une maladie multifactorielle.....	50
II -1- Les différentes cellules inflammatoires impliquées.....	51
II -1-1- Mastocytes.....	51
II -1-2- Macrophages.....	53
II -1-3- Eosinophiles.....	53
II -1-4- Neutrophiles.....	54
II -1-5- Plaquettes.....	54
II -1-6- Lymphocytes.....	54
II -2- Les principaux médiateurs de l'inflammation et leur rôle au cours de la réponse asthmatique.....	55
II -2-1- Histamine.....	56
II -2-2- Dérivés de la 5-lipoxygénase.....	56
II -2-2-1- Leucotriène B ₄	57
II -2-2-2- Peptidoleucotriènes.....	57
II -2-2-2-1- Peptidoleucotriènes et bronchoconstriction.....	58
II -2-2-2-1- Peptidoleucotriènes et sécrétion du mucus.....	58
II -2-2-2-1- Peptidoleucotriènes et formation d'un œdème.....	59
II -2-3- Dérivés de la cyclooxygénase.....	59
II -2-4- PAF.....	59
II -2-5- Cytokines.....	61
II -2-6- Autres médiateurs.....	62
II -3- Épithélium bronchique et inflammation.....	62
III -3-1- Structure de l'épithélium bronchique.....	62

III -3-2- Épithélium bronchique et réponse inflammatoire.....	63
III -3-3- Prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires chez l'asthmatique.....	65
III - Drug design.....	67
III -1- Médicaments utilisés et principaux axes de recherche.....	67
III -1-1- Traitements de l'asthme.....	67
III -1-1-1- Bronchodilatateurs.....	67
III -1-1-2- Agents anti-inflammatoires.....	69
III -1-2- Principaux axes de recherche.....	70
III -1-2-1- Inhibition de la libération de médiateurs de l'inflammation.....	70
III -1-2-2- Antagonistes de médiateurs de l'inflammation.....	71
III -1-2-3- Immunothérapie.....	72
III -1-2-4- Action sur les neuromodulateurs.....	73
III -2- Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques.....	73
III -3- Inhibiteurs de la 5-LO et antagonistes du LTD ₄	74
III -3-1- Biosynthèse des leucotriènes.....	74
III -3-2- Inhibition de la 5-LO.....	77
III -3-2-1- Généralités sur la 5-LO.....	77
III -3-2-2- Mode d'action.....	77
III -3-2-3- Inhibiteurs de la 5-LO.....	78
III -3-2-4- Conception d'inhibiteurs potentiels de la 5-LO.....	83
STRATEGIE DE SYNTHÈSE.....	86
I - Synthèse des composés ouverts.....	88
I -1- Synthèse de la benzoylhydrazine 3 et de la benzènesulfonylhydrazine 4	88
I -2- Synthèse du dérivé benzoïque 6	88
I -3- Synthèse du dérivé salicylique 8	89
II - Synthèse des composés fermés non substitués par une chaîne éthylénique.....	91
II -1- Préparation de la 1-benzamido indoline 1 et de la 1-benzènesulfonylamino indoline 2	91
II -2- Préparation de la 1-acétamido indoline 11	92
II -3- Préparation de la 1-(4-carboxyphényl)sulfonylamino indoline 7	94
II -4- Préparation de la 1-benzamido-5-hydroxy indoline 5	95
II -5- Préparation des 1-benzamido-5-méthoxy indolines 10 et 12	97
III - Synthèse des dérivés fermés substitués par une chaîne éthylénique.....	100
III -1- Préparation de la (E)-1-(4-carboxyvinylène)benzamido)indoline 9	100
III -1-1- Première voie de synthèse envisagée.....	100
III-1-1-1- Passage par le chlorure d'acide.....	101
III-1-1-2- Utilisation d'un ester activé.....	101

III -1-1-3- Essais de protection du 4-carboxybenzaldéhyde 34	103
III -1-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.....	104
III -1-2-1- Obtention de la benzamido indoline 41	105
III -1-2-2- Hydrolyse basique de 41	106
III -2- Préparation de l'acide hexénoïque 13	107
III -2-1- Première voie de synthèse envisagée.....	107
III -2-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.....	109
III -2-3- Troisième voie envisagée.....	111
III -2-4- Quatrième voie de synthèse envisagée.....	116
III -3- Essai d'obtention de l'hydroxamate 14 et synthèse de l'amide 15	120
ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE	121
I - Test d'Irwin.....	122
I -1- But et principe.....	122
I -2- Résultats.....	122
II - Mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL.....	127
II -1- But et principe.....	127
II -2- Description des résultats.....	128
II-2-1- Détermination du temps d'incubation pour obtenir l'oxydation maximale.....	128
II -2-2- Mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL à des concentrations variables en produit à tester.....	129
II -2-3- Etude cinétique de l'oxydation des LDL pour une concentration en produit donnée.....	131
III - Evaluation de l'effet de substances sur l'activation, la prolifération et la survie de cellules musculaires lisses d'aorte de rat en culture.....	132
III -1- But et principe.....	132
III -2- Résultats.....	133
IV - Evaluation de l'effet de substances sur la prolifération de cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.....	135
IV- 1- But et principe.....	135
IV -2- Résultats.....	135
V - Inhibition de la 5-lipoxygénase.....	137
V -1- But et principe.....	137
V -2- Résultats.....	137
VI - Pourcentages d'inhibition de liaison spécifique obtenus avec les composés 13 et 15 testés sur les récepteurs LTB ₄ et LTD ₄	138
VI -1- But et principe.....	138
VI -2- Résultats.....	139

VII - Inhibition de la PDE IV par le composé 10	139
VII -1- But et principe.....	139
VII -2- Résultats.....	139
CONCLUSION	140
PARTIE EXPERIMENTALE	145
I - Remarques générales.....	146
II - Protocoles chimiques.....	148
II -1- Préparation des composés ouverts 3, 4, 6 et 8	148
II -2- Préparation des composés non substitués par une chaîne éthylénique 1, 2, 5, 7, 10, 11 et 12	153
II -3- Synthèse des dérivés fermés substitués par une chaîne éthylénique.....	164
II -3-1- Préparation du composé 9	164
II -3-1-1- Première voie de synthèse envisagée.....	164
II -3-1-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.....	166
II -3-2- Synthèse du dérivé hexénoïque 13	170
II -3-2-1- Première voie de synthèse envisagée.....	170
II -3-2-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.....	173
II -3-2-3- Troisième voie de synthèse envisagée.....	174
II -3-2-4- Quatrième voie de synthèse envisagée.....	178
II -3-3- Synthèse, à partir de l'acide 13 , du composé 15	184
III - Activité biologique.....	186
III -1- Test d'Irwin.....	186
III -2- Mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL.....	186
III -2-1- Préparation du sérum humain.....	186
III -2-2- Isolement des LDL.....	186
III -2-3- Oxydation des LDL.....	186
III -2-3-1- Suivi par électrophorèse.....	186
III -2-3-2- Suivi par UV.....	187
III -3- Evaluation de l'effet de substances sur l'activation, la prolifération et la survie de cellules musculaires lisses d'aorte de rat en culture.....	187
III -3-1- Préparation des cultures primaires de cellules musculaires lisses.....	187
III -3-2- Culture des cellules musculaires lisses.....	187
III -3-3- Arrêt de la croissance des cellules musculaires lisses.....	188
III -3-4- Activation des cellules musculaires lisses quiescentes.....	188
III -3-5- Détermination de la cytotoxicité.....	188
III -3-6- Inhibition de la prolifération.....	189

III -4- Evaluation de l'effet de substances sur la prolifération des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.....	189
III -4-1- Isolement des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.	189
III -4-2- Sous-cultures de cellules musculaires lisses.....	190
III -4-2- Inhibition de la prolifération.....	190
III -5- Inhibition de la 5-lipoxygénase.	191
III -5-1- Préparation des cellules.....	191
III -5-2- Procédure d'incubation.....	191
III -5-3- Mesure de l'activité.	191
III -6- Pourcentages d'inhibition de liaison spécifique sur les récepteurs LTB ₄ et LTD ₄	191
III -7- Inhibition de la PDE IV.....	192
III -7-1- Préparation des cellules.....	192
III -7-2- Mesure de l'activité phosphodiesterase.	192
III -7-3- Critères de validité.	192
REFERENCES.....	193

Abréviations pharmacologiques.

A-II	Angiotensine II
AAPH	Dichlorhydrate de 2,2'-azobis-amidinopropane
ACAT	Acyl Coenzyme A Cholesterol Acyltransferase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMN	p-hydroxybenzylidènemalonitrile
CD ₄	Lymphocyte T CD ₄
DAG	Diacylglycérol
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazine
ECFA	Eosinophil Chemotactic Factor
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EPO	Eosinophil Peroxydase
FA	Acide gras (Fatty Acid)
FEV	Forced Expiratory Volume
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLAP	5-Lipoxygenase Activating Protein
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
GP	Glycoprotéine
HDL	High-Density Lipoprotein
HETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HMG CoA réductase	3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl Coenzyme A réductase
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque
ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IDL	Lipoprotéine intermédiaire
IDP	Indapamide
IFN γ	Interféron γ
IgE	Immunoglobuline E
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukine
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
LCAT	Lecithine-Cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low-Density Lipoprotein

LH	Lipide
LO	Lipoxygénase
LPL	Lipoprotein Lipase
LT	Leucotriène
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
MAPK	Mitogen-Activated Kinase
MBP	Major Basic Protein
MCP-1	Monocyte-Chemotactic Protein-1
MDHC	Dihydrocinnamate de méthyle
NANC	Non-Adrenergic Non-Cholinergic
NCF	Neutrophil Chemotactic Factor
OH-IDP	Hydroxyindapamide
PAF	Platelet Activating Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Prostaglandine
PGI ₂	Prostacycline
PI-3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PKA	cAMP-depending Protein Kinase
PKC	Protéine Kinase C
PL	Phospholipide
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTK	Protéine-Tyrosine Kinase
RAT	Réponse Asthmatique Tardive
TBA	Acide thiobarbiturique
TGF	Transforming Growth Factor
Th	Lymphocyte T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
Toc	α-Tocophérol
TXA ₂	Thromboxane A ₂
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

Abréviations chimiques.

AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	Chloroforme deutérié
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCU	Dicyclohexylurée
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthyl-carbodiimide
EtOH	Ethanol
F	Point de fusion
HOBT	Hydrate du 1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
	λ longueur d'onde
	t_R temps de rétention
IR	Spectroscopie infrarouge
LiN(TMS) ₂	<i>bis</i> (triméthylsilyl)amidure de lithium
Masse	Spectrographie de masse
	IE Impact électronique
	FAB Fast Atom Bombardement
MEM	Méthoxyéthoxyméthyle
MeOH	Méthanol
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
	δ déplacement chimique
	s singulet
	d doublet
	t triplet
	q quadruplet
	m massif
	J constante de couplage
<i>t</i> Bu	<i>tertio</i> butyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TsOH	Acide <i>para</i> toluènesulfonique

INTRODUCTION

L'athérosclérose, la resténose et l'asthme sont trois maladies multifactorielles dans lesquelles sont impliquées de nombreuses cellules et divers médiateurs, et qui évoluent toutes vers un état inflammatoire. Dans le domaine cardiovasculaire, l'athérosclérose et la resténose sont très étudiées à l'heure actuelle. En effet, la lutte contre l'athérosclérose représente une cible de choix dans la prévention des maladies cardiovasculaires, puisque cette pathologie, responsable de la formation d'un thrombus au niveau de l'artère malade, augmente les risques d'infarctus du myocarde. La resténose se développe au niveau de l'artère athérosclérotique suite à une angioplastie - dont le but est de diminuer la taille du thrombus qui bouche l'artère - peut, elle aussi, être à l'origine d'accidents cardiovasculaires soudains. L'asthme, quant à lui, est une maladie chronique qui a pris une grande importance au cours des dernières décennies et qui peut également conduire au décès du patient.

Bien que ces pathologies appartiennent à des domaines distincts et bien que leurs développements diffèrent largement, puisque nous avons d'une part des maladies cardiovasculaires, et d'autre part une pathologie chronique plutôt due à des réactions de type allergiques, il est possible d'envisager des stratégies médicamenteuses communes.

Nous avons remarqué que les développements de l'athérosclérose et de l'asthme sont en particulier assurés par des mécanismes d'oxydation. En effet, une caractéristique majeure de l'athérosclérose est l'oxydation des LDL (Low Density Lipoproteins), responsable de la formation de cellules spumeuses puis de la genèse de la plaque d'athérome conduisant à un thrombus. L'utilisation d'un antioxydant pourrait inhiber cette oxydation, et permettre ainsi de limiter le développement de la plaque d'athérome. Une stratégie antioxydante est d'autre part applicable dans l'asthme, puisque la 5-lipoxygénase, responsable de la libération des peptidoleucotriènes (agents bronchoconstricteurs puissants et participant également à la pérennisation de la réponse inflammatoire) agit selon un mécanisme radicalaire. Après avoir montré l'activité d'une molécule antioxydante dans chacune de ces pathologies, il sera nécessaire de lui adjoindre des vecteurs ou des groupements différents selon la pathologie visée.

D'autre part, ces trois maladies sont caractérisées par une prolifération anormale des cellules musculaires lisses - vasculaires en ce qui concerne l'athérosclérose et la resténose, et trachéobronchiques en ce qui concerne l'asthme -. Des inhibiteurs de la prolifération de ces cellules, parmi lesquels des inhibiteurs de l'activité protéine-tyrosine kinase, pourraient limiter l'expansion et l'aggravation de ces maladies.

Nous avons présenté ces concepts dans deux parties bien distinctes. La première concerne les pathologies cardiovasculaires ; après nous être intéressée aux mécanismes et aux divers facteurs impliqués dans le développement de l'athérosclérose, puis dans celui de la resténose, nous envisagerons une stratégie antioxydante (applicable plus particulièrement à l'athérosclérose), puis une stratégie antiproliférative qui pourrait être utilisée dans les deux cas, bien que plus intéressante pour lutter contre la resténose. Dans une deuxième partie, nous nous intéresserons à la maladie asthmatique ; après avoir décrit l'état actuel des connaissances, nous évoquerons les avantages d'une thérapie antiproliférative, puis nous développerons une stratégie antioxydante.

Nous avons essayé, dans tous les cas, de réaliser une conception rationnelle de médicaments en fonction de la pathologie visée et des mécanismes semblant intervenir. Toutefois, tous les composés que nous avons envisagés possèdent une structure N-amino indolinique, ou une structure analogue ouverte, qui dérive de l'indapamide, médicament utilisé dans le traitement de l'hypertension mais qui a montré une capacité à capter les radicaux libres (cette propriété a été associée au caractère capto-datif de l'indapamide). Nous avons réalisé plusieurs pharmacomodulations sur ce squelette en conservant les éléments responsables de cette activité, ce qui nous permet d'accéder à des molécules ayant d'une part des propriétés antioxydantes, et étant d'autre part des capteurs de radicaux libres.

ATHEROSCLEROSE
ET RESTENOSE

I - Maladies cardiovasculaires : importance économique.

En France comme dans tous les pays à haut niveau de vie, 36 % des décès sont le fait de complications cardiovasculaires. Toutes les études épidémiologiques ont permis de dresser la liste des différents facteurs de risque cardiovasculaire. Trois facteurs sont de la plus grande importance : l'hypertension artérielle, le tabagisme et les hyperlipidémies (Turpin, 1989).

Les maladies cardiovasculaires font partie actuellement des principales cibles thérapeutiques. Dans ce seul domaine, l'arrivée de nouvelles thérapeutiques réellement efficaces, conçues pour traiter les causes et non les symptômes de ces maladies, pourrait entraîner une économie de plus de 200 milliards de dollars rien qu'aux USA sur la période 1991-2015 (tableau 1) (Wülfert, 1991).

Maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires	210 milliards de \$
Arthrite rhumatoïde et ostéoarthrite	161 milliards de \$
Maladie d'Alzheimer	68 milliards de \$
SIDA	11 milliards de \$
Cancer du poumon	11 milliards de \$

Tableau 1 : Réductions possibles des dépenses de santé publique aux USA dues à l'introduction de thérapeutiques nouvelles (1991-2015) (données du "Medical Technology Assessment and Policy Research Center, Battelle, Washington DC") (Wülfert, 1991).

Il est reconnu aujourd'hui que l'hypercholestérolémie est le premier facteur de risque déterminant de l'athérosclérose (figure 1). La majorité du cholestérol provient des LDL oxydées (Low-Density Lipoproteins). Or, plus de la moitié des personnes vivant dans les pays industrialisés ont une concentration sanguine en LDL qui augmente la probabilité d'avoir des LDL oxydées et pourrait donc favoriser le développement de l'athérosclérose et, par ce fait même, augmenter les risques d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux (Brown, Goldstein, 1985). Lutter contre l'athérosclérose semble donc un moyen efficace de prévention de maladies cardiovasculaires. C'est une des raisons pour lesquelles nous l'avons choisi comme but thérapeutique pour ce travail.

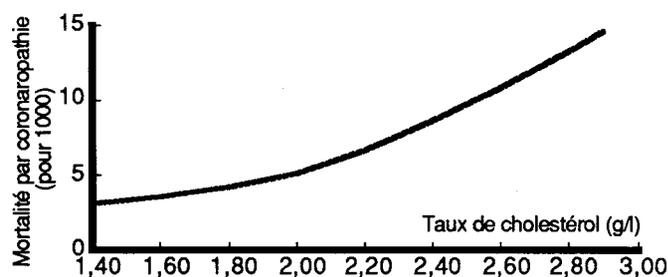


Figure 1 : Relation entre la mortalité par coronaropathie et le taux de cholestérol total dans une population de 361 662 hommes (Turpin, 1989).

II - Pathologie de l'athérosclérose.

II -1- Les différents types de lésions vasculaires.

Des formes diverses d'agressions sont susceptibles de provoquer le développement de lésions athérosclérotiques au niveau des artères, notamment en endommageant l'épithélium vasculaire. Les lipides et les lipoprotéines associées aux hyperlipidémies sont principalement responsables de la lésion endothéliale, mais d'autres agents tels que la fumée de cigarette, l'hypertension, le diabète et certains agents infectieux sont également impliqués.

Au cours du développement de la lésion athérosclérotique, différents stades ont été définis. Dans un premier temps, on observe des stries lipidiques ou "fatty streaks" caractérisées par un amas de macrophages chargés en lipides - appelés cellules spumeuses -, de lymphocytes T et de quelques cellules musculaires lisses sous l'endothélium vasculaire. Ces lésions apparaissent surtout au niveau des bifurcations des artères, là où les variations de flux sanguin sont courantes. La lésion intermédiaire ou fibrolipidique est composée de macrophages, de lymphocytes T et de nombreuses cellules musculaires lisses qui se sont accumulées dans la paroi des artères. Tous ces organites vont peu à peu former un chapeau de protection au-dessus de la zone endommagée de l'épithélium, et donner naissance à la plaque d'athérome ou plaque fibreuse. Ces cellules sont associées à divers débris cellulaires, à des lipides, des cristaux de cholestérol, des dépôts calciques et des matériaux provenant du sang. La plaque d'athérome est susceptible de se fissurer ou de se rompre, ce qui conduit à une forme d'athérosclérose tardive. Cette dénudation endothéliale résulte en l'exposition du collagène, des cellules musculaires lisses et des lipides accumulés dans l'espace subendothélial à des facteurs externes. Les fonctions plaquettaires sont alors activées et le mécanisme de la cascade de la coagulation se met en place, d'où la formation d'un thrombus (Stary, 1989 ; Ross, 1993 a et b ; Badimon et coll., 1993).

Ainsi, au cours du développement de la pathologie de l'athérosclérose, plusieurs types de cellules sont impliqués, notamment les monocytes / macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Parmi les facteurs responsables des modifications fonctionnelles de ces cellules, les lipoprotéines chargées du transport du cholestérol dans l'organisme semblent être les plus importants. Avant de nous intéresser aux mécanismes de la dénudation endothéliale et aux systèmes de réparation alors mis en jeu, nous allons donc évoquer le métabolisme du cholestérol dans l'organisme.

II -2- Transport du cholestérol dans l'organisme.

Le cholestérol est un élément indispensable au métabolisme des cellules : il sert à l'édification des membranes cellulaires, module leur fluidité, permettant ainsi le maintien de la barrière entre la cellule et son environnement. C'est aussi le précurseur de nombreuses biosynthèses : biosynthèses

des hormones stéroïdes et des acides biliaires (Brown, Goldstein, 1986). Les cellules sont capables, de par leur matériel enzymatique, de synthétiser le cholestérol mais ce dernier provient surtout de l'apport alimentaire et de la synthèse hépatique. Cependant l'excès de cholestérol, dû principalement à un dysfonctionnement de son "système de transport", est nuisible à la santé et conduit à la formation de plaques d'athérome.

II -2-1- Les différentes lipoprotéines.

Le cholestérol, tout comme d'autres lipides de l'organisme, est transporté par des macromolécules sphériques appelées lipoprotéines (Fruchart, Broutin-Hanaire, 1987) (figure 2). Leur noyau est constitué de lipides très hydrophobes (triglycérides, cholestérol estérifié), alors que leur enveloppe est constituée de phospholipides et de protéines spécifiques, les apolipoprotéines, qui participent à la structure et aux différents processus du métabolisme des lipoprotéines (biosynthèse, sécrétion, maturation et transformation plasmatique, échanges de constituants avec les cellules de l'organisme, et catabolisme). Plusieurs apolipoprotéines ont été caractérisées : AI, AII, AIV, B48, B100, CI, CII, CIII, D, E (dont on distingue 6 phénotypes : E4/4, E3/3, E2/2, E4/3, E4/2, E3/2) et (a) (Clavey, 1990 ; Ginsberg, 1994 ; Kreuzer, von Hodenberg, 1994). Elles activent des systèmes enzymatiques du métabolisme des lipoprotéines, ont un rôle de reconnaissance des récepteurs cellulaires capables de capter les lipoprotéines et sont responsables du transport réversible du cholestérol (Fruchart, Broutin-Hanaire, 1987 ; Ginsberg, 1994).

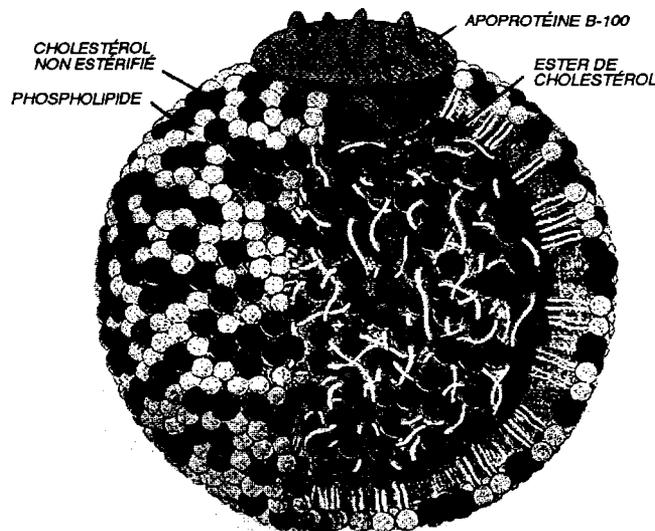


Figure 2 : Exemple de structure d'une lipoprotéine : la LDL (Brown, Goldstein, 1985).

Les lipoprotéines plasmatiques, hétérogènes, sont soumises à de constantes modifications. Leur classification usuelle repose sur des critères d'électrophorèse ou d'ultracentrifugation. On distingue ainsi, par ordre de taille décroissante, quatre grandes classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL (Very Low-Density Lipoproteins), les LDL (Low-Density Lipoproteins) et les HDL (High-Density Lipoproteins). Le cholestérol se trouve surtout dans ces LDL et ces HDL.

Deux organes sont impliqués dans la biosynthèse et la sécrétion des lipoprotéines et donc dans le transport du cholestérol : l'intestin et le foie (Fruchart, Broutin-Hanaire, 1987) (figure 3). Si la muqueuse intestinale ne synthétise les chylomicrons à partir des graisses ingérées qu'après un repas, elle forme par contre des VLDL à tout moment. Ces lipoprotéines, après avoir été sécrétées dans la lymphe, rejoignent la circulation générale. Elles sont chargées en cholestérol et en triglycérides d'origine **exogène**. Le foie synthétise et excrète dans le sang des HDL et des VLDL. Ces dernières transportent des triglycérides **endogènes** formés dans l'hépatocyte.

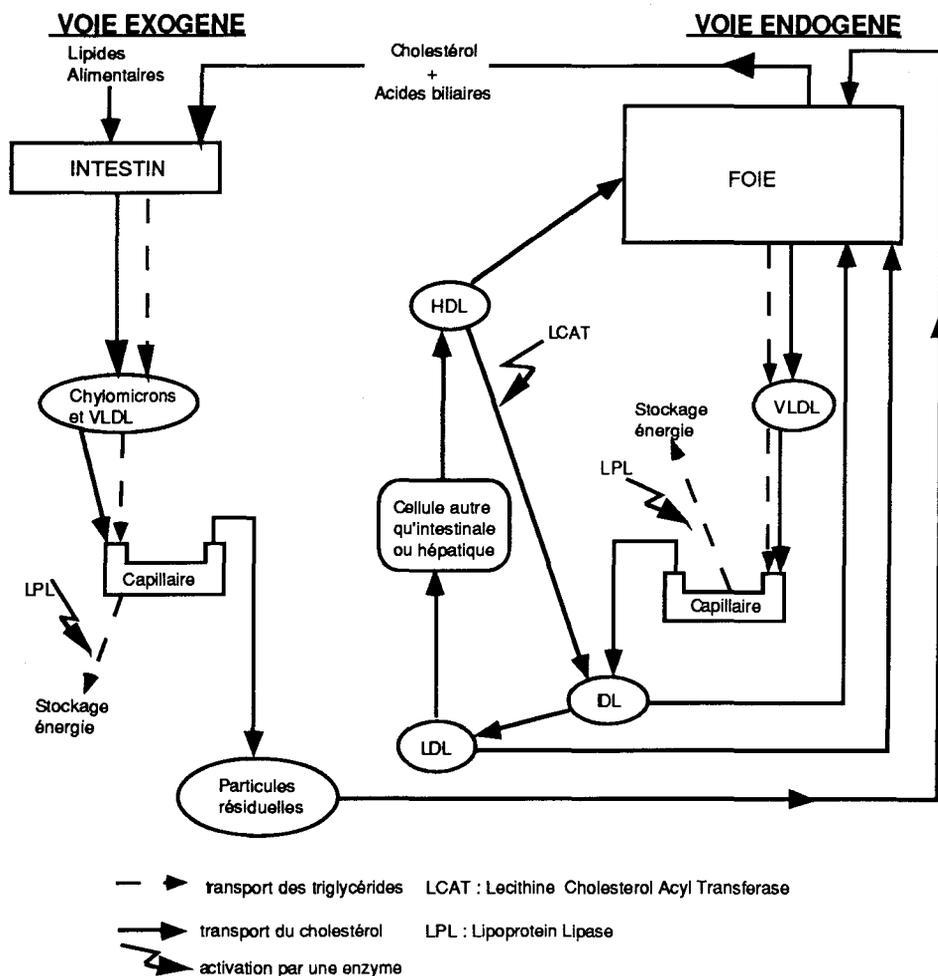


Figure 3 : Schéma simplifié du transport du cholestérol (Fruchart, Broutin-Hanaire, 1987; Brown, Goldstein, 1985).

Dans le sang, les chylomicrons et les VLDL d'origine intestinale reçoivent des HDL un complément d'apolipoprotéines (en particulier l'apolipoprotéine CII activatrice de la LPL (Lipoprotéine Lipase)) qui les transforment en particules résiduelles appauvries en triglycérides captées ensuite par le foie au niveau de récepteurs spécifiques de l'apolipoprotéine E. Le métabolisme des VLDL d'origine hépatique, quant à lui, dépend au moins de deux enzymes : la LPL qui hydrolyse les triglycérides et la LCAT (Lécithine-Cholestérol Acyl Transférase) responsable au niveau sanguin de

l'estérification du cholestérol. Les particules résiduelles des VLDL, les IDL (Lipoprotéines Intermédiaires), sont captées directement par le foie ou transformées en LDL après fixation à des récepteurs spécifiques situés à la surface de nombreuses cellules de l'organisme et internalisation.

C'est l'avenir de ces LDL, que nous développons ci-après, qui décide de la voie "normale" ou "pathologique" du cholestérol.

Indépendamment des implications déjà décrites, un rôle essentiel des HDL est d'assurer le retour du cholestérol au foie, seul organe capable de le cataboliser et de l'excréter.

II -2-2- Voie normale du cholestérol des LDL.

A la surface de toute cellule humaine existe une protéine spécialisée, le récepteur LDL, qui lie l'apolipoprotéine B des LDL avec une grande affinité, ce qui provoque leur capture hautement régulée par la cellule (Witzum, 1989) (figure 4). Dans un premier temps, les lipoprotéines se lient aux récepteurs situés dans les "puits tapissés" recouverts d'une protéine, la clathrine (Fruchart, Broutin-Hanaire, 1987). Il y a ensuite formation de vésicules d'endocytose qui contiennent les complexes lipoprotéines-récepteurs (Brown, Goldstein, 1985). Celle-ci fusionnent entre elles pour donner des endosomes, où un changement de pH provoque la dissociation des complexes lipoprotéines-récepteurs. Le récepteur est alors recyclé vers la surface de la cellule et la lipoprotéine migre vers les lysosomes pour y être dégradée. L'apolipoprotéine B est dégradée en acides aminés. Le cholestérol libéré est utilisable notamment par la cellule pour la régénération de sa membrane ainsi que pour la synthèse des hormones stéroïdes et des acides biliaires. Il peut aussi être réestérifié à l'aide de l'ACAT (Acyl-CoA-Cholestérol-Acyltransférase) puis stocké. Ce système est responsable, chez un homme normal, de 75 % de l'élimination des LDL du sang.

La libération du cholestérol entraîne toute une série de rétrocontrôles destinés à protéger la cellule d'une surcharge éventuelle (Brown, Goldstein, 1986) :

- répression éventuelle de l'activité de l'enzyme HMG CoA réductase (3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl Coenzyme A Réductase) qui contrôle la biosynthèse du cholestérol.
- activation possible de l'ACAT (Acyl-CoA-Cholestérol-Acyltransférase).
- inhibition de la synthèse de nouveaux récepteurs quand la quantité de cholestérol dans la cellule est suffisante. Les cellules ajustent ainsi à leurs besoins en cholestérol le nombre de récepteurs qu'elles portent en surface.

Ce système de régulation permet à la cellule d'avoir assez de cholestérol pour ses besoins physiologiques, mais il empêche également une accumulation d'esters de cholestérol qui pourrait être toxique pour la cellule.

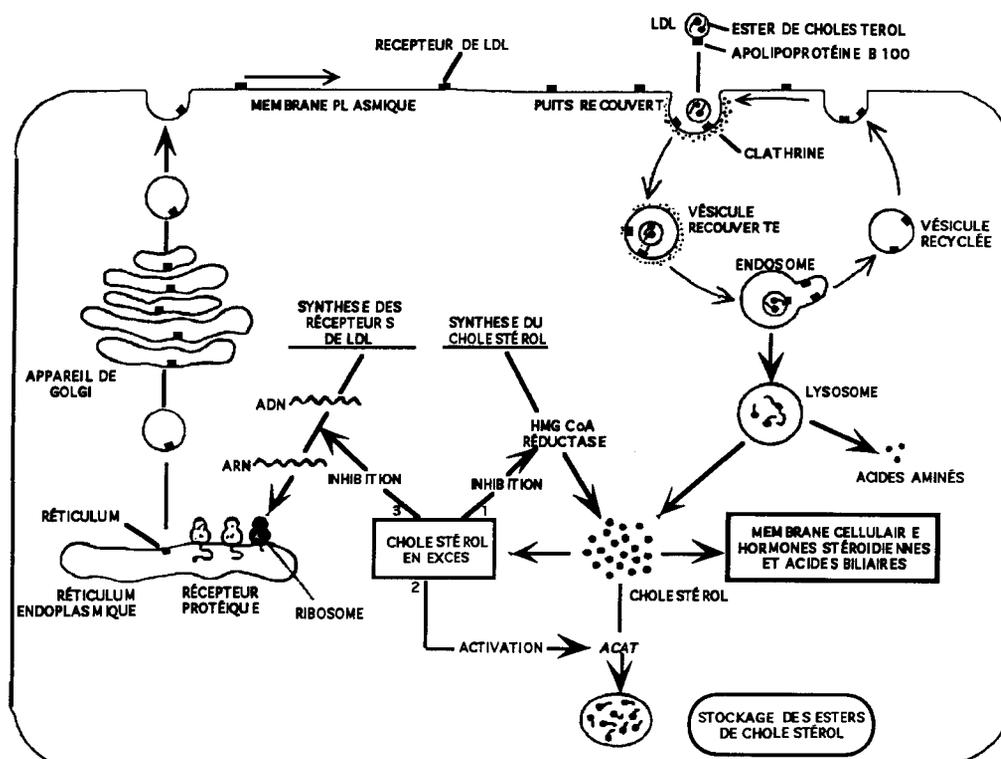


Figure 4 : Mécanismes d'action des récepteurs LDL (Brown, Goldstein, 1985).

II -2-3- Voie pathologique du cholestérol des LDL.

Des études cliniques et expérimentales ont clairement établi que le développement de l'athérosclérose est lié à des concentrations plasmatiques élevées en LDL (Steinberg et coll., 1989) résultant elles-mêmes d'une déficience en récepteurs LDL (Brown, Goldstein, 1985). Ces LDL en excès pourraient subir des modifications (Brown, Goldstein, 1985), dont une oxydation (Steinberg, 1988), et par ce fait même subir une série de changements physiques et chimiques importants.

On sait aujourd'hui que plusieurs types de cellules sont capables d'induire cette modification des LDL (Steinbrecher et coll., 1990) : les cellules endothéliales (déjà citées par Henriksen en 1981), les cellules musculaires lisses, les monocytes / macrophages, les fibroblastes. Notons que cette oxydation peut également être réalisée par incubation de LDL dans un milieu non cellulaire contenant des ions cuivriques (Steinbrecher et coll., 1990).

Les LDL oxydées sont captées par les macrophages, situés dans l'intima des cellules endothéliales des artères, via des récepteurs aux LDL acétylées appelés aussi "récepteurs scavengers" (Esterbauer et coll., 1990) (figure 5).

Une fois capturées, les LDL oxydées sont dégradées. Il y a ainsi une accumulation massive de cholestérol dans les macrophages et formation de cellules spumeuses (Steinberg et coll., 1989). Les LDL oxydées participent aussi au recrutement des monocytes dans l'intima et favorisent leur rétention dès qu'ils sont transformés en macrophages (Steinberg, 1988). Ceci se fait via un chimiotactisme

attribué à la partie lipidique des LDL oxydées et plus précisément à la lysolécithine générée durant l'oxydation (Steinberg et coll., 1989).

Une série d'événements entre alors en jeu : adhérence et agrégation plaquettaires, destruction des cellules endothéliales, libération d'hormones comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), croissance et multiplication des cellules musculaires lisses de la couche située sous l'endothélium, accumulation de cholestérol autour des cellules, ce qui mène à la génération de la plaque d'athérome responsable petit à petit de l'obstruction des vaisseaux sanguins.

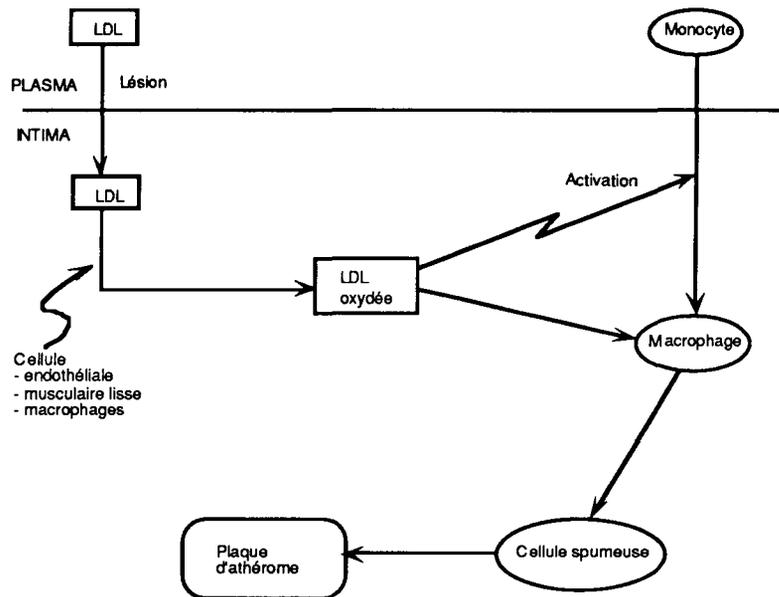


Figure 5 : Mécanisme de formation de la plaque d'athérome (Steinberg, 1988).

II -3- La plaque d'athérome.

II -3-1- Principales cellules impliquées.

II -3-1-1- Cellules endothéliales.

Les facteurs de risque de l'athérosclérose sont associés à la génération d'agents biologiquement actifs responsables du dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire et conduisant à une réponse de type inflammatoire. L'endothélium vasculaire à l'état normal possède plusieurs rôles physiologiques :

- Il constitue une barrière au travers de laquelle il y a échange et transport actif de substances.
- L'endothélium vasculaire est une surface non thrombogénique et ne présente pas d'adhérence vis-à-vis des leucocytes.
- Il permet le maintien du tonus vasculaire grâce à la libération de petites molécules vasoactives comme NO, la prostacycline (PGI₂) et l'endothéline (ET).

- Les cellules endothéliales produisent et sécrètent des molécules régulatrices de la croissance et des cytokines.
- Elles synthétisent également des macromolécules entrant dans la composition de la matrice des tissus de connexion.
- L'endothélium possède la faculté d'oxyder les lipoprotéines qui ont pénétré la paroi des artères.

L'altération de l'une ou l'autre de ces fonctions peut être responsable du dysfonctionnement de l'endothélium observé dans l'athérosclérose. Il semblerait que les LDL oxydées contribuent activement à ce phénomène. En effet, une fois oxydées (probablement par les cellules endothéliales elles-mêmes), les LDL vont blesser l'endothélium vasculaire puis jouer un rôle au niveau de la migration et de l'adhérence des monocytes et des lymphocytes T dans l'espace subendothélial (Brown, Goldstein, 1985 ; Steinberg, 1988 ; Steinberg et coll., 1989 ; Kuzuya et coll., 1991).

Les cellules endothéliales ont la propriété de proliférer de façon linéaire (l'endothélium est monocouche). Lorsque l'endothélium est blessé, les cellules endothéliales voisines de la lésion vont avoir tendance à s'étendre afin de rétablir les connexions intercellulaires qui ont été détruites. Lorsque la blessure est trop étendue pour rétablir un contact, ces cellules vont se répliquer. On peut supposer que si l'endothélium est lésé plusieurs fois au même endroit (de façon chronique), les cellules endothéliales voisines de la blessure vont subir suffisamment de réplifications pour atteindre finalement un état de sénescence ; les cellules plus éloignées de la zone endommagée, qui ont conservé leur faculté à se répliquer, ne pourront pas participer au recouvrement de la blessure, du fait de restrictions inhibitrices liées à la structure monocouche de l'épithélium. Ainsi, des attaques répétées de l'épithélium pourraient résulter en une incapacité des cellules voisines de la blessure à se répliquer, d'où l'altération de la surface de l'artère (Ross, 1993 a).

Les cellules endothéliales endommagées synthétisent et sécrètent des molécules d'adhésion telles que l'ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) et la VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) ; des facteurs chimiotactiques tels que le "monocyte-specific factor" et la MCP-1 (Monocyte-Chemotactic Protein-1) ; l'interleukine-1 (IL-1) ; des facteurs de croissance comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor) et le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor). Ces facteurs sont responsables du recrutement et de l'activation des autres cellules impliquées dans la formation de la plaque d'athérome, principalement les monocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires (Ross, 1993 a et b ; Badimon et coll., 1993).

II -3-1-2- Monocytes / macrophages.

Les macrophages, présents à tous les stades du développement de la maladie athérosclérotique, ont pour origine les monocytes circulants du sang.

Les monocytes, cellules de type inflammatoire, sont recrutés dans l'intima des artères via des mécanismes mettant en jeu des glycoprotéines situées à leur surface (GP-90, GP-155, GP-160) (Prieto et coll., 1988), des facteurs chimiotactiques (MCP-1, Monocyte-Specific Factor) (Schwartz et coll., 1991 a) mais aussi les LDL oxydées (Steinberg, 1988). Notons que ces dernières sont non seulement chimiotactiques pour les monocytes mais qu'elles sont capables d'induire la synthèse de MCP-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Une fois dans l'intima, les monocytes circulants se transforment en macrophages résidents par phagocytose de lipides.

Les macrophages possèdent à leur surface des récepteurs aux LDL qui captent et dégradent ces lipoprotéines. Le rôle de ces récepteurs est de maintenir le taux intracellulaire de cholestérol ; un système de régulation permet d'éviter l'accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages (Brown, Goldstein, 1986). D'autre part, les macrophages possèdent des récepteurs aux LDL acétylées ou récepteurs "scavengers" qui sont capables de capter les LDL oxydées. Ces récepteurs ne sont soumis à aucun système de régulation. Les LDL oxydées ainsi captées sont dégradées, ce qui conduit à l'accumulation de cholestérol estérifié dans les macrophages puis à l'apparition de cellules spumeuses, constituants principaux de la lésion fibrolipidique (première lésion athérosclérotique observée) (Brown, Goldstein, 1986 ; Steinberg, 1988 ; Parthasarathy et coll., 1989).

Les macrophages sont enfin responsables de la libération de facteurs de croissance - dont le PDGF - et de cytokines (IL-1, TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)). Ces facteurs participent à la mise en place de la réponse inflammatoire vasculaire en agissant notamment sur les cellules musculaires lisses (Ross, 1993 a).

II -3-1-3- Cellules musculaires lisses vasculaires.

Les cellules musculaires lisses sont divisées en deux types : le phénotype contractile et le phénotype synthétique.

Les cellules musculaires lisses contractiles sont responsables du maintien de la paroi des artères. Elles répondent à des agents qui induisent soit la relaxation (NO), soit la contraction (endothéline (ET), cathécholamines, angiotensine II (A-II), leucotriènes) des vaisseaux sanguins.

Les cellules musculaires lisses des lésions athérosclérotiques appartiennent au phénotype synthétique et possèdent des organelles de synthèse (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique rugueux...). Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs spécifiques de certains facteurs de croissance et de cytokines (PDGF, IL-1, TNF- α ...) (Ross, 1993 a).

Lorsque les cellules endothéliales ont été détériorées, les cellules musculaires lisses appartenant au phénotype synthétique sont recrutées dans l'intima de l'artère par différents agents chimiotactiques libérés par les cellules endothéliales et les macrophages (PDGF, IGF-I (Insuline-like Growth Factor)). Certaines d'entre elles prolifèrent sous l'action de facteurs de croissance (PDGF, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), IGF-I). D'autres cellules musculaires

synthétiques sont incapables de se diviser et s'hypertrophient (Badimon et coll., 1993 ; Ross, 1993 b).

Les cellules musculaires lisses, comme les macrophages, peuvent capter les LDL oxydées via les récepteurs "scavengers" de leur membrane. Des cellules spumeuses dérivées des cellules musculaires lisses apparaissent ainsi dans la paroi du vaisseau (Goldstein, Brown, 1977 ; Dusserre et coll., 1994).

Mais, dans l'athérosclérose, le rôle prédominant des cellules musculaires est la synthèse de composants de la matrice extracellulaire qui va former petit à petit un chapeau au dessus de la lésion et contribuer à la progression de la pathologie. Les cellules musculaires lisses, stimulées par les facteurs de croissance cités précédemment, forment des protéoglycanes, de l'élastine et du collagène. Le sulfate de dermatane est le protéoglycane majoritaire de la plaque d'athérome ; il lie les lipides à la paroi de l'artère. L'élastine semble être importante au niveau de la capture des lipides. Le collagène (surtout le collagène de type I), est impliqué dans la croissance de la plaque d'athérome (Ross, 1993 a et b ; Badimon et coll., 1993 ; MacLeod et coll., 1994).

Enfin, les cellules musculaires lisses des lésions libèrent, tout comme les autres cellules impliquées dans l'athérosclérose, des molécules régulatrices de croissance et des agents chimiotactiques.

D'autres cellules peuvent participer à la genèse de la plaque d'athérome. Par exemple, les lymphocytes T entrent dans la composition des lésions fibrolipidique aux côtés des macrophages. Les plaquettes sont également impliquées : des études réalisées *in vivo* ont montré que la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires étaient précédées par l'adhésion et la dégranulation de plaquettes. Les fibroblastes, tout comme les cellules musculaires lisses, synthétisent des composants de la matrice extracellulaire.

II -3-2- Mécanismes de formation de la plaque d'athérome.

Comme nous venons de le décrire, trois processus semblent être impliqués dans le développement des lésions athérosclérotiques :

- l'accumulation de lipides dans les macrophages mais aussi dans les cellules musculaires lisses vasculaires et dans les tissus.
- la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires.
- la synthèse, par les cellules musculaires, de la matrice des tissus de connexion comprenant des protéines des fibres élastiques, du collagène et des protéoglycanes.

Dans quel ordre agissent ces différents facteurs, comment interagissent-ils pour former la plaque d'athérome ? Brown (1993 a) a proposé l'hypothèse suivante pour le développement de l'athérosclérose.

L'origine de la formation de cette plaque semble être la genèse, sous l'influence de différents facteurs, dont les LDL oxydées, de lésions des cellules endothéliales qui tapissent l'artère normale

(figure 6a). Un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire, caractérisé par une augmentation de l'adhérence des monocytes/macrophages et des lymphocytes T, en résulte (figure 6b). Ces cellules traversent l'endothélium et vont prendre place dans l'espace subendothélial. Là, les macrophages captent des LDL oxydées ; ils se chargent en cholestérol et se transforment en cellules spumeuses chargées de lipides. Les cellules spumeuses, les lymphocytes T ainsi que quelques cellules musculaires lisses forment la strie lipidique (fatty streak), première lésion caractéristique de l'athérosclérose (figure 6c).

L'accumulation non régulée de cholestérol dans les macrophages est responsable de la destruction de ces cellules qui libèrent alors des LDL oxydées et des radicaux libres oxygénés toxiques pour les cellules, et en particulier pour les cellules endothéliales. Suite à cette dénudation endothéliale, les cellules spumeuses et les protéines de la matrice de connexion ne sont plus protégées et deviennent des sites vers lesquels les plaquettes du sang migrent (figure 6d). Après adhésion, agrégation puis dégranulation des plaquettes qui libèrent principalement le PDGF, les cellules musculaires lisses vasculaires sont recrutées dans l'intima de l'artère. Le PDGF a une activité chimiotactique vis-à-vis des cellules musculaires lisses vasculaires lisses mais agit également sur leur croissance. Les cellules musculaires lisses, suivant leur nature, prolifèrent ou s'hypertrophient. Elles produisent aussi des protéines de la matrice des tissus, du collagène et des protéoglycanes qui s'accumulent en dessous dans la paroi des artères. Ce sont les lésions intermédiaires ou lésions fibrolipidiques.

La détérioration de l'endothélium vasculaire ayant un caractère chronique, la lésion continue à évoluer. La prolifération des cellules musculaires et des macrophages, l'accumulation de lipides et la formation toujours plus importante de tissus de connexion provoquent une augmentation de la taille de la lésion jusqu'à ce que la partie centrale de la lésion soit recouverte d'un "chapeau" fibreux très dense, les bordures de la lésion étant protégées par une couche fibreuse moins épaisse chargée de macrophages. La plaque d'athérome est ainsi formée et a tendance à obstruer la lumière des artères (figure 6e).

Chaque étape du développement de la plaque d'athérome est potentiellement réversible. Ainsi, dans le cas où on supprimerait les agents responsables du dysfonctionnement des cellules endothéliales ou si on utilisait des agents protecteurs, on pourrait peut-être inverser les processus d'inflammation et de prolifération, et revenir à une situation normale. Par contre, si les conditions persistent, on assiste à la rupture de la plaque d'athérome.

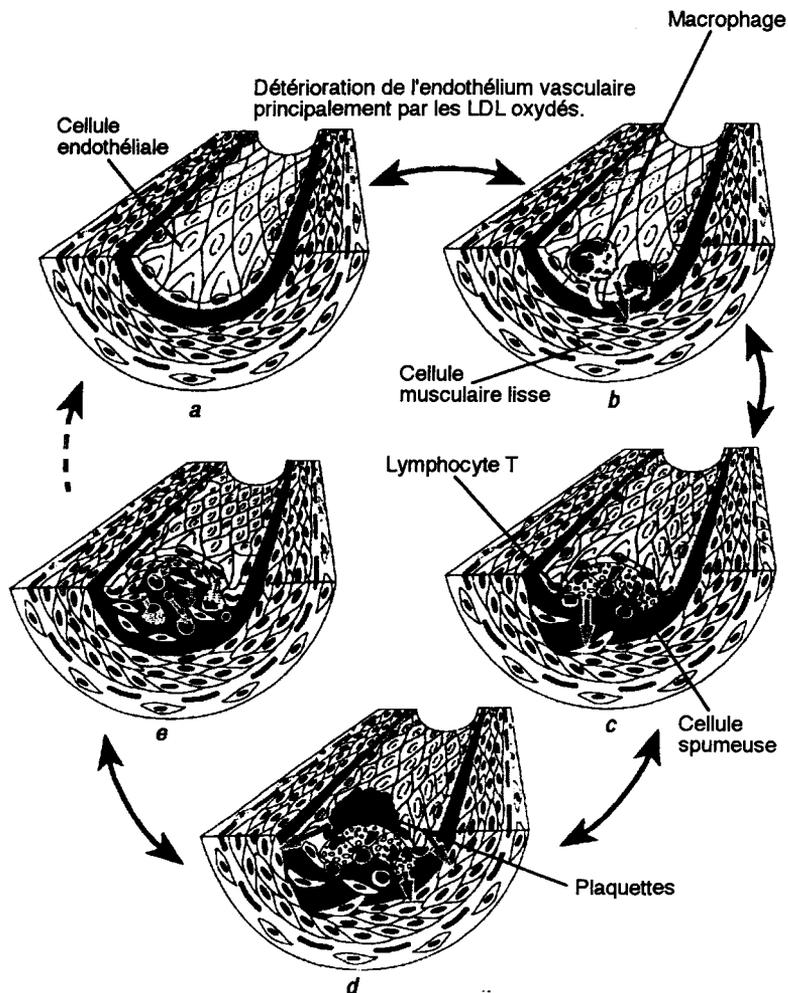


Figure 6 : Hypothèse concernant le développement, potentiellement réversible, de la plaque d'athérome (Brown, 1993 a).

II -3-3- Lésions avancées de l'athérosclérose.

Les mécanismes responsables de la rupture de la plaque d'athérome ne sont pas connus à l'heure actuelle. Il semblerait cependant que cette rupture, conduisant à la formation d'un thrombus, soit associée à un processus inflammatoire local. En effet, van der Wal et coll. (1994) ont montré que les macrophages et les lymphocytes T, cellules clés d'une inflammation chronique, sont présents en grand nombre aux endroits où la plaque se fissure, alors qu'elle est ailleurs essentiellement composée de cellules musculaires lisses et de tissus fibreux. L'inflammation serait donc impliquée dans la déstabilisation des tissus fibreux formant un chapeau protecteur au dessus de la lésion ; les macrophages activés, de par leur production d'enzymes lytiques (collagénases, élastases, protéases) et de métabolites oxygénés toxiques, pourraient induire la rupture de la plaque. On peut également penser que les facteurs hémodynamiques auxquels la plaque d'athérome est soumise peuvent avoir une influence dans les processus d'érosion et de rupture de la plaque (van der Wal et coll., 1994 ; Maximilian Buja, Willerson, 1994).

Quels que soient les mécanismes responsables de la naissance d'une brèche dans la plaque d'athérome, ils aboutissent tous en l'exposition du collagène, des lipides et des cellules musculaires lisses à des facteurs externes. On assiste alors à une activation des plaquettes et à la mise en place de la cascade de coagulation. Le thrombus ainsi formé rétrécit encore un peu plus la lumière de l'artère. Il peut aussi se réorganiser et être réintégré à la paroi de l'artère endommagée, contribuant ainsi à une progression accrue de l'athérosclérose et à l'apparition de syndromes coronaires (angine de poitrine, infarctus du myocarde) pouvant provoquer la mort soudaine du patient (Badimon et coll., 1993).

Comme nous le voyons, l'athérosclérose est une maladie multifactorielle au cours de laquelle sont impliquées différentes cellules, des facteurs de croissance, des cytokines, des protéines et des enzymes. La prolifération des cellules et la production de la matrice extracellulaire, mécanismes destinés au départ à la réparation de la lésion, sont responsables de la dénudation endothéliale, d'un épaissement de la paroi associée à une diminution de la lumière de l'artère endommagée, puis de la formation d'un thrombus. Les complications cardiovasculaires qui en découlent sont nombreuses. Lutter contre le développement de la plaque d'athérome est une méthode de prévention des maladies cardiovasculaires.

III - La resténose après angioplastie.

III -1- Angioplastie et conséquences.

L'angioplastie coronaire transluminale percutanée est une technique chirurgicale qui a été développée par Grüntzig en 1977 pour le traitement de l'obstruction des artères due à l'athérosclérose. Cette intervention consiste à introduire, dans le vaisseau partiellement obstrué par la plaque d'athérome, un système de cathéters. Un cathéter de guidage est positionné dans l'orifice de l'artère qui requiert une intervention ; il sert de guide au cathéter de dilatation dans les branches athérosclérotiques de l'artère. Le cathéter de dilatation possède, à son extrémité, un segment gonflable. Une fois que ce ballon a été positionné au niveau de la zone à traiter, il est gonflé sous une pression de 4-5 bars durant 3 à 4 secondes. Le matériel athérosclérotique est comprimé dans une direction perpendiculaire à la paroi, ce qui permet d'agrandir la lumière du vaisseau (Grüntzig, 1978 ; Grüntzig et coll., 1979).

Cependant, dans les six mois qui suivent l'opération, une cicatrisation exubérante de la blessure provoque la resténose dans 25 à 50 % des cas : la lumière de l'artère traitée diminue de nouveau, avec apparition de nouvelles complications cardiovasculaires pouvant entraîner jusqu'à la mort du patient (Ip et coll., 1990 ; Forrester et coll., 1991 ; Becker, 1992).

La resténose après angioplastie apparaît comme une réponse de cicatrisation limitée à la zone de la paroi vasculaire endommagée par l'intervention chirurgicale. En effet, étant donné que la plaque

d'athérome n'est pas élastique, pratiquement la totalité des forces de dilatation du ballon introduit dans l'artère est transmise au tissu vasculaire normal voisin de la lésion athérosclérotique traitée. L'endothélium, l'intima et la média vasculaires sont ainsi endommagés localement, la média peut même être réellement déchirée. Les constituants de la lamina et de la média sont ainsi exposés à différents facteurs externes et un processus de cicatrisation s'établit (Forrester et coll., 1991).

La resténose peut également être considérée comme une forme accélérée d'athérosclérose induite par une blessure de l'endothélium vasculaire (Ip et coll., 1990). Les mêmes cellules, facteurs de croissance et composants de la matrice extracellulaire sont impliqués dans son développement. Un à trois mois après une angioplastie, l'angiographie a mis en évidence, chez 30 à 50 % des patients, une hyperplasie de l'intima. Les tissus resténotiques, tout comme les tissus athérosclérotiques, sont composés de cellules musculaires lisses distribuées dans une matrice extracellulaire étendue.

A partir de quel moment peut-on considérer qu'un patient souffre de resténose ? La définition actuellement admise est une perte d'au moins 50 % du gain initialement réalisé sur le diamètre de l'artère traitée (Becker, 1992).

Nous allons maintenant nous intéresser aux processus de réparation de la lésion après une angioplastie, processus qui mettent notamment en jeu les cellules musculaires lisses de la paroi des artères.

III -2- Deux hypothèses concernant le développement de la resténose.

III -2-1- La resténose : une forme accélérée d'athérosclérose.

La resténose, comme l'athérosclérose, est caractérisée par la formation d'une plaque au niveau de la zone lésée de l'artère. Toutefois, leurs évolutions diffèrent (tableau 2). Dans la resténose, après destruction de l'endothélium vasculaire, mais aussi des couches subendothéliales, interviennent des cellules provenant du sang : dans un premier temps, les plaquettes, la fibrine et les globules rouges du sang s'accumulent au niveau de la lésion, avec formation d'un thrombus précoce ; dans un deuxième temps, on observe l'infiltration de macrophages et de lymphocytes, ainsi que l'endothélisation du thrombus (Schwartz et coll., 1991 b ; Herrman et coll., 1993). Il y a ensuite migration et prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires vers la zone endommagée. L'accumulation de composants de la matrice extracellulaire et de lipides qui s'ensuit provoque la rupture de la plaque au bout de quelques mois et la formation d'un thrombus tardif. Contrairement à ce qui se passe dans l'athérosclérose, ce sont les plaquettes qui interviennent en premier. Les autres cellules, et principalement les cellules musculaires lisses, ne semblent être impliquées qu'au bout de deux ou trois jours (tableau 2) (Ip et coll., 1990).

	Athérosclérose	Resténose après angioplastie
Type de blessure	Dénudation endothéliale	Dénudation endothéliale associée à une destruction de la lamina et de la média
Implication précoce de plaquettes	-	+
Implication précoce de monocytes	+	-
Sources de facteurs de croissance	Cellules endothéliales, monocytes / macrophages, cellules musculaires lisses, plaquettes	Cellules endothéliales, monocytes / macrophages, cellules musculaires lisses, plaquettes
Pathologie		
initiale	Dépôt de lipides, adhésion de monocytes et de plaquettes	Thrombose, prolifération dans l'intima de cellules musculaires lisses, fibrose
tardive	Prolifération dans l'intima de cellules musculaires lisses, fibrose	Dépôt de lipides
complications	Rupture de la plaque, thrombose	Rupture de la plaque, thrombose
Durée du processus	Des dizaines d'années	De trois mois à deux ans

Tableau 2 : Comparaison des évolutions de l'athérosclérose et de la resténose après angioplastie (d'après Ip et coll., 1990 ; Forrester et coll., 1991).

III -2-2- La resténose : la manifestation d'un processus de cicatrisation exacerbée.

Une autre hypothèse consiste à considérer la resténose comme la manifestation d'un processus, normal au départ, de cicatrisation de la blessure induite par une intervention chirurgicale. Trois phases sont alors distinguées : l'inflammation, la granulation et la formation de la matrice (figure 7).

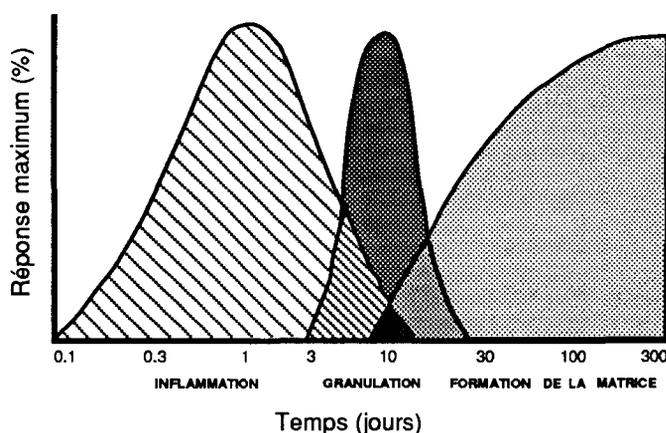


Figure 7 : Évolution dans le temps de la resténose (Forrester et coll., 1991).

III -2-2-1- Première phase : l'inflammation.

Comme nous l'avons précédemment décrit, l'angioplastie coronaire provoque, à la jonction entre le tissu normal et le tissu athérosclérotique, une dénudation endothéliale associée à une dégradation des structures subendothéliales (intima et média). Cette rupture de la paroi des vaisseaux aboutit en l'exposition des différents composants thrombogéniques de la matrice extracellulaire, comme le collagène, à des facteurs externes. La cicatrisation de la blessure débute avec la coagulation du sang et de la fibronectine afin de former une matrice extracellulaire. Dans le même temps, il y a migration et agrégation des plaquettes à la surface de la lésion. Les plaquettes activées libèrent des substances responsables d'une vasoconstriction locale et de la formation d'un thrombus ; elles libèrent également des facteurs de croissance (surtout le PDGF) qui agissent ensuite sur la migration et la prolifération des autres cellules impliquées ainsi que différents médiateurs (sérotonine, adénosine diphosphate) qui peuvent amplifier l'activité des facteurs de croissance (Crowley et coll., 1994). Au bout de quelques heures, les macrophages, qui ont pour origine les monocytes du sang, pénètrent dans les couches subendothéliales et prolifèrent localement ; ils libèrent eux aussi des facteurs de croissance, et ont une activité chimiotactique vis-à-vis des lymphocytes T et des cellules musculaires lisses. Dès le deuxième jour, il semble que les cellules musculaires lisses contractiles de la média commencent, sous l'action des facteurs de croissance libérés par les plaquettes et les macrophages, à accroître leur synthèse d'ADN pour se transformer en cellules musculaires lisses synthétiques (Forrester et coll., 1991 ; Bauriedel et coll., 1994).

Parmi les facteurs de croissance libérés par les cellules, cinq pourraient avoir un rôle important dans la resténose : le PDGF, le FGF, l'IGF, l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF (Transforming Growth Factor) (tableau 3). Ils participent activement à la phase de granulation qui débute trois jours après l'intervention chirurgicale (Forrester et coll., 1991 ; Bauriedel et coll., 1994).

Facteurs de croissance	Action potentielle dans la resténose
PDGF	Stimule la migration des cellules musculaires lisses vasculaires et leur prolifération
FGF	Stimule la prolifération des cellules endothéliales et des fibroblastes
EGF	Remplace l'héparine à la surface des cellules ; induit la prolifération des cellules musculaires lisses
IGF	Induit la prolifération des cellules musculaires lisses et la production de la matrice extracellulaire
TGF	Régule le remodelage de la matrice extracellulaire ; régule peut-être les autres facteurs de croissance

Tableau 3 : Rôle potentiel des facteurs de croissance dans la resténose (Forrester et coll., 1991).

III -2-2-2- Deuxième phase : la granulation.

Cette phase est caractérisée par une migration cellulaire importante. La fibronectine de la matrice extracellulaire facilite la migration des cellules endothéliales voisines de la lésion ; ces cellules prolifèrent afin de recouvrir la blessure. On pense que, quatre jours après une angioplastie, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses de la média commencent à migrer vers l'intima où elles s'accumulent et prolifèrent. Ces processus sont initiés par des facteurs de croissance (PDGF, bFGF, IGF, TGF- β), mais aussi par des peptides vasoactifs comme l'angiotensine II. L'une des principales caractéristiques de la phase de granulation est le processus de croissance des cellules musculaires lisses. Environ 30 % d'entre elles prolifèrent dans l'intima de l'artère, les autres s'hypertrophient.

Ces cellules du phénotype synthétique possèdent de nombreuses organelles de synthèse : des ribosomes libres, le réticulum endoplasmique rugueux, l'appareil de Golgi, les mitochondries ; elles sont capables de synthétiser de nouveaux composants de la matrice extracellulaire, tels que les protéoglycanes ou le collagène (Forrester et coll., 1991 ; Bauriedel et coll., 1994 ; MacLeod et coll., 1994).

La phase de granulation se termine lorsque la blessure a entièrement été recouverte par les cellules ayant migré puis proliféré dans cette zone. Des modifications de la composition de la plaque vont ensuite conduire à un remodelage de la paroi de l'artère blessée.

III -2-2-3- Troisième phase : la formation de la matrice.

Une fois que la lésion a été entièrement recouverte, environ deux semaines après l'angioplastie, les cellules qui ont migré puis proliféré au cours de la phase de granulation ralentissent leur croissance et commencent à produire des composants de la matrice extracellulaire.

Les cellules endothéliales synthétisent le protéoglycane sulfate d'héparine ; l'héparine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des cellules musculaires mais stimule la formation d'autres protéoglycanes par ces cellules (sulfate de chondroïtine et sulfate de dermatane). Les protéoglycanes synthétisés par les cellules musculaires lisses sont, à ce stade, les principaux composants de la matrice extracellulaire ; leur synthèse est régulée par le TGF- β .

Lorsque le processus évolue vers un remodelage de la matrice, les protéoglycanes sont remplacés par de larges fibres de collagène de type I et par l'élastine. Les cellules musculaires lisses de type synthétique, disséminées dans la masse importante de la matrice extracellulaire, vont retourner à leur état contractile de départ. On observe un épaississement de la paroi de l'artère due à une hyperplasie de l'intima. Cette suite d'événements, dont le but initial est la réparation de l'endothélium lésé, conduit à la formation d'un nouveau thrombus et, par conséquence, au rétrécissement ou même à la perte de la lumière vasculaire. La resténose après angioplastie peut ainsi être responsable de nouveaux accidents cardiovasculaires, voire de la mort du patient (Forrester et coll., 1991 ; Bauriedel et coll., 1994).

IV - Réflexions pour une conception rationnelle de médicaments.

Dans son hypothèse concernant le développement de l'athérosclérose (figure 6), Ross (1993 a) a postulé que chaque étape de la formation de la plaque d'athérome est potentiellement réversible. La lutte contre l'athérosclérose consiste à stabiliser ou retarder les processus, voire à provoquer leur régression. En ce qui concerne la resténose, considérée comme une forme accélérée d'athérosclérose, on peut imaginer de la même façon la stabilisation ou la régression de la plaque.

IV -1- Moyens de lutte actuels.

IV -1-1- Cas de l'athérosclérose.

A l'heure actuelle, trois approches différentes ont fait l'objet d'investigations. La première consiste à mieux contrôler les facteurs de risque, notamment l'hypercholestérolémie. La deuxième a pour but d'améliorer, en utilisant des médicaments hypolipémiants, la métabolisation des lipides par l'organisme. Ces deux types de mesures pourraient prévenir la progression des lésions riches en lipides et induire leur régression. La troisième approche est l'utilisation d'agents antithrombotiques qui empêcheraient la formation d'un thrombus dans le cas de lésions plus graves.

IV -1-1-1- Diminution des facteurs de risque.

Des études épidémiologiques ont montré que le contrôle de l'hypertension, la suppression du tabac ou la diminution du taux plasmatique en cholestérol (chez des patients souffrant d'hyperlipidémie) réduisent les risques de complications dus à l'athérosclérose.

Pour abaisser le taux de lipides, principalement le taux de cholestérol, il faut dans un premier temps avoir recours à des mesures diététiques. Un régime strict doit être suivi pendant trois à six mois avant d'envisager une stratégie médicamenteuse (Witzum, 1989 ; Badimon et coll., 1993).

IV -1-1-2- Médicaments hypolipémiants.

Lorsque les mesures diététiques ne sont pas suffisantes pour revenir à un taux plasmatique normal en lipides, on utilise divers médicaments hypolipémiants dans le but de diminuer le taux de LDL et d'augmenter, si possible, le taux plasmatique de HDL. Voici quelques exemples de médicaments utilisés :

- *Les résines.*

Le mécanisme d'action des résines d'échange d'ions non absorbables (Cholestyramine, Colestipol) est lié à leur pouvoir de chélation des acides biliaires qui ne sont plus recyclés vers le foie. Cela mène à une augmentation de l'expression des récepteurs aux LDL hépatiques, et il y a par conséquent une diminution du taux plasmatique de LDL. Ces agents, qui peuvent induire une petite augmentation du taux de HDL, provoquent une augmentation du nombre de triglycérides. De plus, ces médicaments sont inefficaces pour

des individus qui manquent génétiquement de récepteurs aux LDL (Witzum, 1989). Leur effet secondaire principal est la constipation.

• *L'acide nicotinique et ses dérivés.*

Aux doses élevées où il est utilisé pour traiter l'hypercholestérolémie, l'acide nicotinique a probablement l'effet de diminuer le pool de VLDL puis le taux de LDL (Witzum, 1989). Son mécanisme d'action et celui de ses dérivés ne sont que partiellement connus : ils inhibent la lipolyse dans les tissus adipeux (ce qui pourrait priver le foie des substrats nécessaires à la synthèse des lipides des lipoprotéines), ils diminuent donc la production de lipoprotéines hépatiques et augmentent l'élimination du cholestérol par voie biliaire (Mordasini et coll., 1989).

Un avantage important de l'acide nicotinique est d'augmenter le taux plasmatique en HDL. Un tel effet est théoriquement bénéfique dans la lutte contre l'athérosclérose. En fait, pour ce médicament hypolipémiant, on a pu corrélérer une diminution des événements coronariens secondaires à une diminution à long terme de la mortalité (Witzum, 1989 ; Bays, Dujovne, 1994).

• *Les fibrates.*

Les mécanismes hypolipémiants des fibrates (Gemfibrozil, Bézafibrate, Fénofibrate, Clofibrate) ne sont pas totalement élucidés mais ces molécules semblent affecter plusieurs étapes du métabolisme des lipoprotéines. Ces médicaments sont les plus efficaces pour diminuer le taux plasmatique en triglycérides. De plus, il y a une inhibition de la production des VLDL et une stimulation de leur clairance due à l'activation de la lipoprotéine lipase (Witzum, 1989). Tout comme l'acide nicotinique, les fibrates augmentent la concentration plasmatique en HDL (Mordasini et coll., 1989).

• *Inhibiteurs de la HMG-CoA réductase.*

Parmi les nombreuses et nouvelles substances hypolipémiantes, les inhibiteurs de la synthèse du cholestérol se sont révélés d'une importance majeure, car ils semblent beaucoup plus efficaces que les médicaments usuels. La HMG-CoA réductase peut être inhibée de façon compétitive par plusieurs médicaments (figure 8). Ces agents réduisent les taux de LDL en diminuant de 50 % leur synthèse et en augmentant leur catabolisme par la production d'un nombre plus élevé de récepteurs aux LDL dans le foie (Mordasini et coll., 1989 ; Bays, Dujovne, 1994). Il y a aussi une baisse du taux en triglycérides et une augmentation du taux en HDL (Witzum, 1989).

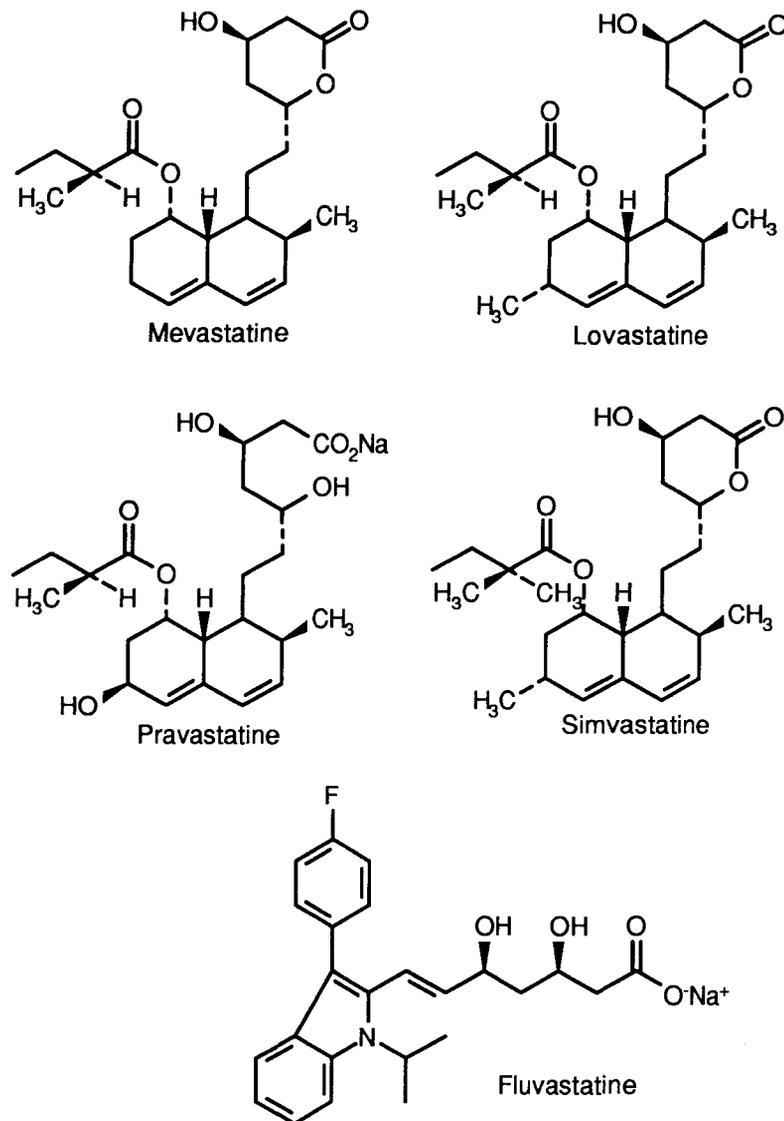


Figure 8 : Exemples d'inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (Gotto, 1993).

• *Le probucol.*

Le probucol est un médicament hautement lipophile qui a été introduit en tant qu'agent hypolipémiant. Il a ensuite été montré qu'il avait un potentiel antioxydant. Il diminue en moyenne le taux de LDL plasmatique de 10 à 20 % mais diminue aussi le taux de HDL, ce qui le rend suspect aux yeux de certains. Cependant, le probucol est le seul agent à être actif sur les sujets homozygotes souffrant d'hypercholestérolémie (Witzum, 1989 ; Walldius et coll., 1993).

IV -1-1-3- Agents antithrombotiques.

Une thérapie antithrombotique peut être utile pour ralentir la progression de l'athérosclérose après la rupture de la plaque d'athérome.

L'activation des plaquettes peut se faire selon trois voies différentes. La première est dépendante du thromboxane A₂ et peut être inhibée par l'aspirine : plusieurs études ont

montré une faible activité de ce médicament dans la prévention de syndromes cardiovasculaires. Les deux autres voies d'activation des plaquettes - qui dépendent de l'adénosine diphosphate, du collagène et de la thrombine - ne sont pas affectées par l'emploi d'aspirine, ce qui explique cette faible activité. Par contre, ces deux mécanismes d'activation peuvent être affectés par l'héparine et par des anticoagulants.

Les patients présentant un haut risque de thrombose peuvent être traités, à court terme, en associant une faible dose d'aspirine à une faible dose d'anticoagulant. Il est ainsi possible de bloquer d'une part l'activation plaquettaire, et d'autre part la génération de thrombine par les systèmes de coagulation intrinsèque et extrinsèque (Badimon et coll., 1993).

D'autres approches peuvent être envisagées afin de prévenir le développement de l'athérosclérose. On pourrait par exemple empêcher la migration des macrophages ou des cellules musculaires lisses, mais aussi leur prolifération. On pourrait également inhiber des facteurs de croissance, ou bien la formation de la matrice extracellulaire.

Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressée d'une part à l'inhibition de l'oxydation des LDL (oxydation responsable de la genèse de cellules spumeuses à partir des macrophages) et, d'autre part, à l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

IV -1-2- Cas de la resténose.

La resténose, comme nous venons de le décrire, est une maladie multifactorielle ; une molécule bloquant l'un ou l'autre des mécanismes impliqués pourrait être efficace dans le traitement de cette pathologie. Actuellement, aucune molécule ne s'est révélée suffisamment efficace. Aussi, différentes stratégies sont à l'étude.

Les plaquettes étant les premières cellules impliquées dans la réparation de la lésion induite par une angioplastie, on peut penser que des antagonistes plaquettaires sont susceptibles de bloquer la cascade de la cicatrisation. Cependant, plusieurs études ont montré que l'aspirine et le dipyridamole qui inhibent, via leur liaison irréversible à la cyclooxygénase, la formation du TXA₂ (médiateur puissant de l'agrégation plaquettaire) sont inefficaces dans le cas de la resténose (Forrester et coll., 1991 ; Herrman et coll., 1993). Des inhibiteurs de la TXA₂ synthétase (par exemple le Nafagrel) ont également fait l'objet d'études, mais sans résultat. Comme dans le cas de l'athérosclérose, il faudrait des médicaments pouvant bloquer simultanément les trois voies d'activation des plaquettes. Les études actuelles se dirigent vers le développement d'anticorps monoclonaux des récepteurs plaquettaires.

Les anti-inflammatoires pourraient inhiber l'accumulation et / ou l'activation des cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) au niveau de la lésion, et par conséquent inhiber la libération des facteurs de croissance et des cytokines impliquées dans l'activation des cellules musculaires lisses vasculaires. Les études réalisées avec des stéroïdes, la cyclosporine A (inhibiteur

de l'activation des lymphocytes T) et avec des acides gras ω -3 insaturés (agents anti-inflammatoires et antiplaquettaires) n'ont pas donné de résultats significatifs (Forrester et coll., 1991).

Parmi les antagonistes de facteurs de croissance, l'héparine est particulièrement intéressante : elle empêche *in vitro* la prolifération des cellules musculaires lisses et, chez les animaux, l'hyperplasie de l'intima. Une limitation à son utilisation pourrait être sa faculté à induire la production de composants de la matrice extracellulaire. Étant donné que les domaines antiprolifératif et anticoagulant de l'héparine sont nettement distincts, il est possible de créer une forme non-anticoagulante de l'héparine, ce qui élimine cette limitation d'utilisation (Ip et coll., 1990 ; Forrester et coll., 1991).

On pourrait également bloquer les mécanismes de formation de la matrice extracellulaire. Par exemple, la colchicine réduit le nombre d'organelles de synthèse des cellules musculaires, ce qui est associé à une réduction de la synthèse de composants de la matrice. Mais ce composé ne s'est pas montré efficace dans le cas de la resténose (Forrester et coll., 1991 ; Herrman et coll., 1993).

D'autres axes de recherche sont l'utilisation de toxines chimériques (comme dans le cas de cancer), de molécules anti-sens (qui se lieraient à l'ARN des cellules musculaires lisses vasculaires) ou d'une thérapie génique (Epstein et coll., 1994).

Comme nous le voyons, de nombreuses stratégies thérapeutiques demeurent à développer dans le cadre de la prévention et de la stabilisation de la resténose. Pour notre part, nous avons choisi l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

IV -2- Lutte contre l'oxydation des LDL.

Les médicaments utilisés actuellement dans le traitement de l'athérosclérose n'agissent pas sur les phénomènes induisant l'oxydation des LDL, transformation responsable du passage de la voie "normale" du cholestérol en voie "pathologique". C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'analyser les données sur le mécanisme de cette oxydation afin de développer des molécules antioxydantes capables d'inhiber cette étape.

IV -2-1- Mécanismes d'oxydation des LDL.

Il existe différents concepts pour le mécanisme d'oxydation des LDL : la cellule génère, d'une façon ou d'une autre, un potentiel oxydant (compensé en partie par la libération d'antioxydants tels que la vitamine E). Plusieurs processus peuvent être envisagés (Steinberg et coll., 1989) (figure 9).

Dans les deux premiers, les lipides ou les phospholipides de la cellule sont oxydés enzymatiquement dans les cellules par une 5-lipoxygénase. Après leur transfert dans les LDL du milieu, ils sont capables d'initier des réactions en chaîne qui provoquent l'oxydation des LDL. La troisième voie envisagée met en jeu la formation d'hydroperoxydes par une oxydation enzymatique directe des lipides des LDL durant le contact LDL-cellules. Une quatrième voie implique l'oxydation des LDL par des espèces activées de l'oxygène libérées par les cellules.

Quelle que soit l'étape d'initiation, elle est toujours suivie par une propagation rapide dès l'instant où les LDL contiennent des dérivés peroxydés d'acides gras (Steinberg et coll., 1989).

Cette phase de propagation implique la peroxydation rapide des acides gras polyinsaturés des phospholipides des LDL (figure 10). Elle entraîne une augmentation très nette du nombre de radicaux libres et cela conduit à une fragmentation étendue des chaînes des acides gras. Esterbauer et coll. (1990) ont montré l'existence d'un large spectre d'aldéhydes à chaînes courtes (malonaldéhyde, 4-hydroxynonéal), certains d'entre eux étant capables de se lier de façon covalente à l'apolipoprotéine B ou à des fragments peptidiques générés par la destruction de cette protéine durant l'oxydation des LDL (Steinberg et coll., 1989). Il y a ainsi un réarrangement structural complet de la protéine avec création de nouveaux épitopes se liant aux récepteurs scavengers (Esterbauer et coll., 1990). D'autre part, des modifications chimiques des résidus lysine des LDL mènent à une nette augmentation des charges négatives sur les LDL qui permet cette liaison aux récepteurs scavengers (Steinbrecher et coll., 1990).

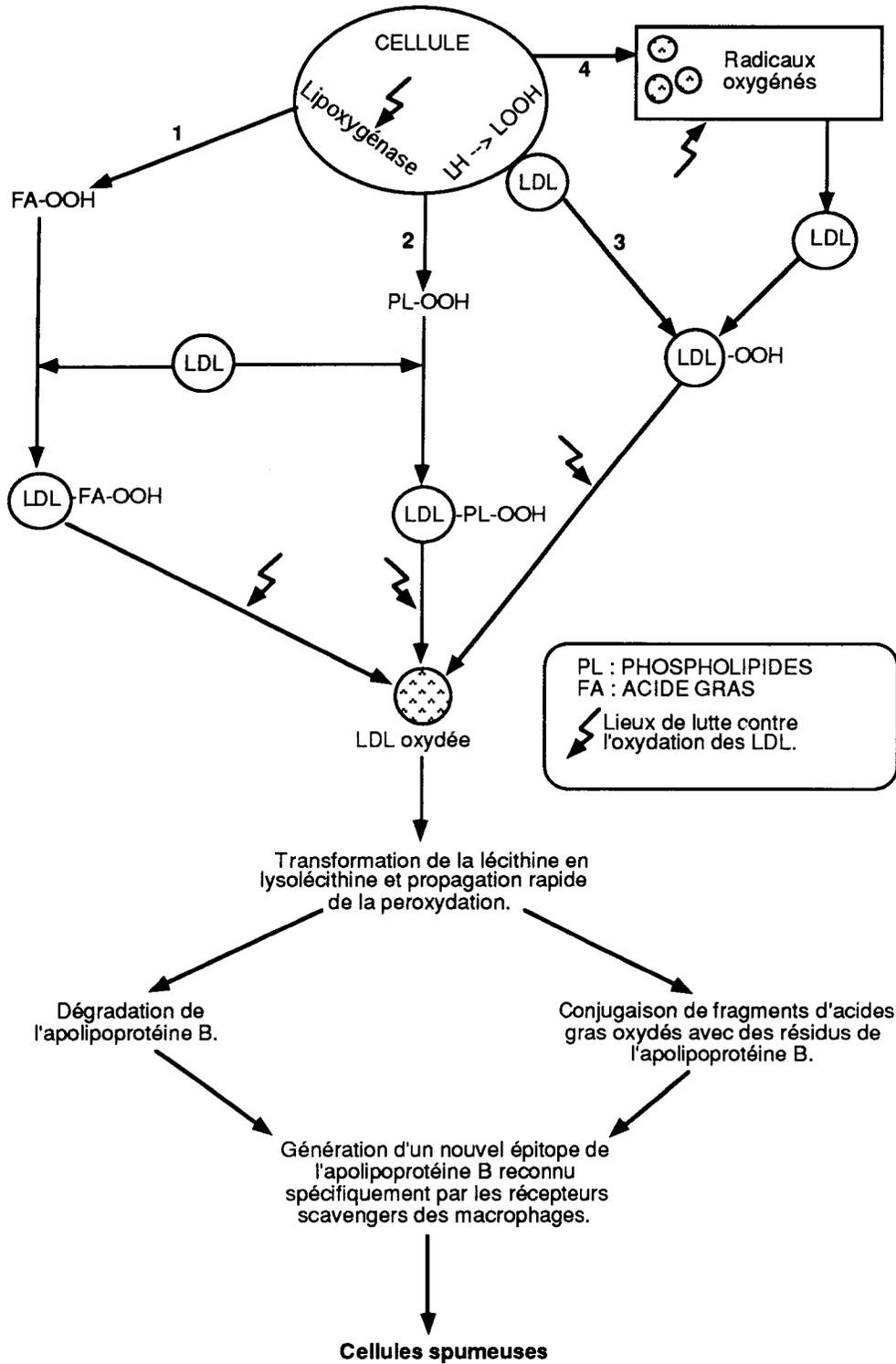


Figure 9 : Mécanismes pouvant mener à une modification oxydative des LDL par les cellules (Steinberg et coll., 1989 ; Parthasarathy et coll., 1990).

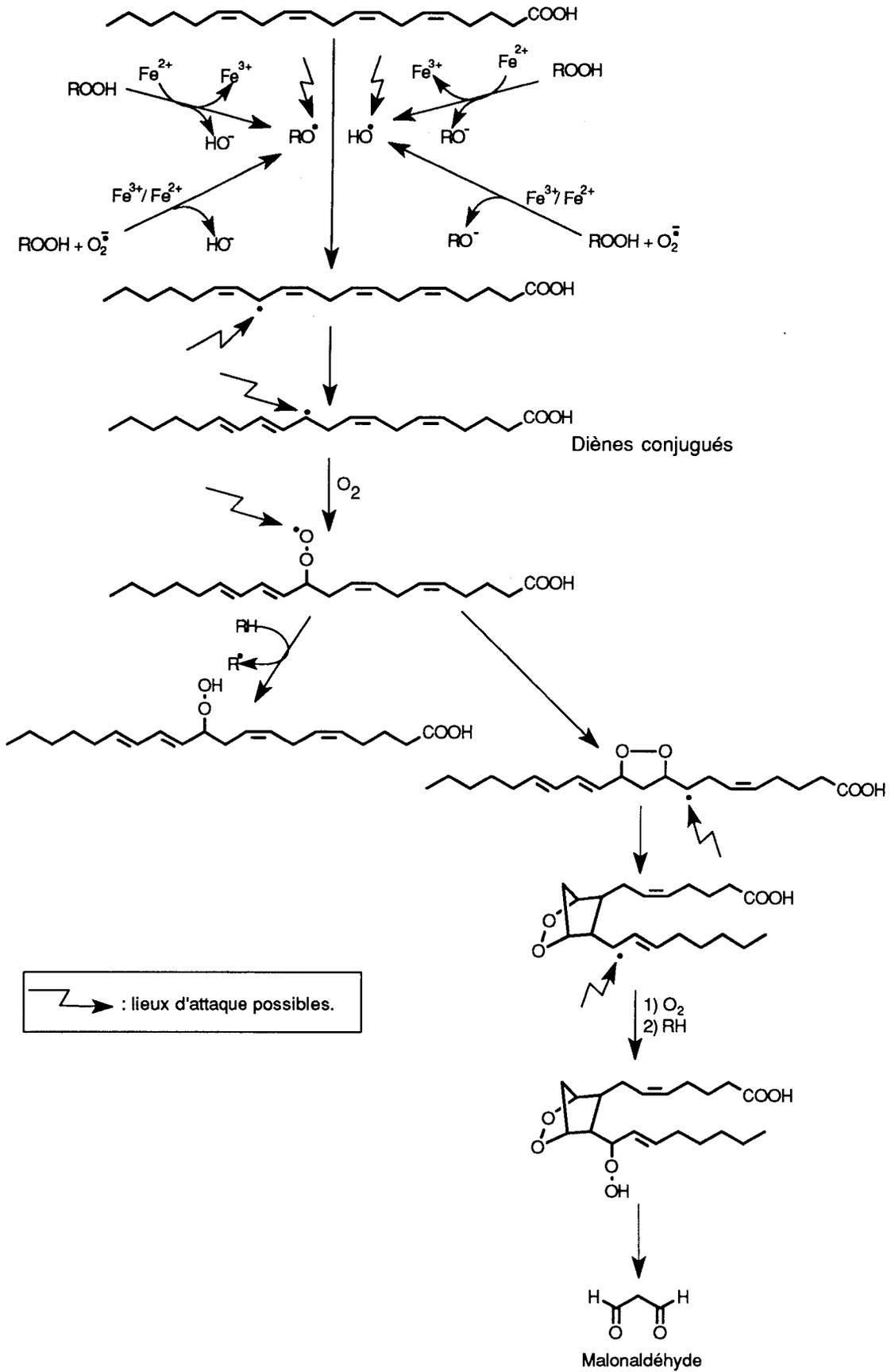


Figure 10 : Exemple de peroxydation lipidique. Formation du malonaldéhyde à partir de l'acide arachidonique.

IV -2-2- Réflexion sur les moyens théoriques de lutte contre l'oxydation des LDL.

Etant donnés les mécanismes d'oxydation des LDL, différents moyens de prévention pourraient être envisagés :

- En diminuant par complexation la quantité de fer disponible pour la réaction de Fenton (figure 11) on inhiberait la formation des radicaux HO[•].



Figure 11.

- L'inhibition des lipoxygénases responsables de l'oxydation des LDL est une bonne approche mais n'empêche pas les mécanismes d'oxydation 3 et 4 (figure 9).
- L'avantage des "radical scavengers" est leur action à tous les niveaux et leur capacité à intercepter toute espèce radicalaire présente dans le processus (figures 9 et 10). C'est le mécanisme utilisé par la vitamine E endogène et son composé actif, l' α -tocophérol (figure 12). Ils constituent la première barrière de protection contre l'oxydation des lipides (Esterbauer et coll., 1990) ; ils captent les radicaux libres oxygénés dans les tissus des cellules (Santrucek, Krepelka, 1988) et empêchent ainsi la peroxydation des acides gras polyinsaturés; ils peuvent aussi réagir avec des radicaux libres générés par des espèces oxydatives autres que l'oxygène moléculaire. L' α -tocophérol est très efficace dans l'inhibition de l'oxydation du cholestérol. La peroxydation des lipides ne se poursuit que lorsque tous les antioxydants endogènes ont été consommés (Santrucek, Krepelka, 1988).

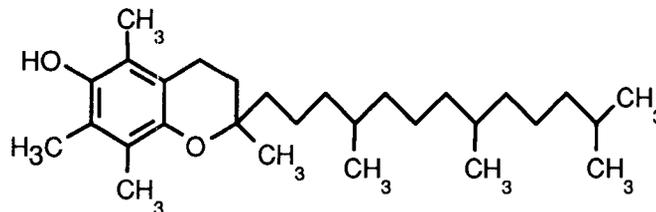


Figure 12 : α -tocophérol.

Il semble que le probucol (figure 13) puisse, en plus de son action hypolipémiante, fonctionner également comme antioxydant "radical scavenger" exogène (Witzum, 1989). Les LDL isolées de patients traités avec des doses conventionnelles de probucol se sont avérées résistantes à des modifications oxydatives *in vitro*. De plus, le traitement par le probucol de lapins atteints d'hypercholestérolémie a l'effet de retarder la progression de l'athérosclérose, et cela n'est pas dû à la baisse du taux de LDL plasmatique provoquée par ce médicament (Witzum, 1989). Chez l'homme, des études ont montré que les LDL de patients traités préalablement par le probucol sont protégées de l'oxydation et que leur dégradation par les macrophages est réduite (Walldius et coll., 1993).

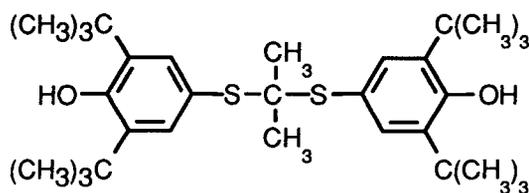


Figure 13 : ProbucoI

Nous avons donc choisi comme hypothèse de travail de synthétiser des capteurs de radicaux libres actifs contre l'oxydation des LDL soit par capture des radicaux oxygénés responsables potentiels de l'initiation, soit en interférant avec les radicaux présents à tous les niveaux de la propagation de la réaction.

IV -2-3- Démarche synthétique : l'indapamide comme modèle.

Nous avons voulu trouver au niveau chimique un squelette original se démarquant du squelette chromane de la vitamine E ou de la structure di-*tert*-butylphénol d'antioxydants classiques.

Le point de départ de notre réflexion a été l'article de Tamura et coll. (1990) dans lequel il est montré que l'indapamide (figure 14), utilisée depuis plusieurs années dans le traitement de l'hypertension (action diurétique et activité vasculaire directe), et l'un de ses métabolites majeurs, la 5-hydroxyindapamide, sont capables de capter les radicaux libres avec une efficacité comparable à celle de l' α -tocophérol. Plusieurs expériences ont été réalisées pour montrer cela.

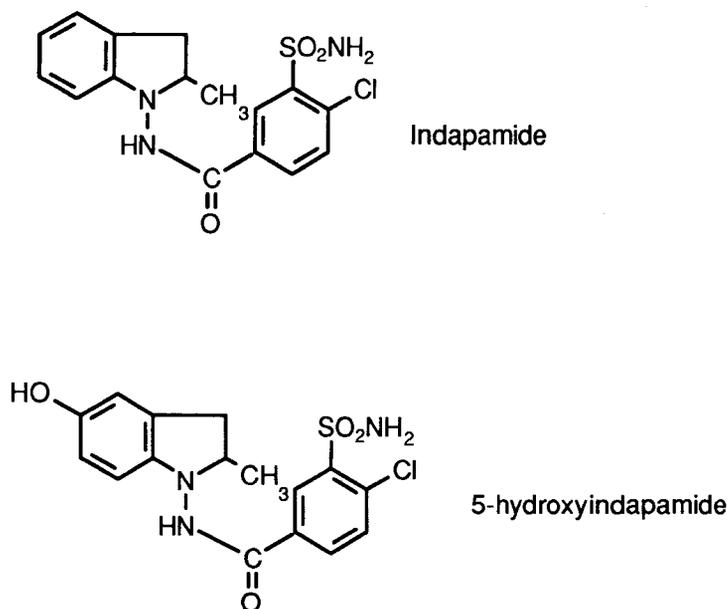


Figure 14.

Le premier test est un test colorimétrique à 517 nm mettant en évidence les vitesses de réaction (et donc de capture) du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH) (figure 15).

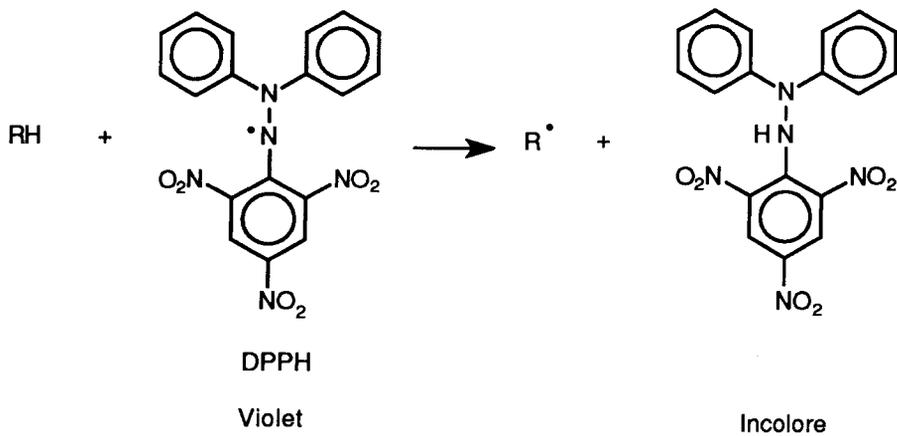


Figure 15.

On remarque des activités proches pour l'hydroxyindapamide (OH-IDP) et l' α -tocophérol (Toc) (figure 16).

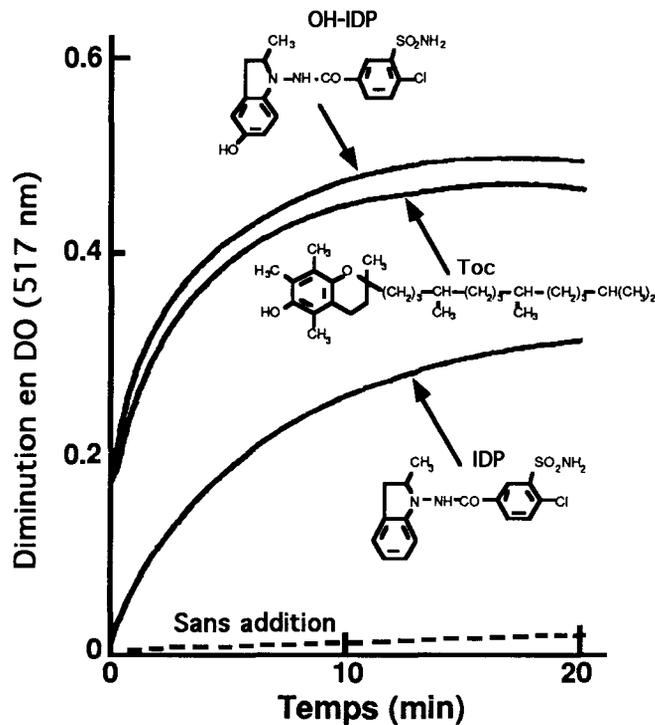


Figure 16 : Cinétique de décoloration de la solution de DPPH après addition des molécules testées (Tamura et coll., 1990).

Le second test, en milieu biologique cette fois, montre le pouvoir inhibiteur de l'indapamide et de son métabolite vis à vis de la peroxydation des lipides des microsomes de foie de rat (figure 17). Le suivi de l'oxydation se fait par la méthode à l'acide thiobarbiturique (formation d'un adduit coloré par réaction entre le malonaldéhyde provenant de la peroxydation lipidique et l'acide thiobarbiturique (TBA)). L'addition d'indapamide, d'hydroxyindapamide ou d' α -tocophérol retarde l'oxydation lipidique d'une façon dose-dépendante. Les IC_{50} sont respectivement de 6, 2 et 1 μM .

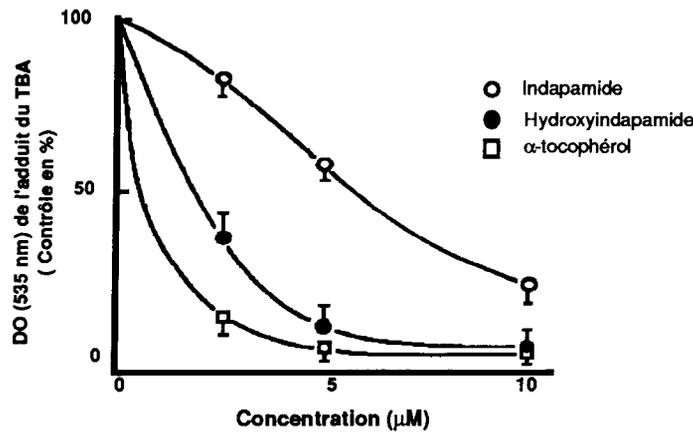


Figure 17 : Effet dose dépendant des molécules testées sur la peroxydation lipidique des microsomes de foie de rat (Tamura et coll., 1990).

Le dernier test décrit par Tamura et coll. (1990) concerne l'inhibition de l'initiation mais aussi de la propagation de la peroxydation lipidique de la membrane des érythrocytes par l'indapamide uniquement (figure 18). C'est la formation de diènes conjugués, suivie par UV, qui permet la mesure de l'oxydation. L'addition d'indapamide au milieu, contenant de l'AAPH (dichlorhydrate de 2,2'-azobis-2-amidinopropane) comme initiateur, provoque une inhibition transitoire de la peroxydation des lipides. Quand des concentrations plus élevées en indapamide sont utilisées, il y a suppression de la peroxydation lipidique sur une très longue période.

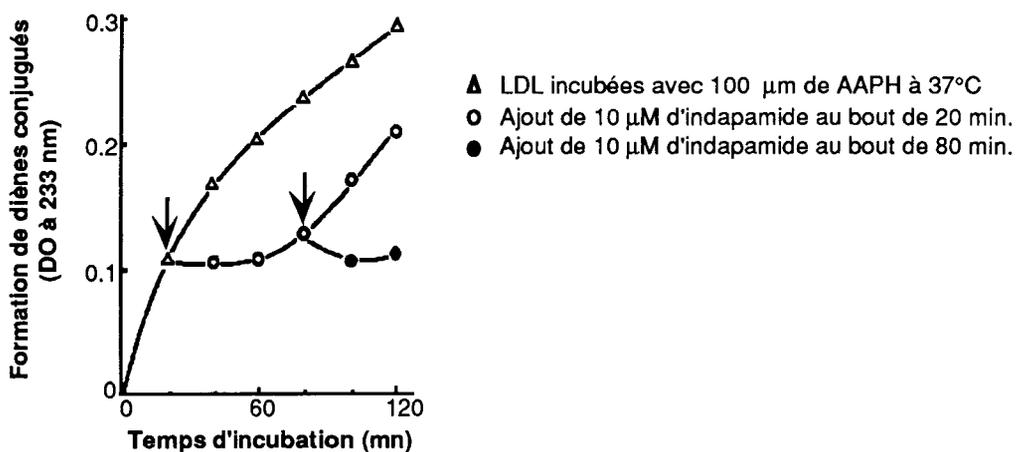


Figure 18 : Effet de l'indapamide, en fonction du temps, sur la peroxydation lipidique de la membrane des érythrocytes humains (Tamura et coll., 1990).

Bien que ces prémices soient encourageantes, il nous a semblé essentiel de vérifier le pouvoir antioxydant de l'indapamide sur le système impliqué dans la pathologie visée, à savoir l'oxydation des LDL. C'est pourquoi deux tests supplémentaires concernant l'inhibition par l'indapamide de l'oxydation des LDL induite par Cu^{2+} ont été mis au point à UCB. Il s'agit d'une part d'un suivi de l'oxydation par électrophorèse et d'autre part d'un suivi par UV de la formation de diènes conjugués.

Dans le premier cas, une augmentation de mobilité relative électrophorétique des LDL (LDL natives -> LDL oxydées) sur gel de polyacrylamide permet de visualiser le niveau d'oxydation qui doit déjà être assez avancé (modifications chimiques importantes ayant entraîné notamment des variations de densité, de charge...) (figure 19).

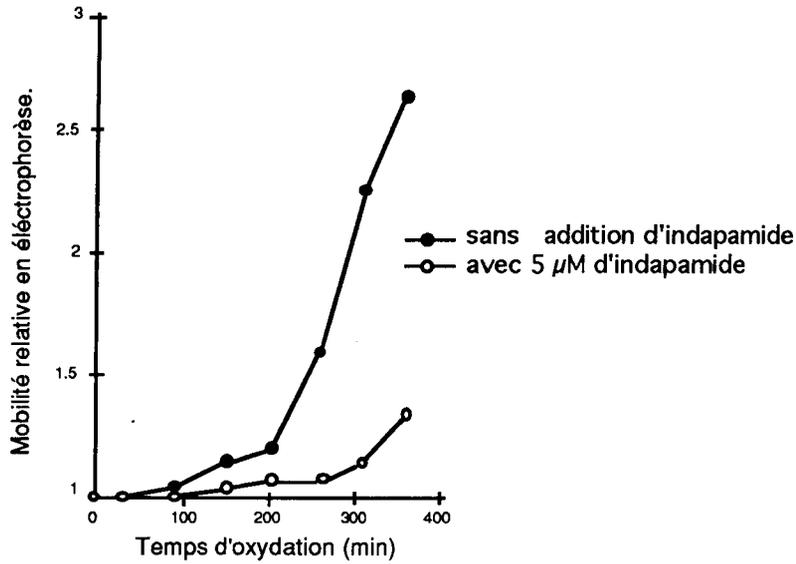


Figure 19 : Mobilité relative des LDL oxydées en électrophorèse en fonction du temps (distance de migration des LDL oxydées / distance de migration des LDL natives).

L'ajout d'indapamide permet de retarder le phénomène d'oxydation.

Le second test mis au point à UCB met en jeu un stade moins avancé de la peroxydation (formation de diènes conjugués) suivie par UV à 234 nm (figure 20). Là, on a pu montrer l'effet supérieur de l'indapamide par rapport au probucol utilisé comme produit de référence.

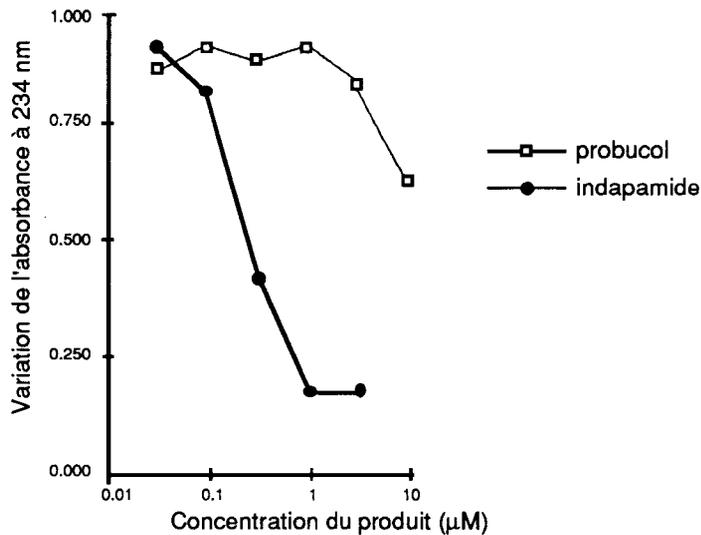


Figure 20.

Ces tests complémentaires montrent parfaitement le pouvoir antioxydant de l'indapamide. Son squelette pouvait donc parfaitement servir de modèle.

IV -2-4- Modifications apportées à ce modèle.

Notre démarche a été de modifier la structure originale de l'indapamide afin d'essayer de garder les éléments de base supposés indispensables à l'activité inhibitrice de l'oxydation des LDL et de reconsidérer le groupement 2-chloro-5-amido benzènesulfonamide caractéristique des diurétiques (figure 21).

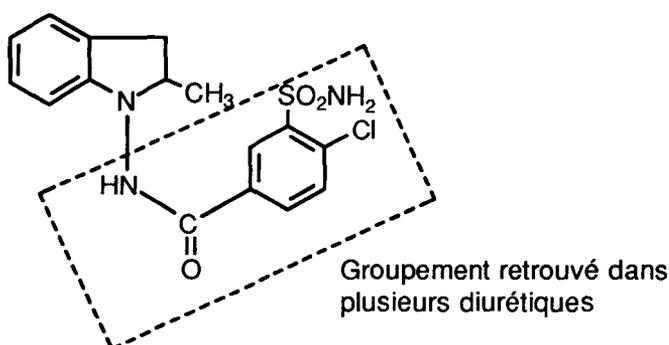


Figure 21.

IV -2-4-1- Utilisation du caractère capto-datif.

Il est possible que le groupement hydrazide de l'indapamide soit responsable de son activité antioxydante. En effet, le radical formé par départ d'un atome d'hydrogène est stabilisé de façon capto-dative (Viehe et coll., 1979). L'effet capto-datif des substituants peut s'expliquer par analogie avec la stabilisation des anions et des cations. Alors que les carbocations sont stabilisés par des groupements donateurs d'électrons et que les carbanions sont stabilisés par des groupements accepteurs d'électrons (figure 22), les radicaux neutres intermédiaires, substitués simultanément par un donneur et par un accepteur d'électrons, jouissent d'une stabilisation particulière. Le radical formé à partir de l'indapamide répond à ces critères (figure 23).

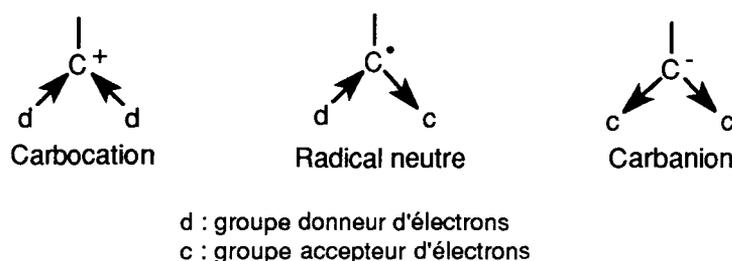


Figure 22 .

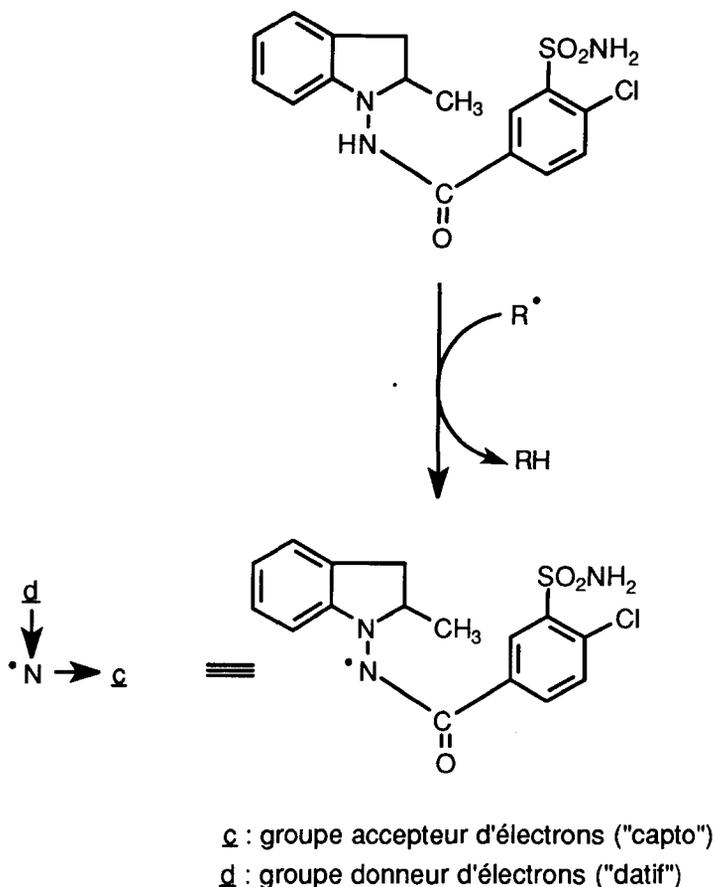


Figure 23 : Caractère capto-datif de l'indapamide.

Nous avons donc proposé comme premières molécules (figure 24) des structures N-amino indoliniques substituées par un groupement électrocapteur carbonyle ou sulfonyle, deux groupements ayant des propriétés électroniques comparables.

De plus, la notion de **bioisostérie** a également été utilisée pour la conception de ces molécules. En effet, les groupements $-\text{CO}-$ et $-\text{SO}_2-$ sont bioisostères. Ces molécules devaient nous permettre de tester et de comparer les propriétés antioxydantes d'amino indolines non C-substitués.

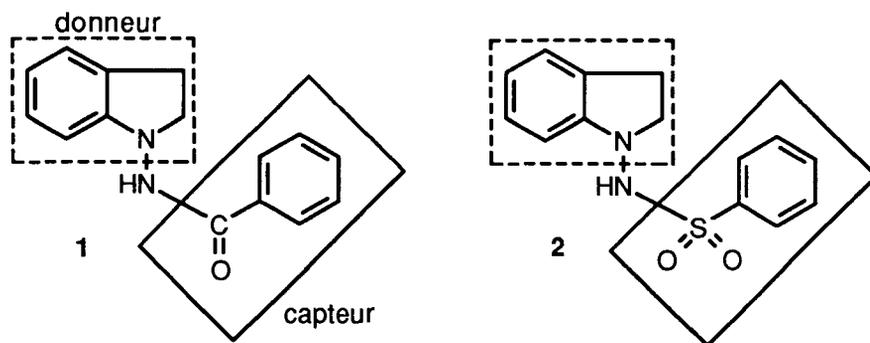


Figure 24.

D'après la **théorie des cycles potentiels**, on peut obtenir par ouverture ou fermeture de cycles des analogues conservant l'activité du composé initial. En application de ce principe, deux autres composés obtenus par ouverture du noyau hétérocyclique ont donc également été retenus (figure 25).

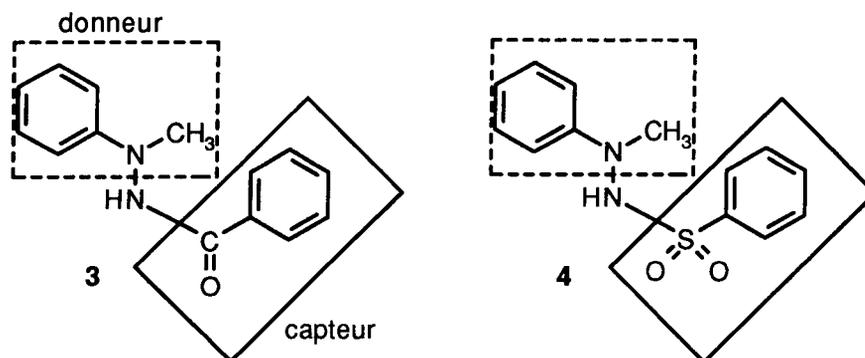


Figure 25.

IV -2-4-2- L'activité antioxydante est-elle augmentée par l'apport d'un groupement hydroxyle ?

Les tests réalisés par Tamura et coll. (1990) ont montré que la 5-hydroxyindapamide est plus active que l'indapamide elle-même, ce qui est certainement dû à la présence en position 5 de l'indoline d'une fonction hydroxyle permettant probablement, comme dans le cas de la vitamine E ou du probucol, d'associer un mécanisme scavenger phénolique au mécanisme capto-datif (figure 26).

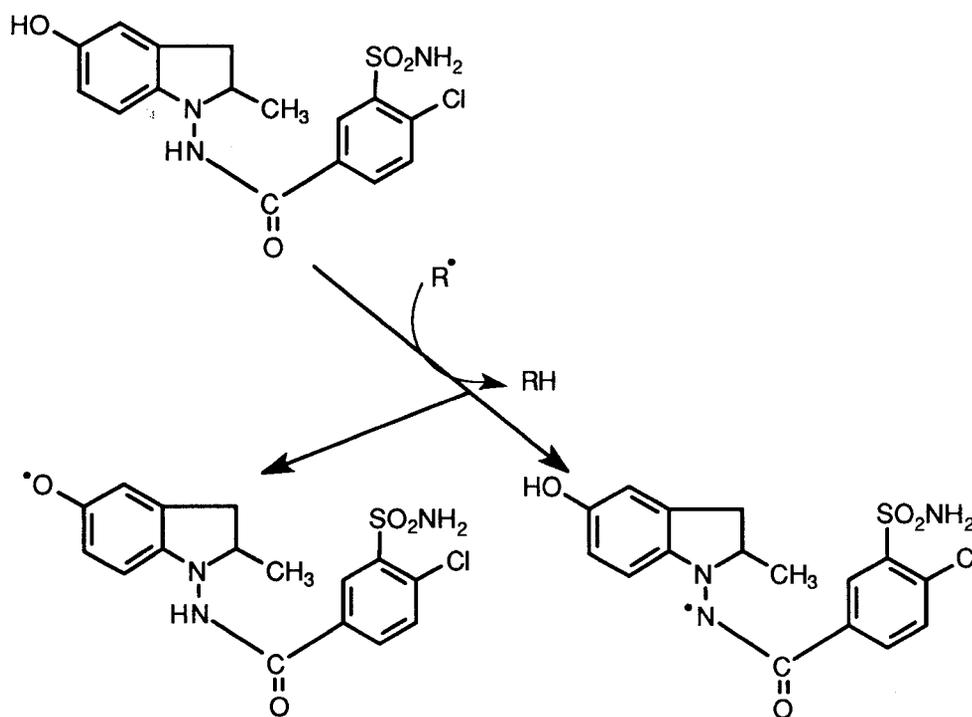


Figure 26.

Les analogues hydroxylés des molécules précédentes ont donc été sélectionnés (figure 27). Le choix du squelette indolinique ou de son correspondant ouvert devait dépendre des résultats obtenus avec les molécules précédentes (figures 24 et 25).

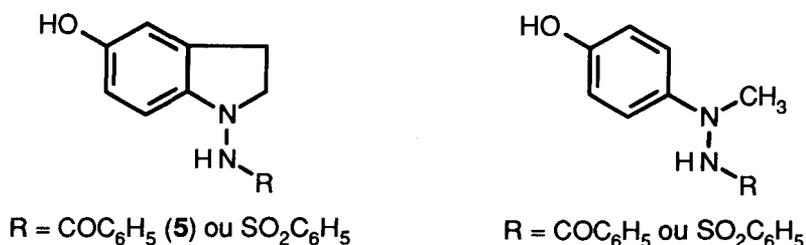


Figure 27.

IV -3- Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont impliquées aussi bien dans l'athérosclérose que dans la resténose. Dans ces deux pathologies, les cellules vasculaires du phénotype contractile de la média sont activées par différents facteurs (LDL oxydées, facteurs de croissance, cytokines) et transformées en cellules musculaires du phénotype synthétique. Elles migrent ensuite vers l'intima des artères où elles vont proliférer ou s'hypertrophier, puis synthétiser des composants de la matrice extracellulaire. Il en résulte une hyperplasie de l'intima de l'artère endommagée.

Lutter contre l'activation et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires semble donc être une thérapie applicable à la fois dans la lutte contre l'athérosclérose et dans la lutte contre la resténose.

IV -3-1- **Activation et prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.**

Comme nous l'avons vu dans la description des pathologies de l'athérosclérose et de la resténose, divers facteurs de croissance sont impliqués dans l'activation et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Les plus importants sont le PDGF, le b-FGF, le TGF- β et l'IGF. Des études ont montré que le PDGF et le b-FGF sont présents au niveau de la plaque d'athérome des coronaires humaines. Le TGF- β est présent dans les lésions athérosclérotiques primaires et les lésions resténotiques. Quant à l'IGF, Grant et coll. (1994) viennent de démontrer sa présence dans la plaque d'athérome.

Les facteurs de croissance sont de petites protéines qui jouent un rôle dans la communication entre les cellules et qui activent des cascades de signaux intracellulaires responsables d'une part de la division normale des cellules, et d'autre part d'une prolifération cellulaire anormale observée dans des pathologies comme l'athérosclérose et la resténose. Au cours de la réponse des cellules à ces signaux de régulation, la phosphorylation des résidus tyrosyle des protéines par des protéines tyrosine-kinases (PTK) est de première importance.

Les récepteurs de facteurs de croissance associent, sur une même protéine de la membrane plasmique, la fonction réceptrice (liaison au médiateur) et la fonction effectrice (activité enzymatique à l'origine de la transduction intracellulaire du message). Le site de liaison des facteurs de croissance est situé sur le domaine extracellulaire des récepteurs (partie N-terminale). Le domaine intracellulaire des récepteurs possède une activité PTK (Protéine Tyrosine-Kinase) qui phosphoryle des résidus tyrosyle appartenant au récepteur lui-même (autophosphorylation) ou à diverses protéines intracellulaires.

La liaison du facteur de croissance à son récepteur induit une dimérisation et un changement conformationnel du domaine extracellulaire transmis à la partie cytosolique du récepteur, avec activation de l'activité tyrosine-kinase. Ces mécanismes provoquent l'autophosphorylation du récepteur (au niveau de résidus tyrosyle de la partie C-terminale). Ces résidus tyrosyle phosphorylés et les acides aminés voisins constituent un site de liaison pour des domaines de reconnaissance de différentes protéines (les domaines SH2 (Src homology domain)), parmi lesquelles la Shc (une protéine d'adaptation riche en proline), la sous-unité p85 de la PI-3K (Phosphatidylinositol 3'-Kinase), la PLC (Phospholipase C) et la Src (une protéine tyrosine-kinase) (Brugge, 1993 ; Brugge, 1994) (figure 28).

Toute une cascade d'événements aboutit à la stimulation de la synthèse protéinique dans le noyau et à la phosphorylation de la protéine ribosomique S6 sur de multiples sites. Une augmentation de l'activité traductionnelle est associée à l'activation cellulaire menant à la division et à la prolifération cellulaires (Kahn, 1992).

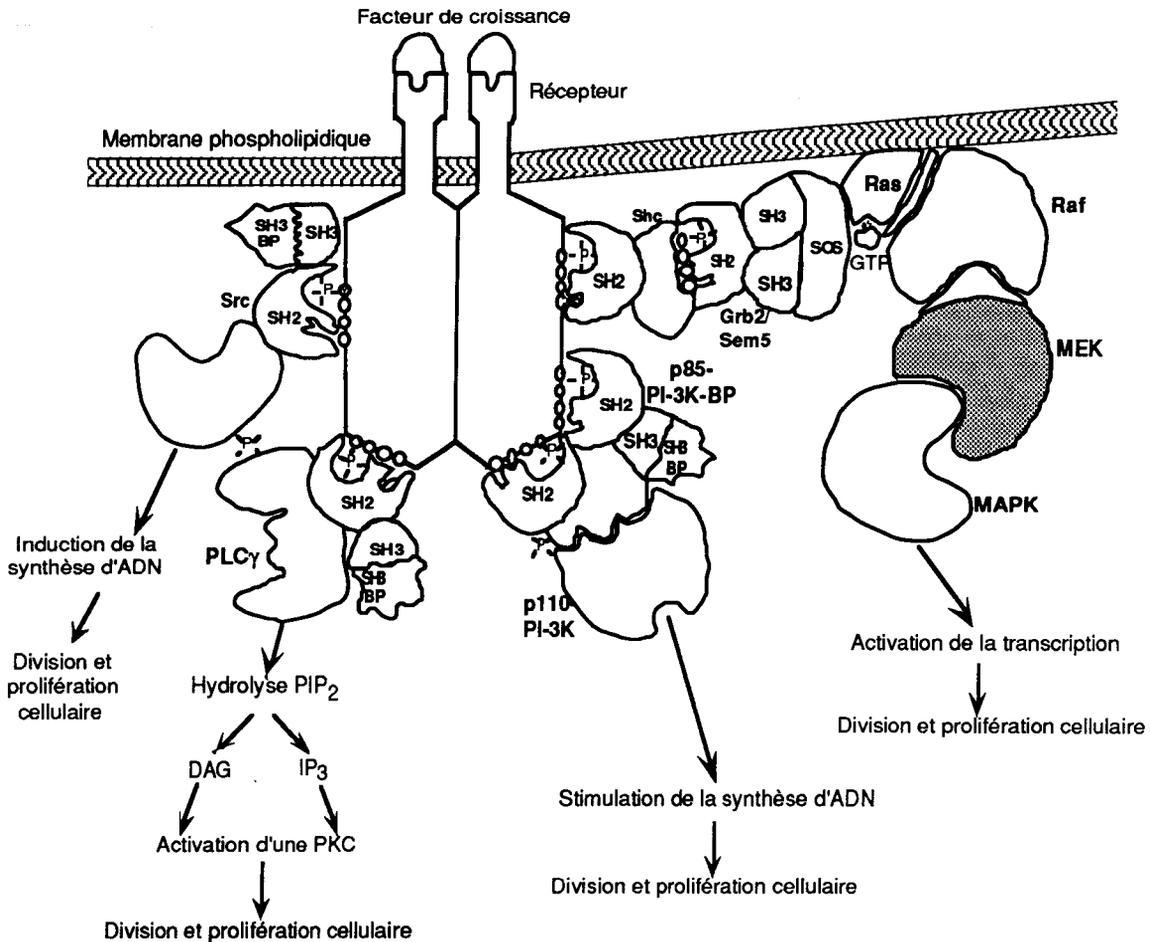


Figure 28 : Interactions entre protéines impliquées dans le signal de transduction après liaison d'un facteur de croissance à son récepteur (Brugge, 1994).

IV -3-2- Quelques inhibiteurs connus de la tyrosine kinase.

En général, les PTK catalysent le transfert direct du groupement phosphate situé en γ de l'ATP vers un résidu tyrosyle d'un substrat peptidique. Ce transfert se fait via un état de transition dans lequel l'atome de phosphore en γ est pentacoordiné et dans lequel des ions métalliques bivalents (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) forment un complexe avec les groupements phosphate α , β et γ (figure 29). Ceci permet de maintenir l'ATP dans une conformation optimale pour le transfert du groupement phosphate à la tyrosine (Traxler et coll., 1991). Cependant, il semble que la distance entre l'atome d'oxygène de la tyrosine et le groupement phosphate en γ de l'ATP (distance de $5,3 \pm 0,7 \text{ \AA}$) ait été surévaluée dans un premier modèle. En effet, l'étude cristallographique de la PKA (Protéine Kinase cAMP dépendante), dont le site actif présente de grandes similitudes avec celui des PTK, a montré que la distance entre l'atome d'oxygène de la sérine et le groupement phosphate en γ de l'ATP est de l'ordre de 3 \AA (Peterli et coll., 1994).

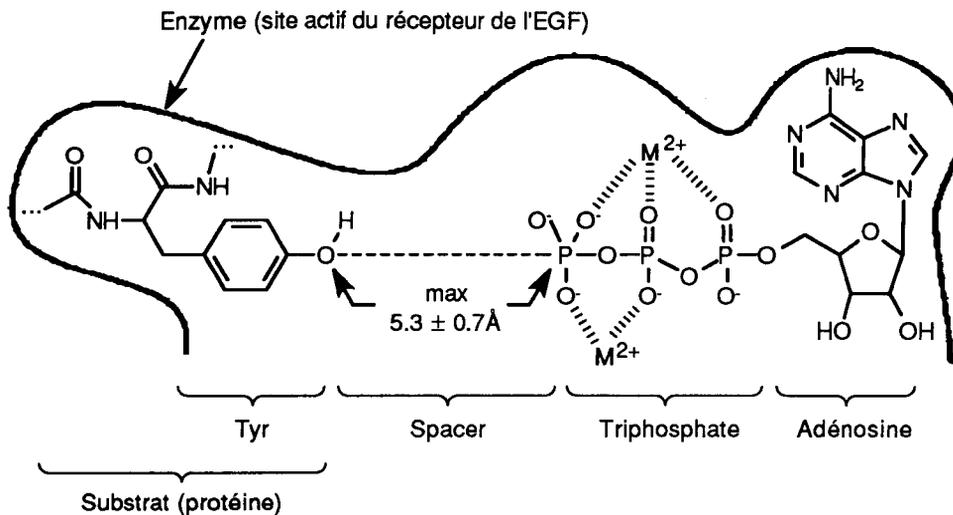


Figure 29 : Hypothèse de l'établissement d'un état de transition dans le cas du récepteur à l'EGF

(Peterli et coll., 1994).

Un certain nombre d'inhibiteurs de la tyrosine kinase sont connus. Ils interagissent avec la kinase soit au niveau du site ATP, soit au niveau du site peptidique (Powis, 1991). Par exemple, les bioflavonoïdes (figure 30) sont des inhibiteurs compétitifs de la liaison de l'ATP aux PTK. Les études structure-activité réalisées sur ces composés ont montré que leur activité augmente avec le nombre de groupements hydroxylés sur le cycle flavone (Powis, 1991) et que la double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3 est nécessaire à l'activité (Burke, 1992).

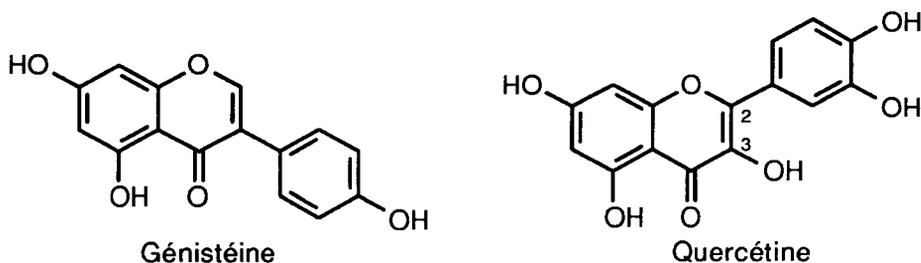


Figure 30 : Exemples de bioflavonoïdes.

Les 4-hydroxycinnamides (figure 31) inhibent *in vitro* de façon spécifique l'activité PTK de l'EGF en se fixant au site de liaison de la tyrosine. Cette activité semble être due à la faculté du squelette de ces molécules à mimer la structure du résidu tyrosine (Powis, 1991).

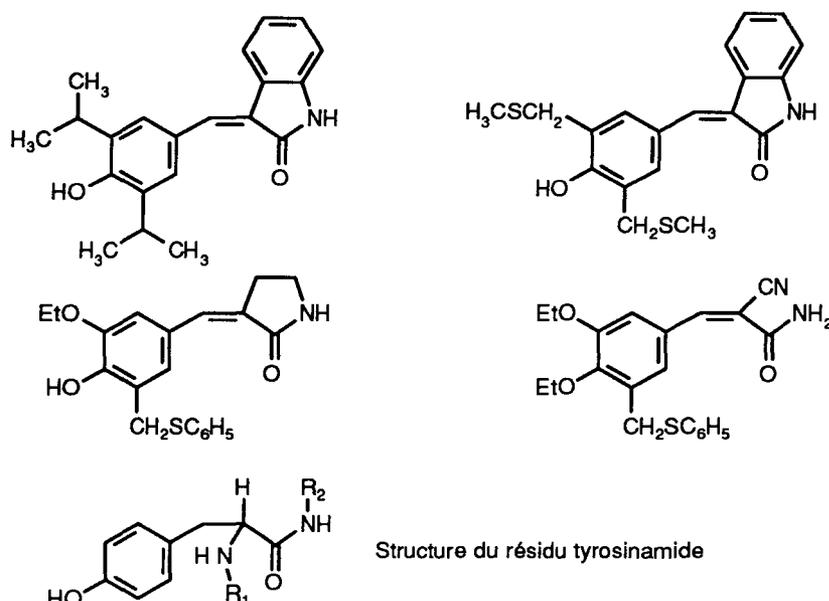


Figure 31 : Structure du résidu tyrosine et exemples de cinnamides.

Les typhostines (figure 32), composés qui dérivent de l'erbstatine (inhibiteur compétitif du substrat), inhibent l'autophosphorylation du récepteur ainsi que la phosphorylation des substrats cellulaires endogènes, sans altérer le nombre de récepteurs. La structure de base responsable de l'inhibition de la tyrosine-kinase est le *p*-hydroxybenzylidènemalonitrile (BMN). Certains de ces composés, les inhibiteurs compétitifs, interagissent avec le site de liaison de l'ATP. Les inhibiteurs mixtes se fixent également au site de liaison de la tyrosine (Levitzki, Gilon, 1991).

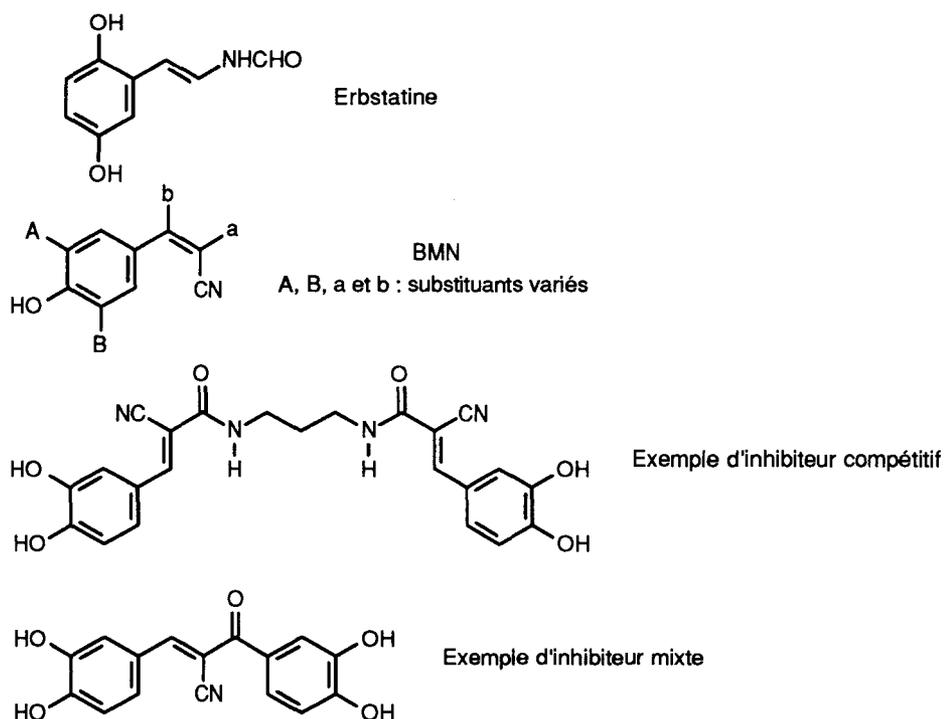


Figure 32 : Structure de l'erbstatine, du BMN et de quelques typhostines.

Actuellement, les différentes études tendent vers la recherche d'inhibiteurs "multisubstrats" qui seraient capables de reconnaître plusieurs sites de liaison à la fois et d'imiter potentiellement l'état de transition du transfert du groupement phosphate. De tels dérivés pourraient être plus spécifiques et plus actifs que les précédents.

IV -3-3- Conception d'inhibiteurs "multisubstrats" de l'activité PTK.

La conception d'inhibiteurs "multisubstrats" repose sur le fait qu'ils doivent comporter un analogue de la tyrosine, un groupement espaceur (dans lequel on peut inclure un analogue du triphosphate) et un analogue de l'adénosine (figure 33).

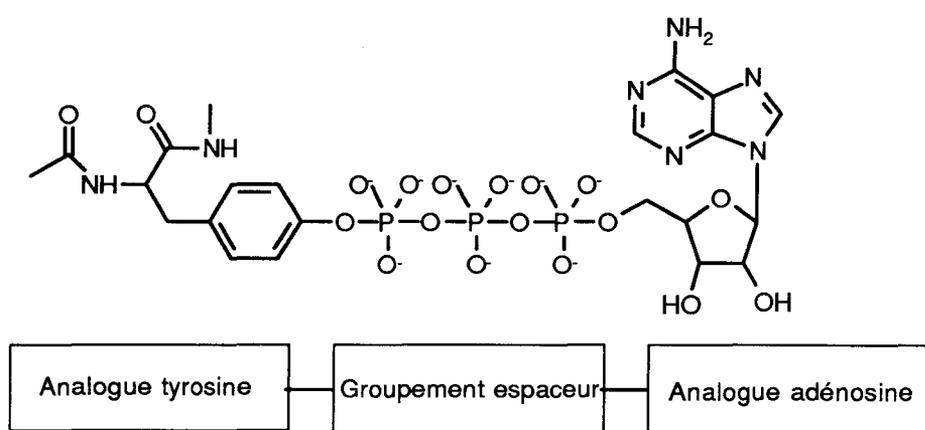
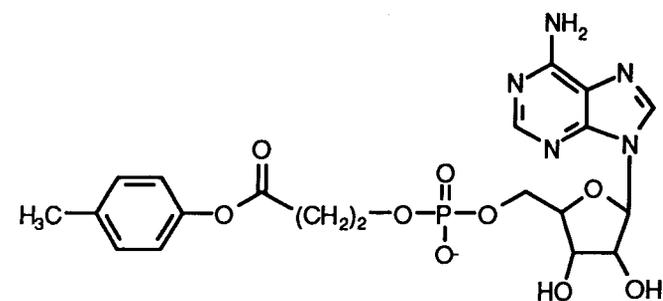
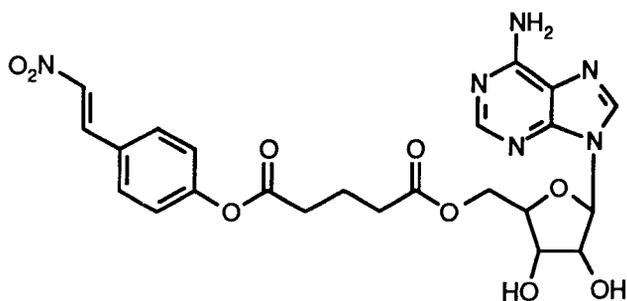


Figure 33.

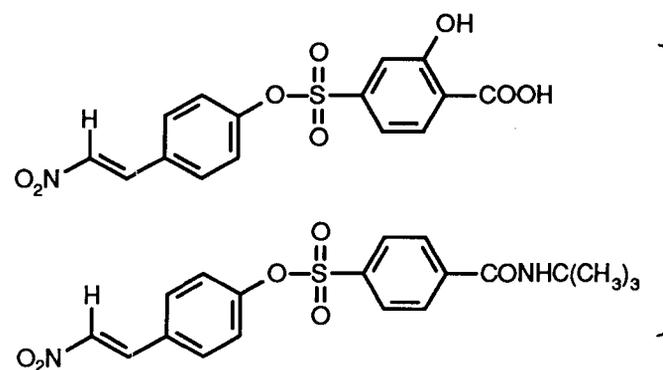
A l'aide de ce concept, plusieurs molécules ont été imaginées, mais les résultats escomptés pour ce type de composés n'ont pas été obtenus pour le moment. Le RP 53801 (figure 34) n'interfère pas avec le site de liaison enzymatique de la tyrosine ; il ne constitue donc pas un inhibiteur multisubstrat de la PTK (Baginski et coll., 1989). Des dérivés nitrostyréniques de l'adénosine 5'-glutarate ont également été développés, mais sans grands résultats (Peterli et coll., 1994). D'autres études ont été réalisées sur les sulfonylbenzoylnitrostyrènes (Traxler et coll., 1991) : les dérivés actifs de cette série inhibent à la fois la phosphorylation de substrats exogènes et l'autophosphorylation du récepteur. Le groupement sulfonylbenzoyl semble mimer un groupement diphosphate tandis que la partie nitrostyrénique constitue un analogue de la tyrosine. Traxler et coll. (1991) ont montré avec ces molécules "bisubstrats" que la présence d'une entité analogue de l'adénosine n'est pas nécessaire pour une inhibition de la PTK.



RP 53801



Dérivé nitrostyrénique de l'adénosine 5'-glutarate



Sulfonylbenzoylnitrostyrènes

Figure 34.

Les molécules que nous avons conçues dans le but d'inhiber l'oxydation des LDL répondent à ce concept d'inhibiteur "multisubstrat" des PTK dans la mesure où elles possèdent une analogie de structure avec les sulfonylbenzoylnitrostyrènes (figure 35). Des études réalisées à **UCB** ont montré que l'un des dérivés sulfonylés est actif dans l'inhibition de l'activation des cellules musculaires lisses de l'aorte de rat par le PDGF (figure 36). D'après les résultats obtenus, ce dérivé a une activité comparable à celle du MDHC (méthyldihydrocinnamate) utilisé comme référence.

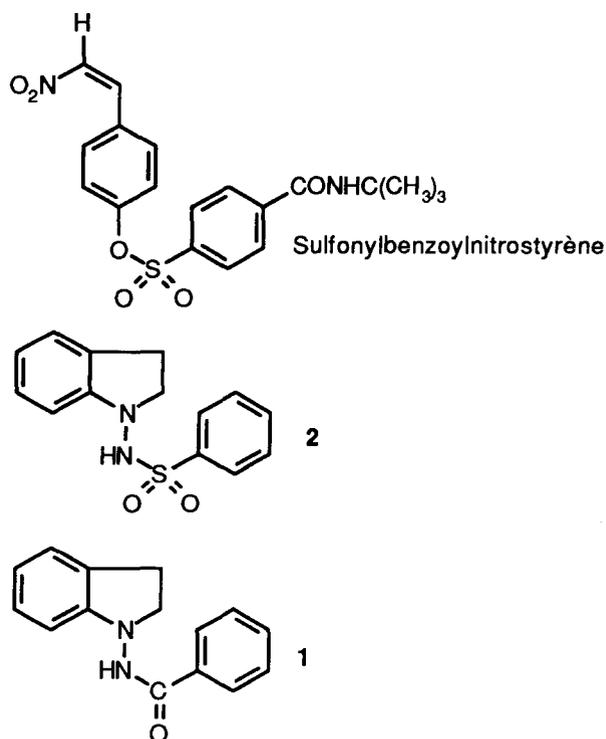


Figure 35 : Analogie de structure entre un sulfonylbenzoylnitrostyrène et les molécules conçues également pour inhiber l'oxydation des LDL.

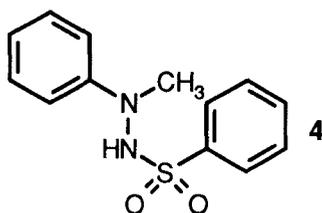


Figure 36.

Nous avons donc décidé, dans un premier temps, de substituer le groupement benzènesulfonyle de ce composé par un groupement carboxylique afin de définir l'importance de la présence d'une fonction acide pour la liaison des molécules au récepteur (figure 37). L'analogue indolinique de ce composé a également été envisagé.

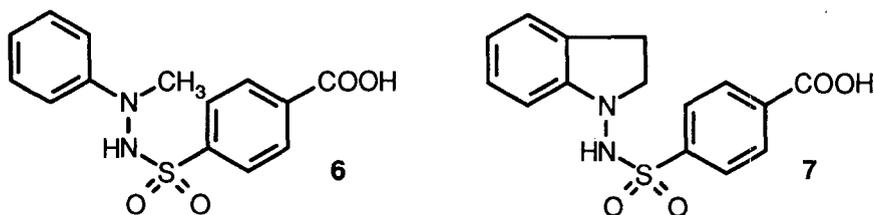


Figure 37.

Etant donné que l'activité des inhibiteurs "bisubstrats" nitrostyréniques a été démontrée (Traxler et coll., 1991), il nous a paru intéressant de substituer le noyau benzénique de la partie analogue de la tyrosine par un groupement NO_2 (figure 38).

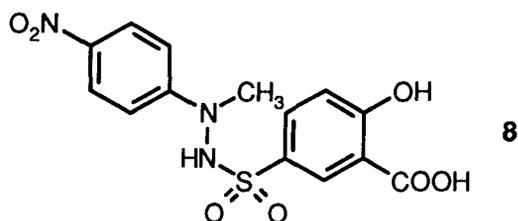


Figure 38.

D'autre part, bien que les analogues benzoylés de ces molécules n'aient pas montré d'activité au cours des tests réalisés à **UCB**, nous avons pensé que le fait de substituer le noyau benzénique pourrait être bénéfique. Pour ceci, nous avons choisi une chaîne éthylénique comportant une fonction carboxylique (figure 39). Ce groupement acide, comme les groupements phosphate, pourrait former un complexe avec l'ion métallique du site actif du récepteur (figure 29).

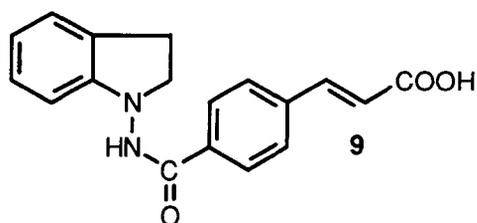


Figure 39.

ASTHME

I - Introduction.

L'asthme est aujourd'hui la maladie chronique la plus commune dans les pays industrialisés. Elle affecte environ 5 % de la population, aussi bien les enfants que les adultes, et des études épidémiologiques ont montré que la mortalité due à l'asthme, ainsi que la prévalence et la sévérité de cette pathologie, ont augmenté au cours des trois dernières décennies (Szelenyi, Bölcseki, 1989). D'après des études réalisées sur des familles d'asthmatiques et sur des jumeaux, il existe des prédispositions génétiques à l'asthme. Il a été montré que le caractère atopique de cette maladie est lié à un gène situé sur le onzième chromosome (Dunn, 1991 ; Burney, 1993). Mais ce sont surtout les facteurs environnementaux, tels que l'exposition croissante à des allergènes et à la pollution, qui contribuent à l'augmentation du nombre de cas d'asthme et à l'aggravation de cette maladie.

L'asthme, caractérisé par un rétrécissement des voies respiratoires, a longtemps été considéré comme une maladie mettant en jeu principalement une contractibilité anormale des muscles lisses bronchiques. Plus récemment, il est devenu évident que ce rétrécissement des voies respiratoires est la conséquence d'une inflammation chronique de la paroi bronchique (Barnes, 1989) dans laquelle plusieurs types de cellules sont impliqués, ainsi que des neuropeptides et de nombreux médiateurs. Le spasme musculaire, l'œdème de la muqueuse et l'hypersécrétion bronchique sont les manifestations consécutives à l'inflammation.

Avant de nous attacher à l'asthme en tant que maladie multifactorielle, nous allons nous intéresser aux inducteurs de l'inflammation bronchique et aux différents types de réactions asthmatiques provoquées par ces facteurs.

I-1- Inducteurs de l'inflammation et de l'obstruction bronchique.

La réaction asthmatique peut être déclenchée par de nombreux facteurs répartis en deux catégories distinctes :

- Les facteurs déclenchants spécifiques comprennent les allergènes (pollen, acariens, phanères animales) qui conduisent à l'asthme allergique, les infections virales (rhinovirus, para influenza) responsables de la bronchiolite du petit enfant, certains facteurs professionnels pouvant induire une réaction asthmatique (isocyanates, sels de platine, poussière de bois, produits pharmaceutiques, produits chimiques) ainsi que quelques médicaments comme les AINS (et surtout l'aspirine) et les β -bloquants.
- Les facteurs déclenchants non spécifiques tels que l'exercice physique, l'air froid et/ou sec, les fumées, les polluants atmosphériques, les produits chimiques, le stress, les facteurs climatiques, interviennent également dans la pathologie de l'asthme. Toutefois, leur rôle dans la genèse et l'intensité des manifestations asthmatiques demeure encore mal défini.

Au regard de ces différents facteurs déclenchants, plusieurs formes d'asthme ont été distinguées (Dunn, 1991 ; Savoy, Junod, 1989) :

- L'asthme intrinsèque, qui se manifeste habituellement à l'âge adulte, semble ne pas être dû à un allergène connu : les tests cutanés d'allergie sont le plus souvent négatifs et le taux d'immunoglobuline E (IgE) des patients est normal. Cette forme d'asthme acquiert souvent, à la longue, un caractère chronique, entrecoupé de crises plus sévères fréquemment associées à des affections respiratoires supérieures.
- L'asthme extrinsèque est rencontré chez l'enfant et l'adulte jeune, sa sévérité diminuant souvent avec l'âge. Il est dû à des allergènes d'origines diverses : pollen, graminées, acariens de la poussière, plumes, moisissures... Les tests cutanés d'allergie sont dans ce cas positifs et, le plus souvent, le taux d'IgE des patients augmente.
- Dans le cas des asthmes professionnels, c'est l'exposition à certaines substances dans le cadre du travail qui intervient, sans qu'il y ait nécessairement de prédisposition allergique .

Les allergènes et autres facteurs cités précédemment participent non seulement à la sensibilisation d'un individu et à la genèse de l'inflammation bronchique, mais aussi au déclenchement de l'obstruction plus ou moins sévère des voies respiratoires.

I -2- Réponse asthmatique immédiate et réponse asthmatique retardée.

Suivant le caractère temporaire ou non de l'obstruction bronchique provoquée par l'exposition à un allergène, on distingue principalement deux types de réaction dans l'asthme (figure 40):

- La réponse asthmatique immédiate intervient dans les minutes qui suivent l'exposition à un allergène, avec un pic au bout de 12 minutes environ. Cette réaction est associée aux cas d'asthme les moins sévères et disparaît en une à deux heures. Sa composante essentielle est la constriction du muscle lisse bronchique menant à une obstruction bronchique temporaire (Nsouli et coll., 1988 a).
- Au cours de la réponse asthmatique tardive (RAT), on observe une obstruction des voies respiratoires quelques heures après la survenance d'un événement déclenchant. Les symptômes peuvent ensuite être observés pendant plusieurs jours. Durant la RAT, l'obstruction bronchique répond peu aux bronchodilatateurs, ce qui suggère que le spasme du muscle lisse n'est pas la composante dominante de cette réaction. L'exacerbation de l'inflammation des muqueuses et des structures submucosales des voies respiratoires domine alors la pathologie et conduit à une obstruction bronchique persistante (Nsouli et coll., 1988 a). La maladie évolue ensuite vers une forme chronique.

A ces deux stades du développement de la maladie interviennent différentes cellules et différents médiateurs.

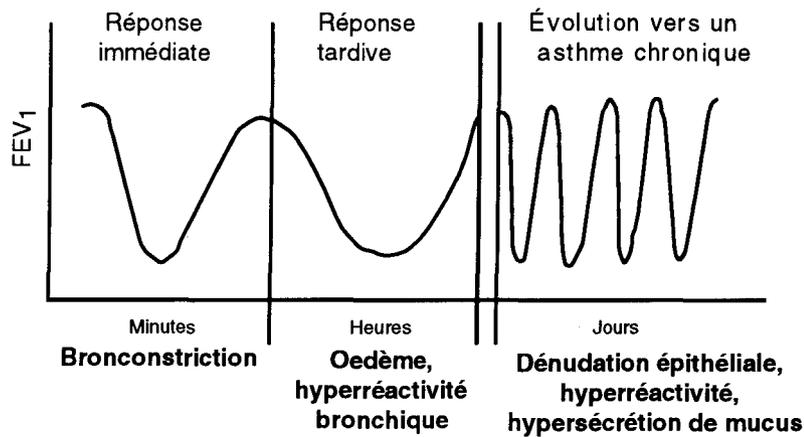


Figure 40 : La réponse asthmatique immédiate et la réponse asthmatique tardive (Alexander et coll., 1991) (FEV₁ : "Forced Expiratory Volume" en 1 seconde).

II - L'asthme : une maladie multifactorielle.

L'hyperréactivité bronchique est étroitement liée à la sévérité de la réponse asthmatique. L'augmentation de la réactivité bronchique semble succéder à l'exposition à un allergène ou à un événement extérieur, et dépendre de l'inflammation des voies respiratoires.

Des études histopathologiques effectuées sur des patients décédés au cours d'une crise d'asthme ont montré une inflammation très marquée des voies respiratoires, associée à l'infiltration de cellules inflammatoires telles que les éosinophiles, à la destruction de l'épithélium bronchique et à la formation d'un bouchon dû à des sécrétions visqueuses au niveau de la lumière des voies respiratoires. Des modifications pathologiques similaires mais moins étendues ont été rapportées pour des patients souffrant d'asthme modéré (analyse de biopsies bronchiques). L'augmentation du nombre de cellules inflammatoires a également été montré par l'analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire de sujets asthmatiques (Barnes, 1989).

L'importance relative de chaque type cellulaire dans la pathologie de l'asthme n'est pas déterminée. Il semblerait plutôt que les cellules interagissent entre elles (figure 41), ce qui provoquerait une hyperréactivité bronchique ainsi que la genèse d'un caractère chronique de l'asthme. Nous allons malgré tout passer en revue chaque type cellulaire en nous intéressant à leur rôle potentiel au cours du développement de la maladie.

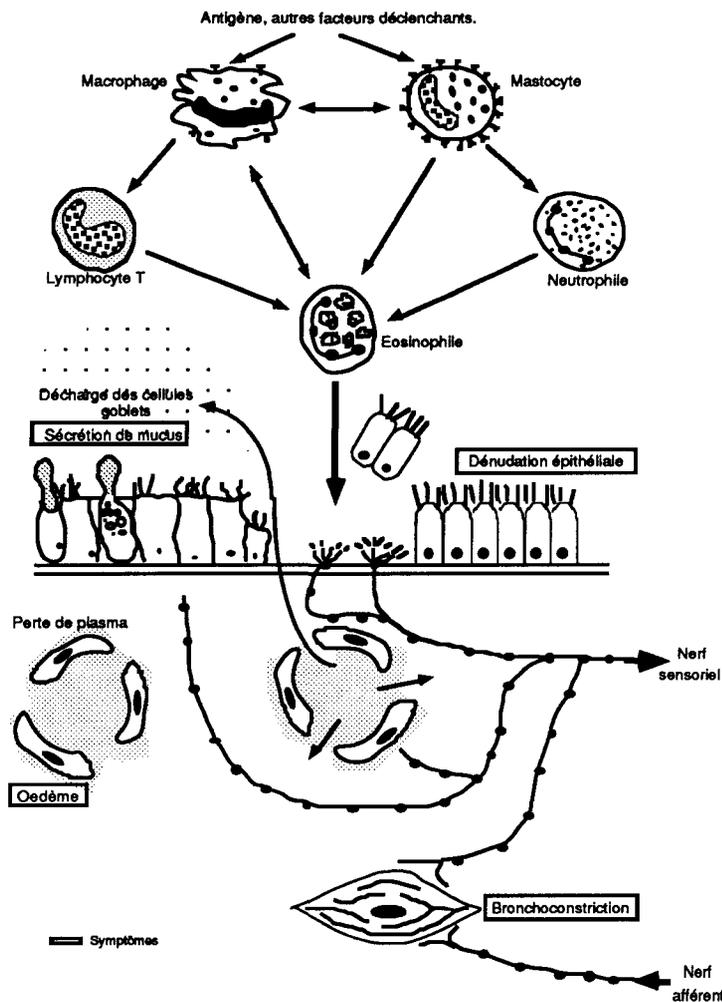


Figure 41 : Interactions des cellules inflammatoires dans l'asthme. Différentes cellules inflammatoires semblent être impliquées, ce qui conduit à l'infiltration d'éosinophiles, à la destruction de l'épithélium et à une hyperréactivité bronchique (Barnes, 1989).

II -1- Les différentes cellules inflammatoires impliquées.

II -1-1- Mastocytes.

Les mastocytes semblent être les premières cellules impliquées dans la réponse asthmatique après stimulation par un allergène via un mécanisme IgE-dépendant (IgE : Immunoglobuline E) ou par un facteur physique (l'hyperventilation au cours d'un exercice peut mener à une bronchoconstriction). Ces cellules sont présentes dans l'épithélium bronchique, dans la muqueuse et la sous-muqueuse tout le long de l'appareil respiratoire.

Les IgE sont caractéristiques des manifestations d'hypersensibilité comme le rhume des foins et l'asthme extrinsèque. Les IgE circulantes sont véhiculées dans le sang et se lient avec une très haute affinité aux récepteurs Fcε RI, protéines transmembranaires tétramériques de la membrane plasmique des mastocytes et de leurs équivalents circulants, les polynucléaires basophiles (Landry, Bronner, 1991). La synthèse et la sécrétion par les lymphocytes B activés d'anticorps de type IgE

résultent de l'exposition à un allergène ou à un antigène. Les anticorps se fixent aux récepteurs IgE des mastocytes. Lors d'une nouvelle exposition à la même substance ou à une molécule apparentée, les anticorps des mastocytes et des basophiles se lient aux molécules d'antigène ce qui, par des mécanismes complexes, mène à la libération par exocytose du contenu des granules des mastocytes et des basophiles circulants (figure 42).

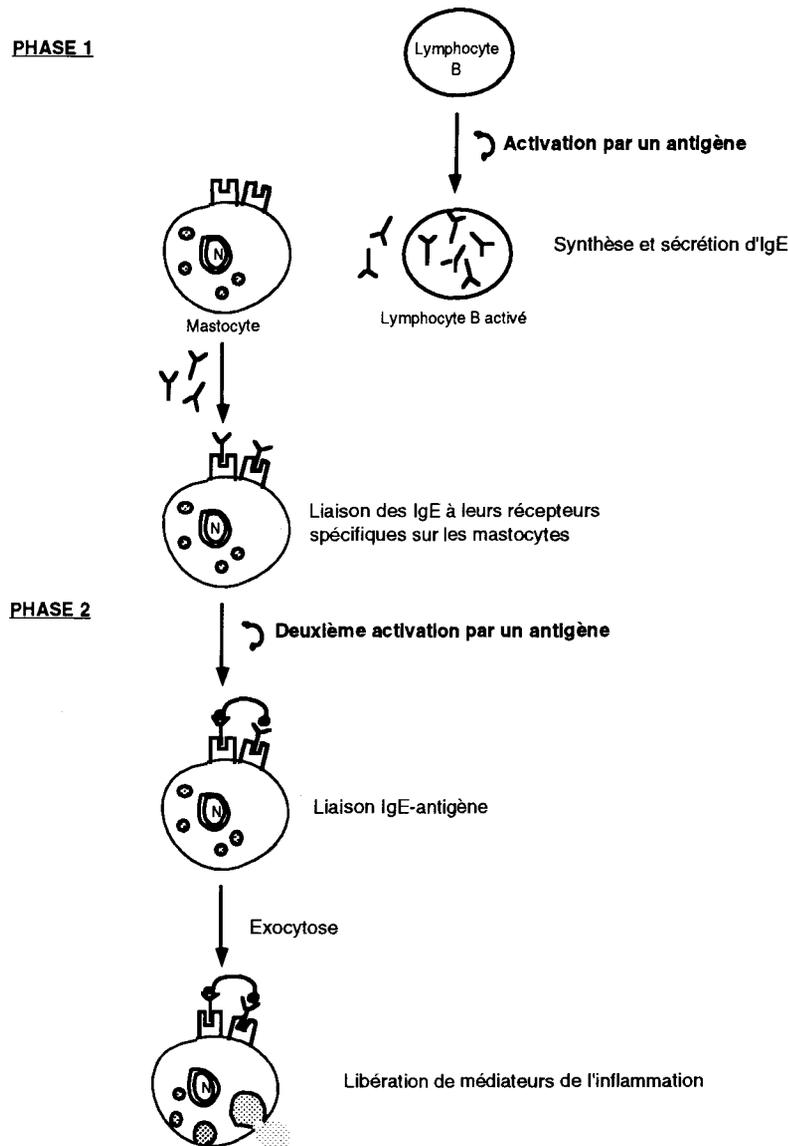


Figure 42 : Mécanismes allergiques impliqués dans l'asthme (Savoy, Junod, 1989).

La dégranulation des mastocytes permet la libération de médiateurs responsables de la bronchoconstriction tels que l'histamine, le leucotriène C₄ (LTC₄) et la prostaglandine D₂ (PGD₂). Ainsi, les mastocytes sont impliqués dans la réponse asthmatique immédiate caractérisée par une bronchoconstriction temporaire.

Les mastocytes pulmonaires humains libèrent également deux enzymes, la chymase et la tryptase, qui régulent l'activité neuropeptidique. La tryptase semble avoir une forte activité *in vivo* : elle augmente la sensibilité du muscle lisse bronchique vis à vis de l'histamine, participe à l'augmentation

du taux de bradykinine qui a un effet bronchoconstricteur important et dégrade le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) connu pour ses effets bronchorelaxants (Landry, Bronner, 1991).

Enfin, les mastocytes peuvent sécréter - en fonction de leur localisation ou de la nature du stimulus - de nombreux autres médiateurs qui pourraient intervenir au cours de la réponse asthmatique tardive : le PAF (Platelet Activating Factor), des protéoglycanes, des cytokines comme les interleukines (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6) et le GM-CSF (Granulocyte / Macrophage- Colony Stimulating Factor), la bradykinine ainsi que différents facteurs chimioattracteurs (Alexander et coll., 1991 ; Landry, Bronner, 1991 ; Pearce, 1993). Le rôle de ces médiateurs sera évoqué ultérieurement.

II -1-2- Macrophages.

Le macrophage alvéolaire est le type cellulaire le plus abondant au niveau des voies respiratoires (alvéole, muqueuse bronchique et bronchiolaire) et il intervient au cours de la réponse asthmatique (Tonnel et coll., 1991). Cette cellule possède des récepteurs à faible affinité aux IgE, les Fcε RII (Landry, Bronner, 1991 ; Capron et coll., 1993). Après activation par un stimulus IgE-dépendant ou un stimulus non spécifique, le macrophage alvéolaire est susceptible de libérer toute une série de médiateurs directement impliqués dans les processus allergiques : des dérivés de l'acide arachidonique comme les leucotriènes B₄ et C₄, le PAF et des cytokines : l'IL-6 et le TNF (Tumor Necrosis Factor).

Les macrophages alvéolaires des asthmatiques présentent une capacité accrue à sécréter les leucotriènes B₄, D₄ et le 5-HETE, et à libérer des radicaux libres oxygénés (Tonnel et coll., 1991). Ils auraient donc un rôle non négligeable dans l'amplification et la pérennisation de la crise d'asthme.

Le macrophage intervient également en tant que cellule régulatrice de la réponse immune locale puisque, après activation via le récepteur IgE, il sécrète préférentiellement un facteur inhibiteur de l'interleukine 1 (IL-1), ce qui conduit à une limitation naturelle de la réponse immune vis à vis de divers allergènes.

II -1-3- Eosinophiles.

Au cours de la réaction asthmatique, on peut observer une infiltration d'éosinophiles dans les voies respiratoires. L'inhalation d'un allergène provoque une augmentation du nombre d'éosinophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et il existe une relation entre le nombre d'éosinophiles et l'intensité de la réactivité bronchique (Barnes, 1989).

Les éosinophiles peuvent être activés, comme les macrophages, via les récepteurs Fcε RII des IgE, et plusieurs facteurs sont capables d'induire une expression accrue de ce récepteur tels que le taux d'IgE, l'ECFA (Eosinophil Chemotactic Factor) et le PAF (Tonnel et coll., 1991).

Une fois que les éosinophiles sont recrutés, certains agents tels que les GM-CSF ou l'IL-5 participent à leur maturation ce qui conduit, après dégranulation, à la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation dont le LTC₄ et le PAF.

La dégranulation des éosinophiles permet également la libération de protéines très agressives pour leur environnement : la MBP (Major Basic Protein), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) et l'EPO

(Eosinophil Peroxydase). Ces protéines sont cytotoxiques pour l'épithélium des voies respiratoires et contribuent à la dénudation épithéliale observée au cours de la réponse asthmatique tardive (Alexander et coll., 1991 ; Davies, Devalia, 1992).

II -1-4- Neutrophiles.

Tout comme pour les autres cellules, le rôle des neutrophiles dans la réaction asthmatique n'a pas encore été déterminé. Toutefois, des études ont montré une augmentation du pourcentage de neutrophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et dans le mucus bronchique durant la réponse asthmatique tardive.

Les neutrophiles peuvent être recrutés par différents agents chimioattracteurs, tels que le NCF (Neutrophil Chemotactic Factor) libéré par les mastocytes (Nsouli et coll., 1988 a) et le PAF. Ces cellules, une fois activées, sont associées à la libération de médiateurs peptidiques : prostaglandines, thromboxanes, LTB₄ et PAF, qui contribuent à l'exacerbation de la réponse inflammatoire. L'accumulation de neutrophiles dans l'appareil respiratoire au cours de l'inflammation conduit à une détérioration significative des tissus par libération de métabolites de l'oxygène (O₂⁻), de protéases et de produits cationiques (Alexander et coll., 1991).

II -1-5- Plaquettes.

Les plaquettes, comme les macrophages et les éosinophiles, possèdent sur leur membrane des récepteurs aux IgE, les récepteurs Fcε RII. Des études réalisées *in vitro* sur des plaquettes de patients souffrant d'asthme allergique ont montré que, une fois activées par des allergènes spécifiques, les plaquettes produisent des médiateurs cytotoxiques et des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Tonnel et coll., 1991). Elles libèrent aussi par dégranulation de l'histamine, du thromboxane, des produits de la 5-lipoxygénase et du PAF (Dunn, 1991).

II -1-6- Lymphocytes.

Les lymphocytes ont un rôle dans la régulation de la synthèse d'immunoglobulines E. Dans les pathologies de type allergique, et notamment dans l'asthme, les antigènes sont reconnus par les cellules dendritiques et par certains macrophages, puis par les lymphocytes T qui vont alors entrer en phase de différenciation cellulaire. Cela mène au "lymphocyte T helper" Th2 qui, lorsqu'il est activé, libère différentes interleukines (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) et le GM-CSF. Le phénotype Th1 du lymphocyte T, également présent au niveau des voies respiratoires, est davantage impliqué dans les réactions tardives d'hypersensibilité avec libération d'IL-2 et d'interféron γ (IFN γ), de TNF- β (Tumor Necrosis Factor- β) et de GM-CSF (figure 43).

L'antigène, reconnu par le phénotype Th2, est ensuite reconnu par le lymphocyte B qui va libérer l'IgE (Holgate, 1993 ; Capron et coll., 1993).

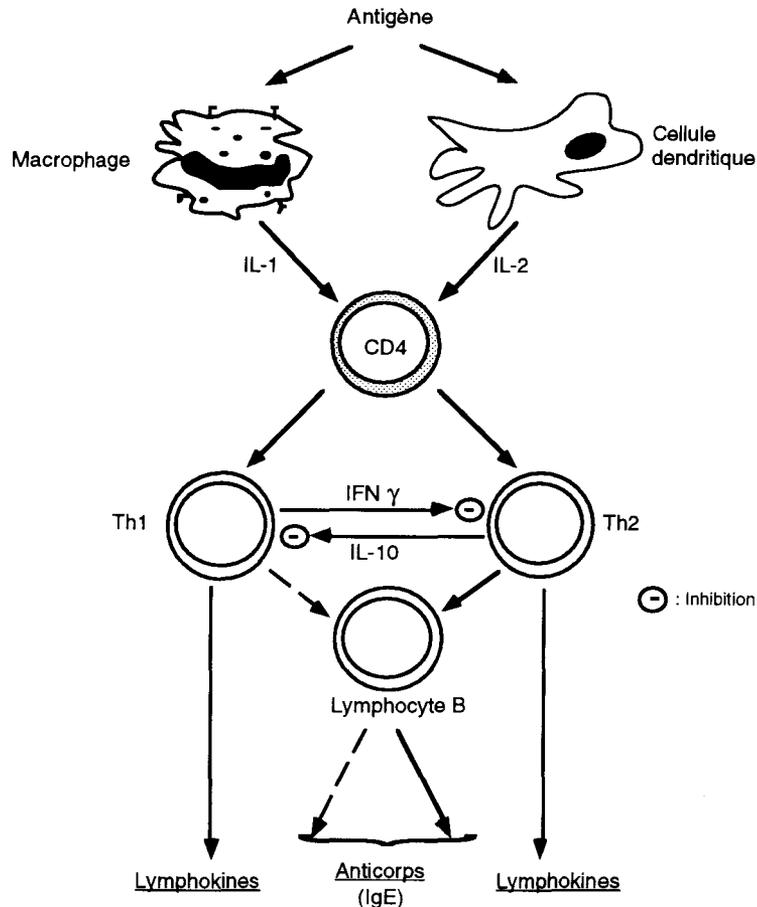


Figure 43 : Lymphocyte T. Production d'immunoglobulines (Ig) et de lymphokines. (CD4 : lymphocyte T CD₄ ; Th : lymphocyte T helper) (d'après Corrigan et coll., 1993 ; Holgate, 1993).

Comme nous l'avons déjà signalé, les interactions entre cellules paraissent très complexes : elles sont induites par différents médiateurs ayant sur certaines cellules un effet activateur et sur d'autres un effet inhibiteur. Nous allons maintenant décrire les activités potentielles de ces médiateurs dans l'asthme.

II -2- Les principaux médiateurs de l'inflammation et leur rôle au cours de la réponse asthmatique.

Les modifications pathologiques observées dans l'asthme semblent être dues à la libération de médiateurs par les cellules inflammatoires. Les modes d'action des médiateurs ne sont pas clairement établis à l'heure actuelle ; ils peuvent provoquer la contraction des muscles lisses bronchiques, directement ou indirectement via la libération de médiateurs secondaires ; ils peuvent également augmenter la sécrétion de mucus ainsi que la perméabilité vasculaire. Certains de ces médiateurs ont des propriétés chimioattractives : ils recrutent et activent de nouvelles cellules inflammatoires qui sont elles-mêmes susceptibles de libérer de nouveaux médiateurs, ce qui perpétue et amplifie la réponse

inflammatoire (Barnes et coll., 1991).

II -2-1- Histamine.

L'histamine, synthétisée par décarboxylation de l'histidine, est libérée principalement par dégranulation des mastocytes et de leurs équivalents circulants, les basophiles.

La propriété principale de l'histamine est d'induire la bronchoconstriction. Par contre, elle ne semble pas avoir d'influence sur l'hyperréactivité bronchique (Barnes et coll., 1991).

Les autres effets de l'histamine pouvant se manifester au cours de la réponse asthmatique sont caractérisés par :

- une augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau de la microvasculature bronchique : on pense que cela est dû à une contraction des cellules endothéliales des veinules postcapillaires.
- une augmentation de la sécrétion de mucus.
- un chimiotactisme pour les éosinophiles.

II -2-2- Dérivés de la 5-lipoxygénase.

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressée au rôle des leucotriènes pendant le développement de la réaction asthmatique.

Les leucotriènes sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique par la voie de la 5-lipoxygénase (5-LO) (figure 44), voie que nous étudierons en détail dans un prochain chapitre. Ils peuvent avoir de nombreuses actions pharmacologiques qui contribuent à l'obstruction des voies respiratoires, à savoir : induction de la contraction du muscle lisse bronchique, formation d'un œdème, augmentation de la sécrétion de mucus (Barnes, 1989).

Les leucotriènes - principalement le LTC₄ et le LTB₄ - ont été détectés dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire des patients asthmatiques, aussi bien à l'état de repos qu'à la suite d'une réaction antigénique. Les leucotriènes D₄ et E₄ sont également présents, mais en plus petites proportions. Le LTE₄ a été détecté dans les urines et est utilisé comme marqueur de la libération de peptidoleucotriènes (c'est à dire LTC₄, LTD₄ et LTE₄) dans l'asthme. Le taux urinaire de LTE₄ augmente au cours de la crise d'asthme sévère et jusqu'à trois heures après l'exposition à un allergène, ce qui est corrélé à la sévérité de la bronchoconstriction. Par contre, lors de la réponse asthmatique tardive, il a été montré que le taux urinaire de LTE₄ est stable (Arm, 1993).

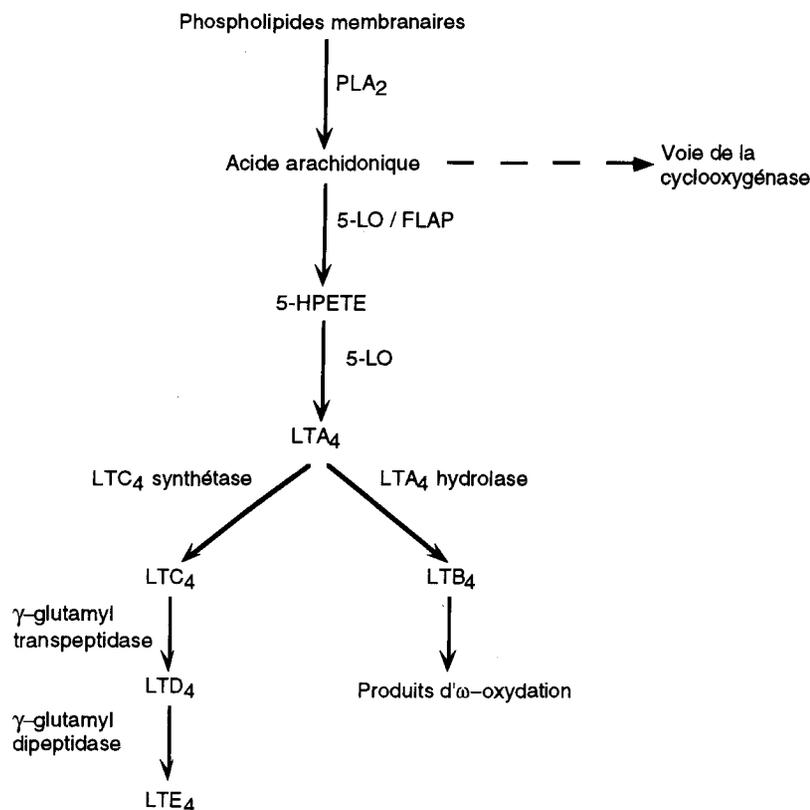


Figure 44 : Métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la 5-LO. PLA₂ : Phospholipase A₂ ; FLAP : "5-Lipoxygenase Activating Protein" ; 5-HPETE : "5-Hydroperoxy Eicosatetraenoic acid" ; LT : leucotriène.

II -2-2-1- Leucotriène B₄.

Il est principalement libéré par les neutrophiles et, en plus petite proportion, par les éosinophiles, les macrophages et les mastocytes (Barnes et coll., 1991). Les effets *in vitro* du LTB₄ sur les neutrophiles sont nombreux : le plus important est leur effet chimiodynamisant et chimioattracteur pour ces cellules ; ceci est accompagné par l'induction de l'agrégation de ces mêmes cellules qui vont libérer des enzymes lysosomales et adhérer aux cellules endothéliales (Arm, 1993 ; Chanarin, Johnston, 1994). Le LTB₄ possède également une activité de chimiotactisme pour les éosinophiles ; il peut activer les lymphocytes, d'où la libération d'IFN γ et d'IL-2. Enfin, le LTB₄ est un bronchoconstricteur modeste et est susceptible, en présence de vasodilatateurs comme la prostaglandine E₂, d'augmenter la sécrétion de mucus et la perméabilité vasculaire (Bjornsdottir, Bush, 1993).

II -2-2-2- Peptidoleucotriènes.

Les peptidoleucotriènes sont synthétisés par les cellules inflammatoires. Au niveau des mastocytes, seul le LTC₄ a été détecté ; il semblerait que ce leucotriène, une fois libéré, soit rapidement transformé en LTD₄ puis en LTE₄ par les tissus des voies respiratoires. Les plaquettes sont également capables de libérer le LTC₄. Les neutrophiles libèrent de faibles

quantités de peptidoleucotriènes ; quant aux éosinophiles et aux macrophages, ils en produisent des quantités importantes.

Les LTC₄, D₄ et E₄ participent aux modifications structurales des muqueuses observées dans l'asthme, conduisant à une obstruction des voies respiratoires.

II -2-2-2-1- Peptidoleucotriènes et bronchoconstriction.

La faculté des peptidoleucotriènes à induire la contraction du muscle lisse bronchique a été montrée *in vitro* sur des préparations de cellules humaines ou animales. Le LTC₄ et le LTD₄ sont 1000 fois plus actifs que l'histamine. Le LTE₄ semble être moins actif que ses précurseurs mais sa durée d'action est plus longue (Barnes et coll., 1991).

Des études réalisées *in vivo* ont démontré que l'inhalation de peptidoleucotriènes provoque une bronchoconstriction, aussi bien chez des individus sains que chez des asthmatiques, bien que dans ce dernier cas la réponse soit exacerbée (Barnes et coll., 1991). Le LTC₄ et le LTD₄ ont, comme *in vitro*, des activités similaires, alors que le LTE₄ est de 30 à 100 fois moins actif. Le LTD₄ et le LTE₄ agissent en 4 à 6 minutes après leur administration. Dans le cas du LTC₄, le délai d'action est compris entre 10 et 20 minutes (Bjornsdottir, Bush, 1993 ; Chanarin, Johnston, 1994).

Chez l'homme, contrairement à ce qui a été observé pour le cobaye, il n'existe qu'un seul récepteur pour le LTC₄ et le LTD₄ : il faut, pour que LTC₄ agisse, qu'il soit préalablement transformé en LTD₄, ce qui expliquerait son délai d'action élevé. Il a été montré que le LTE₄ était un agoniste partiel du récepteur LTD₄, récepteur qui, jusqu'à aujourd'hui, n'a pas encore été caractérisé (Musser, 1989 ; Chanarin, Johnston, 1994).

Les peptidoleucotriènes apparaissent donc comme étant des agonistes potentiels de la bronchoconstriction ayant une durée d'action plus longue que celle de l'histamine. Leur effet initial s'exerce par stimulation de récepteurs spécifiques, mais les mécanismes menant à la bronchoconstriction demeurent obscurs. Certaines études suggèrent que le calcium extracellulaire serait nécessaire à l'induction de la bronchoconstriction par le LTD₄, alors qu'il ne le serait pas dans le cas du LTE₄ (Bjornsdottir, Bush, 1993).

II -2-2-2-1- Peptidoleucotriènes et sécrétion du mucus.

L'augmentation de la sécrétion de mucus joue un rôle important au cours de l'obstruction des voies respiratoires et conduit, dans les cas d'asthme sévère, à la formation d'un bouchon composé de mucus libéré par les glandes submucosales et d'un amas de produits de l'inflammation riche en éosinophiles et en neutrophiles. La sécrétion de mucus est également associée aux états de morbidité et à la mortalité observés chez les asthmatiques.

Des études réalisées *in vitro* sur des prélèvements de voies respiratoires humaines ont montré que la production de mucus était augmentée lors de l'exposition au LTC₄ ou au LTD₄. Cependant, lorsque des individus sains ou asthmatiques inhalent des peptidoleucotriènes, il n'y a pas d'augmentation sensible de la production de mucus au niveau des voies respiratoires

(Bjornsdottir, Bush, 1993 ; Chanarin, Johnston, 1994). Le rôle des peptidoleucotriènes dans la sécrétion de mucus est donc incertain.

II -2-2-2-1- Peptidoleucotriènes et formation d'un œdème.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire avec migration de plasma, puis d'eau, vers les voies respiratoires conduit à la formation d'un œdème. Les peptidoleucotriènes sont capables d'induire la contraction des cellules endothéliales des veinules postcapillaires des voies respiratoires des cobayes (études réalisées *in vitro*) : on observe alors l'extravasation de macromolécules et de marqueurs tels que le bleu d'Evans , l'albumine radioactive et les macromolécules conjuguées fluorescentes (Barnes, 1989 ; Barnes et coll., 1991). Le LTD₄ est 10 fois moins actif que le PAF mais plus actif que l'histamine (Chanarin, Johnston, 1994). Chez l'homme, l'extravasation du bleu d'Evans administré par voie intraveineuse a été mesurée et il apparaît que le LTD₄ potentialise l'augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau de l'arbre bronchique avec formation d'un œdème (Bjornsdottir, Bush, 1993).

II -2-3- Dérivés de la cyclooxygénase.

La métabolisation de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase conduit à la formation des prostaglandines (PGF_{2α}, PGD₂, PGE₂), du thromboxane A₂ (TXA₂) et de la prostacycline (PGI₂).

La PGD₂, libérée par les mastocytes du poumon humain et par les macrophages alvéolaires, semble avoir une activité au niveau de la bronchoconstriction : en effet, cette prostaglandine potentialise la contraction du muscle lisse bronchique induite par l'histamine ou la métacholine *in vitro*. La PGD₂ serait également susceptible d'augmenter la sécrétion de mucus et exercerait une activité chimioattractive vis à vis des neutrophiles.

Les macrophages alvéolaires, les plaquettes et les neutrophiles libèrent, lorsqu'ils sont activés, la PGE₂ dont le rôle dans la réponse asthmatique n'est pas clarifié : elle a été décrite aussi bien dans la bronchoconstriction que dans la bronchodilatation par différents auteurs.

La PGF_{2α}, synthétisée par les macrophages alvéolaires, est trois fois moins active que la PGD₂, son rôle étant également de potentialiser la bronchoconstriction induite par l'histamine ou la métacholine. Cette prostaglandine provoque également une augmentation de la sécrétion de mucus.

Le TXA₂, ayant essentiellement pour origine les plaquettes et les neutrophiles, a été impliqué au niveau de la bronchoconstriction et aurait un effet chimiotactique vis à vis des neutrophiles. Mais il exercerait surtout un rôle dans la pathogenèse de l'hyperréactivité bronchique.

La prostacycline - libérée par les cellules endothéliales, les neutrophiles et les plaquettes - n'aurait quant à elle aucune activité directe au niveau de la bronchoconstriction. Ce serait un inhibiteur des fonctions plaquettaires (Barnes et coll., 1991).

II -2-4- PAF.

Le PAF est libéré par de nombreuses cellules inflammatoires : les mastocytes, les neutrophiles,

les plaquettes et les macrophages. Les phospholipides membranaires, sous l'action de la PLA₂, mènent à la formation d'acide arachidonique et de lyso-PAF, intermédiaire inactif qui est transformé - sous l'action d'une acétyl-transférase - en PAF (figure 45). Notons qu'il existe une seconde voie de synthèse du PAF -directe- sous l'action de l'enzyme cholinephosphotransférase à partir des phospholipides. C'est ce mode de synthèse qui est mis en jeu dans la régulation du niveau physiologique du PAF dans les cellules et qui est responsable, par exemple, de la régulation de la pression sanguine.

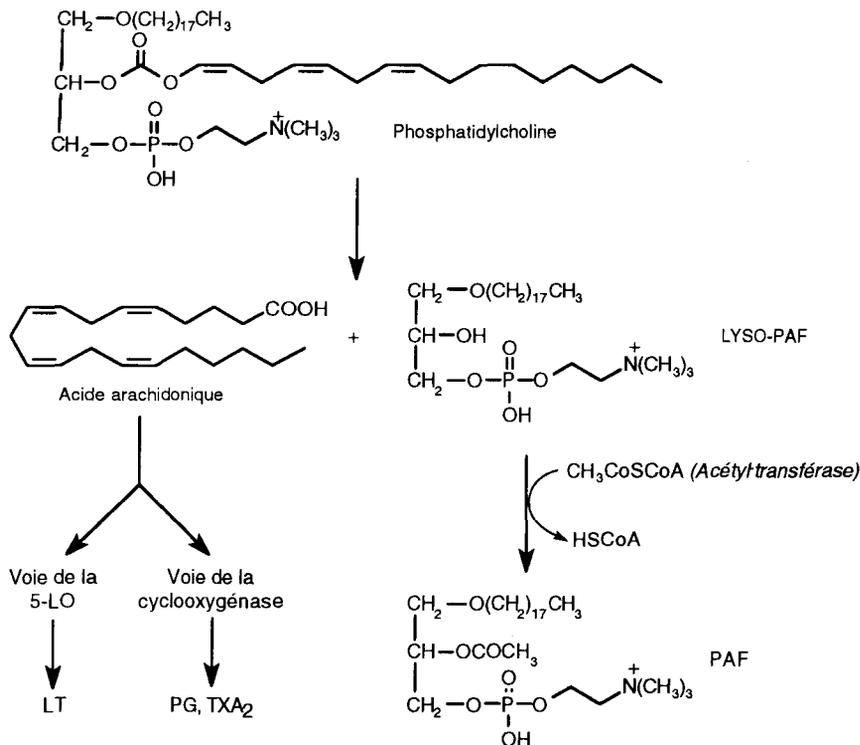


Figure 45 : Biosynthèse du PAF.

Différentes études ont montré que le PAF pourrait avoir de nombreux rôles au cours de la réaction asthmatique : c'est un inducteur potentiel de la bronchoconstriction et il est susceptible d'augmenter la sécrétion de mucus et la perméabilité vasculaire.

Le PAF est également impliqué au niveau de l'activation cellulaire : *in vitro*, le PAF est capable d'induire non seulement l'agrégation plaquettaire, mais également celle des neutrophiles et des monocytes, ce qui conduit à la libération de médiateurs secondaires de l'inflammation tels que les radicaux oxygénés, les produits de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase. De plus, le PAF est un agent chimioattracteur pour les neutrophiles mais surtout pour les éosinophiles et induit la libération, par dégranulation des éosinophiles, de différents médiateurs de l'inflammation dont le LTC₄. Enfin, le PAF semble impliqué au niveau de l'activation des macrophages, avec libération de radicaux libres oxygénés.

Des études *in vivo* ont montré que le PAF participait au recrutement de certaines cellules inflammatoires : les neutrophiles chez les patients normaux et les éosinophiles chez les asthmatiques,

les plaquettes au niveau des tissus pulmonaires (Barnes, 1989 ; Barnes et coll., 1991).

II -2-5- Cytokines.

Les cytokines sont produites par différentes cellules inflammatoires impliquées dans la réaction asthmatique : les lymphocytes T surtout (libération d'IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN γ , TNF α , TNF β , GM-CSF) mais aussi les macrophages (IL-6, TNF) et, en moindre proportion les mastocytes. Il faut également noter la production de cytokines par les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (GM-CSF, TNF, IL-1, IL-8) (Barnes et coll., 1991 ; Tonnel et coll., 1991 ; Davies, Devalia, 1992).

L'interleukine-4 est une cytokine clef pour la synthèse par les lymphocytes B de l'IgE à partir des immunoglobulines M et G : elle interagit avec les lymphocytes B grâce à des récepteurs spécifiques situés à la surface de ces cellules (figure 46). L'IL-4 est également nécessaire au développement et à la maturation de phénotype Th2 du lymphocyte T (Holgate, 1993). L'IL-3 est impliquée au cours de la croissance, la différenciation et la régulation des basophiles et des mastocytes. L'IL-5 et le GM-CSF ont des activités similaires en ce qui concerne les éosinophiles. Il semblerait que ces cytokines induisent une synthèse accrue de récepteurs membranaires à l'IgE à la surface de ces cellules. De même, l'IFN γ est responsable de l'activation des plaquettes et des macrophages alors que l'IL-4 agit seulement au niveau des macrophages (Capron et coll., 1993).

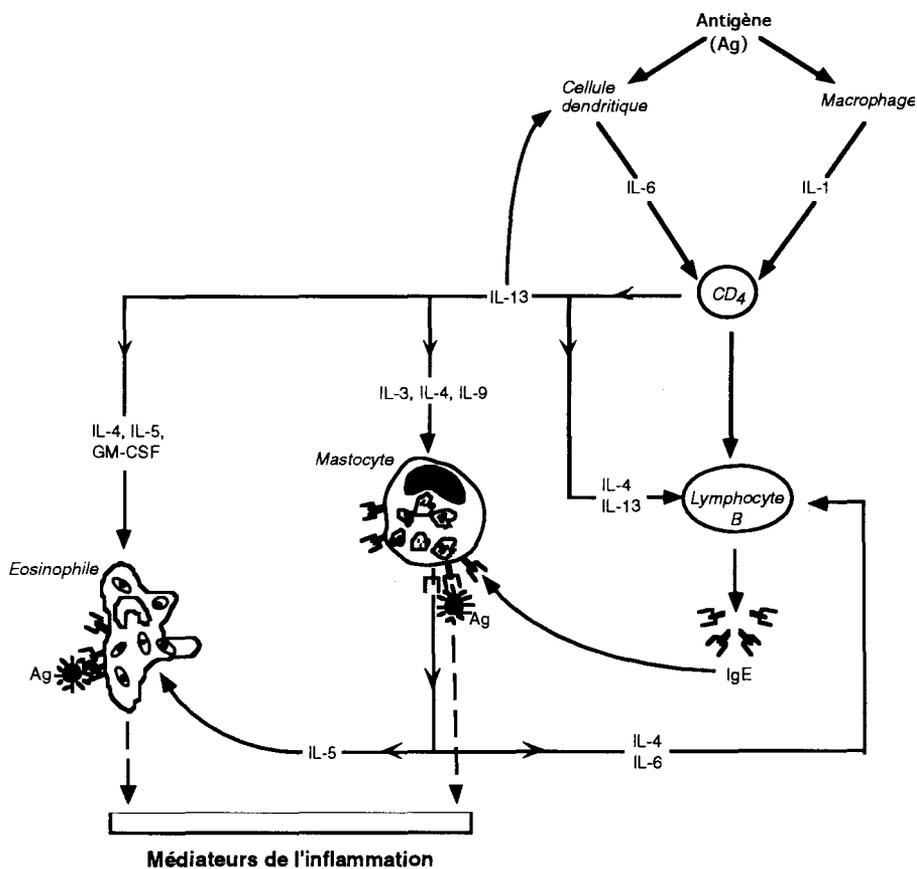


Figure 46 : Représentation schématique de l'implication des cytokines dans la réponse immunitaire

(Holgate, 1993).

II -2-6- Autres médiateurs.

D'autres médiateurs de l'inflammation semblent être impliqués dans la réponse asthmatique, mais leurs rôles ne sont pas totalement définis (tableau 4) (Barnes, 1989).

Il existe entre ces différents médiateurs de nombreuses interactions et, pour connaître leur rôle exact, il est nécessaire de développer la recherche d'antagonistes sélectifs. Il est aussi possible que d'autres médiateurs soient impliqués.

L'activation de tous ces médiateurs est susceptible de mener à la destruction de l'épithélium bronchique.

Médiateurs	Bronchoconstriction	Sécrétion	Perméabilité vasculaire	Chimiotactisme	Hyperréactivité bronchique
Bradykinine	+	+	++	-	-
Adénosine	+	?	?	?	-
Substance P	+	++	++	±	-
Neurokinine A	++	?	+	-	-
VIP					
Endothéline					
Fragments du complément	+	+	+	++	-
Sérotonine	±	?	+	-	-
Radicaux oxygénés	+	?	+	?	-

Tableau 4: Autres médiateurs impliqués dans l'asthme (d'après Barnes, 1989).

II -3- Épithélium bronchique et inflammation.

L'épithélium bronchique constitue avant tout une barrière ayant un rôle vital dans le maintien de l'homéostasie physico-chimique et empêchant l'entrée d'agents toxiques dans les tissus sous-jacents. La perturbation et la destruction des cellules épithéliales peuvent intervenir au cours de la réponse asthmatique.

III -3-1- Structure de l'épithélium bronchique.

On distingue deux grands types de cellules au niveau de l'épithélium bronchique (Davies, Devalia, 1992) :

- Les cellules en colonne (figure 47).

Elles se répartissent en cellules ciliées et en cellules non ciliées. Les cellules non ciliées sont surtout impliquées dans la production de sécrétions. Elles comprennent les cellules gobelets et les cellules séreuses. Ce sont aussi les cellules progénitrices des cellules ciliées.

Les cellules ciliées forment une barrière perméable et permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium. Elles jouent un rôle central dans la clairance mucociliaire, moyen de défense contre les agents infectieux et les substances toxiques inhalées.

- Les cellules basales (figure 47).

Elles interviennent pour la fixation des cellules en colonne à la membrane inférieure des voies

respiratoires.

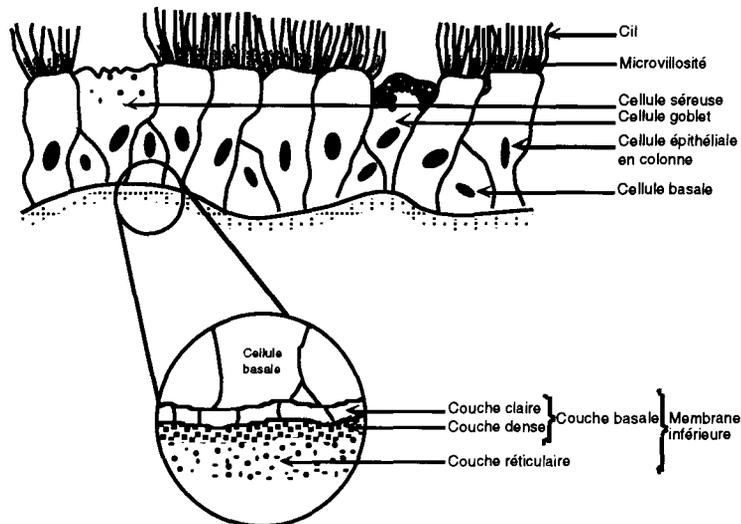


Figure 47 : Structure de l'épithélium bronchique. Principaux types de cellules épithéliales (Davies, Devalia, 1992).

L'adhésion entre ces cellules est assurée par différentes structures, les desmosomes et les hémidesmosomes, qui permettent le maintien de l'intégrité de l'épithélium bronchique. Les desmosomes sont présents à l'interface des cellules en colonne et des cellules basales, mais aussi entre des cellules en colonne adjacentes. Les hémidesmosomes permettent la fixation des cellules basales à la membrane inférieure de l'épithélium.

III -3-2- Épithélium bronchique et réponse inflammatoire.

Des études post-mortem mais aussi des techniques récentes de biopsie bronchique ont montré que l'épithélium bronchique subissait, au cours du développement de la réponse asthmatique, des modifications conduisant à sa destruction. Chez l'asthmatique, l'épithélium semble être fragilisé : la perte de cellules en colonne a été observée, mais il existe également des signes de destruction intracellulaire, tels que la vacuolisation du réticulum endoplasmique de ces cellules (Laitinen, Laitinen, 1991). Ainsi, les cellules en colonne se détachent de l'épithélium bronchique, laissant les cellules épithéliales basales à découvert.

Des examens histopathologiques ont montré que l'étendue de la destruction de l'épithélium était corrélée au degré d'hyperréactivité bronchique (Jeffery, 1992). Actuellement, on ne sait pas si cette destruction conduit à l'augmentation de la réactivité bronchique ou si ce sont l'exacerbation de la réponse inflammatoire et l'hyperréactivité bronchique en résultant qui induisent la dénudation épithéliale.

La disparition des cellules en colonne à la surface de l'épithélium bronchique pourrait être une conséquence indirecte de l'œdème des voies respiratoires, mais il est plus probable que ce soit le résultat de la libération de substances hautement cytotoxiques (ozone, protéines libérées par les éosinophiles) (Jeffery, 1992 ; Montefort et coll., 1993). En effet, chez des patients présentant un

asthme modéré, les techniques de biopsie bronchique ont mis en évidence l'infiltration des muqueuses par des éosinophiles, des lymphocytes et, en moindre proportion, par des neutrophiles. Les éosinophiles apparaissent comme étant les principales cellules inflammatoires responsables de la destruction de l'épithélium bronchique : les protéines que ces cellules libèrent par dégranulation - à savoir la MBP (Major Basic Protein), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) et l'EPO (Eosinophil Peroxydase) - sont capables d'endommager l'épithélium des voies respiratoires *in vitro* et ont été détectées en quantité importante à la périphérie des zones endommagées de l'épithélium chez des sujets décédés au cours d'une crise d'asthme (Davies, Devalia, 1992). Le lieu d'action principal de ces protéines semble être le plan situé entre les cellules en colonne et les cellules basales de l'épithélium bronchique : on observe l'affaiblissement des structures d'adhésion, les desmosomes (Holgate, 1993). Les mécanismes responsables de ces modifications au niveau des desmosomes ne sont pas connus.

Les éosinophiles sont recrutés au voisinage de l'épithélium bronchique par différents médiateurs de l'inflammation (PAF, LTB₄). Les cytokines (IL-5, IL-3, GM-CSF), produites principalement par les lymphocytes T, sont impliquées dans le recrutement des éosinophiles, mais également au cours de leur croissance, de leur différenciation et de leur maturation conduisant à leur dégranulation et à la libération des protéines cytotoxiques (Jeffery, 1992 ; Davies, Devalia, 1992 ; Holgate, 1993).

On peut alors envisager différents mécanismes impliquant entre autres les cellules épithéliales pouvant induire le développement d'une hyperréactivité bronchique :

- augmentation de la perméabilité de l'épithélium bronchique, ce qui permet aux allergènes et autres substances de pénétrer dans les voies respiratoires. Ceci est la conséquence directe de la perte d'adhésion entre les cellules épithéliales.
- modification de la composition du mucus bronchique : les cellules épithéliales perdent leur composante ciliée et ne sont plus capables d'assurer la clairance du mucus.
- exposition des fibres nerveuses situées à proximité de la couche basale de l'épithélium à divers stimuli : la voie cholinergique, la voie adrénergique et le système NANC (Non-Adrenergic Non-Cholinergic) sont impliquées dans la réponse asthmatique.
- production de médiateurs de l'inflammation : les cellules épithéliales humaines libèrent *in vitro* des prostaglandines (PGE₂, PGF_{2α}) et des métabolites de la 12- et de la 15-lipoxygénase, dont le 15-HETE, agent chimioattracteur des éosinophiles.
- production de cytokines spécifiques : dans l'asthme, on observe une production accrue d'IL-8 et de GM-CSF par l'épithélium bronchique. L'IL-8 est un agent chimioattracteur des éosinophiles, alors que le GM-CSF prolonge leur durée de vie.
- modulation des médiateurs de l'adhésion cellulaire : l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) est produite par les cellules épithéliales, son expression étant régulée par l'IL-1, l'IFN γ et le TNF. Cette molécule est active au cours du recrutement et de la migration des éosinophiles et des neutrophiles.
- libération de facteurs de croissance : le PDGF et l'endothéline induisent la prolifération des

myofibroblastes situés juste en dessous de la membrane épithéliale inférieure. Les myofibroblastes synthétisent du collagène qui s'accumule dans la couche réticulaire de l'épithélium : on observe un épaississement caractéristique de la membrane inférieure de l'épithélium. Ces facteurs de croissance agissent également sur les cellules musculaires lisses des voies respiratoires.

Le processus d'inflammation chronique observé au cours de la réponse asthmatique résulte dans la destruction de l'épithélium bronchique. Vont alors intervenir des étapes de réparation : on observe un épaississement de la couche réticulaire de l'épithélium (figure 47), épaississement qui est considéré comme caractéristique de l'asthme et qui est visible dans des formes d'asthme précoce et modéré ; ces processus de réparation mettent aussi en jeu les cellules responsables de la production de mucus : à la surface de l'épithélium bronchique, il y a une augmentation du nombre de cellules gobelets qui contribuent à la sécrétion de mucus ; enfin, on observe une augmentation de la masse musculaire lisse dans la paroi des voies respiratoires : ce phénomène est attribué principalement à une augmentation du nombre de cellules musculaires lisses (Jeffery, 1991 ; Jeffery, 1992).

III -3-3- Prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires chez l'asthmatique.

De nombreuses études ont établi que la masse de muscle lisse augmentait au cours du développement de la maladie au niveau des voies respiratoires des patients. Ceci est attribué à une hyperplasie plutôt qu'à une hypertrophie du muscle lisse : il semblerait que le nombre de cellules musculaires lisses soit multiplié par deux ou trois par rapport à la normale dans les voies respiratoires d'un asthmatique (Knox, 1994).

Cette prolifération peut être induite par différents facteurs de croissance libérés par les nombreuses cellules mises en jeu dans la pathologie de l'asthme. Les facteurs de croissance agissent sur des récepteurs liés à des messagers secondaires qui, par des mécanismes de transduction, produiront un signal responsable de la division cellulaire.

Plusieurs systèmes de transduction ont été envisagés au cours de la réponse asthmatique (figure 48). L'histamine stimule *in vitro* la prolifération des cellules musculaires lisses de la trachée de chien via un mécanisme dépendant de la protéine kinase C (PKC) (Panettieri et coll., 1990) : l'histamine se lie à des récepteurs couplés à la PLC (Phospholipase C), ce qui stimule la formation de diacylglycérol (DAG) et la libération de PKC (Knox, 1994).

L'endothéline-1 se lie aux récepteurs ET_A des cellules musculaires lisses bronchiques (récepteurs couplés à la PLC) et provoque ainsi la libération d'inositol-1,4,5-triphosphate. Il y a alors accumulation de calcium intracellulaire ce qui, après une cascade d'événements, mène à la division cellulaire (Noveral et coll., 1992 ; Glassberg et coll., 1994 ; Tomlinson et coll., 1994).

Des facteurs de croissance comme le PDGF et l'EGF (Epidermal Growth Factor) stimulent *in vitro* l'activation d'une protéine-tyrosine kinase, d'où la phosphorylation de résidus tyrosine de substrats intracellulaires et la division cellulaire en résultant (figure 48).

La bradykinine, via un mécanisme dépendant de la PLD (Phospholipase D), active une PKC, ce qui mène également à une prolifération cellulaire.

D'autres médiateurs tels que le LTD₄, la tryptase, le TXA₂, la thrombine (provenant du sang) et les cytokines (surtout IL-1) peuvent avoir une activité au niveau de l'augmentation de la masse musculaire des voies respiratoires mais les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

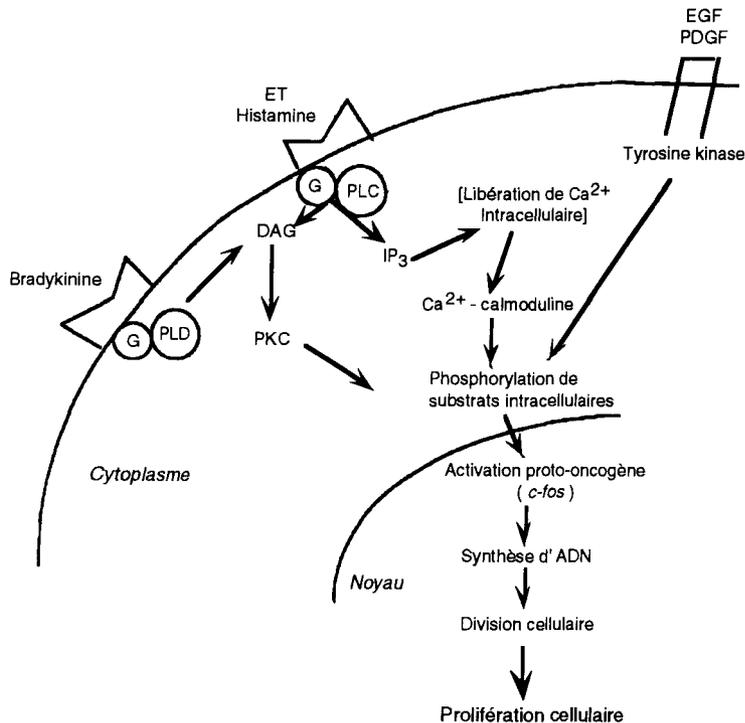


Figure 48 : Systèmes de transduction impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires et exemples d'agonistes des récepteurs membranaires activant ces systèmes (d'après Knox, 1994).

L'hyperplasie des muscles lisses trachéo-bronchiques peut avoir deux conséquences majeures : elle participe à l'épaississement de la couche basale de l'épithélium et donc à un certain rétrécissement des voies respiratoires ; mais il faut aussi noter que cet accroissement de la masse musculaire permet, en réponse à un stimulus bronchoconstricteur, un raccourcissement plus important qu'en temps normal du muscle bronchique, et donc une bronchoconstriction plus sévère (Carroll et coll., 1993).

Au cours de ce travail, nous avons envisagé d'agir sur deux mécanismes pouvant induire la bronchoconstriction ainsi que l'exacerbation de la réponse asthmatique responsables des formes d'asthme chronique. Notre première stratégie est d'inhiber l'activation et la prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires pour éviter le rétrécissement de la lumière bronchique. Nous avons par ailleurs travaillé au niveau d'un médiateur de la bronchoconstriction et de l'inflammation dans l'asthme et avons choisi comme cible les peptidoleucotriènes.

III - Drug design.

III -1- Médicaments utilisés et principaux axes de recherche.

III -1-1- Traitements de l'asthme.

Les médicaments utilisés à l'heure actuelle sont soit des bronchodilatateurs, soit des agents anti-inflammatoires. Le choix de la thérapie s'effectue suivant la nature et la gravité de l'asthme (figure 49). On utilise parallèlement à ces médicaments des techniques de désensibilisation qui ont fait leurs preuves dans l'asthme allergique.

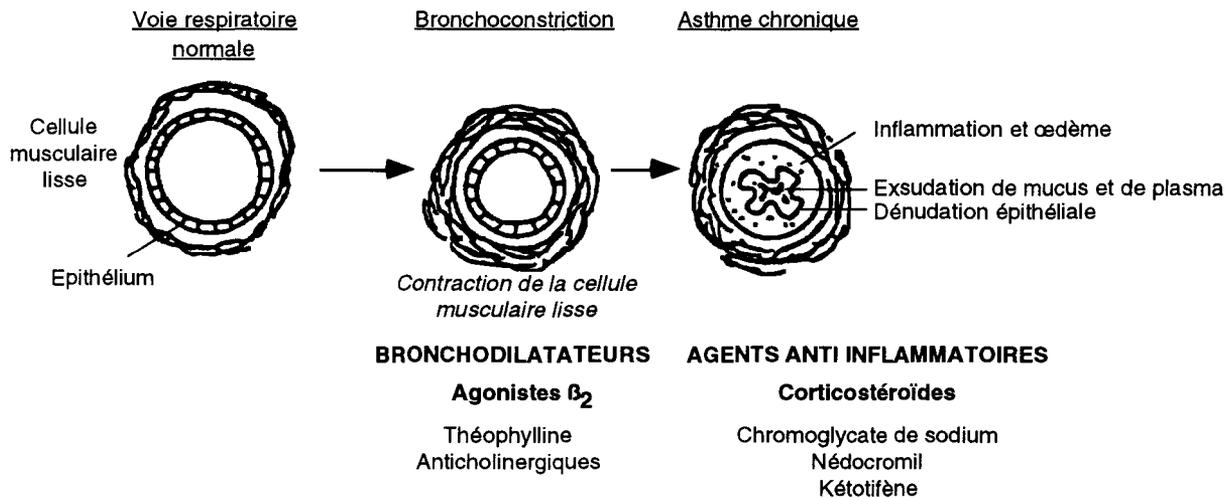


Figure 49 : Priorités de traitement sur le terrain (Barnes, 1992).

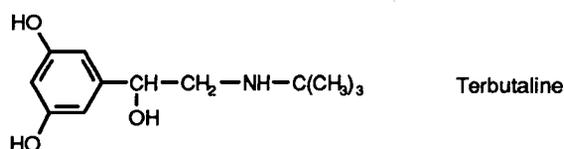
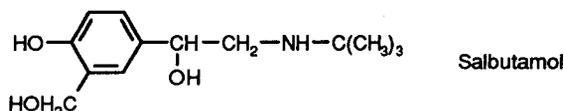
III -1-1-1- Bronchodilatateurs.

- *Agonistes des récepteurs β_2 adrénergiques.*

Les agonistes β_2 (figure 50) sont les bronchodilatateurs les plus efficaces dans le contrôle d'un spasme bronchique. Ils agissent sur les cellules musculaires lisses des voies respiratoires. Ces médicaments sont efficaces dans la prévention de la réponse asthmatique immédiate après stimulation par un allergène. Leur liaison aux récepteurs β_2 adrénergiques entraîne une augmentation du taux d'AMP cyclique conduisant à la diminution du taux de calcium intracellulaire, puis à la relaxation du muscle lisse bronchique. Il semblerait également qu'un taux élevé d'AMP cyclique inhibe la libération de médiateurs par les mastocytes. Par contre, de tels médicaments qui n'agissent pas sur la composante inflammatoire de l'asthme, sont inactifs dans le cas d'une réponse asthmatique tardive, ce qui constitue une limitation à leur utilisation. De plus, l'usage régulier et prolongé d'agonistes β_2 adrénergiques est associé à une détérioration des fonctions pulmonaires et, par conséquent, à une augmentation de la morbidité et de la mortalité dues à l'asthme. Un médicament idéal serait un agoniste β_2 adrénergique ayant des propriétés anti-inflammatoires (Szelenyi, Bölsckei, 1989 ; Goldie et coll., 1991 ; Ford-

Hutchinson et coll., 1992).

Agonistes β_2 adrénergiques à courte durée d'action :



Agoniste β_2 adrénergique à durée d'action plus longue (12 h):

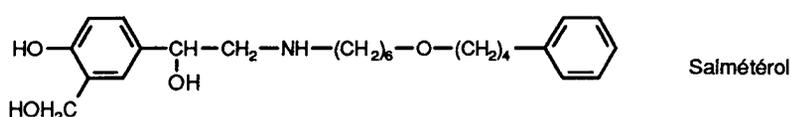


Figure 50 : Exemples d'agonistes des récepteurs β_2 adrénergiques.

• *Xanthines.*

La théophylline (figure 51) et ses dérivés ont largement été étudiés *in vitro* et *in vivo*. Leur effet pharmacologique est la relaxation de la musculature lisse mais cet effet bronchodilatateur est moins marqué que celui des agonistes β_2 adrénergiques. Leur mécanisme d'action est lié à l'accumulation d'AMP cyclique à l'intérieur des cellules musculaires lisses bronchiques. Cet effet interviendrait en partie par le biais de l'inhibition de la phosphodiesterase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'AMP cyclique. D'autres mécanismes ont été envisagés : la redistribution du calcium intracellulaire, l'inhibition de la libération par les mastocytes de médiateurs du bronchospasme. Il est vraisemblable que l'action bronchodilatatrice de ces médicaments résulte de la conjugaison de plusieurs des mécanismes mentionnés (Savoy, Junod, 1989).

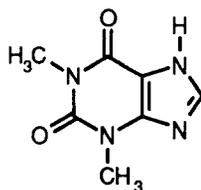


Figure 51 : Théophylline.

• *Anticholinergiques.*

Le bromure d'ipratropium, donné en aérosol, est l'un des anticholinergiques utilisés actuellement. Il est prescrit en association avec les autres bronchodilatateurs et agit par inhibition du bronchospasme vagal médié par l'acétylcholine.

Les anticholinergiques bloquent les récepteurs muscariniques des cellules musculaires

lisses des voies respiratoires et inhibent ainsi la bronchoconstriction réflexe de la voie cholinergique. Ces médicaments sont moins efficaces que les agonistes β_2 adrénergiques (Barnes, 1992).

III -1-1-2- Agents anti-inflammatoires.

- *Corticostéroïdes* (figure 52).

D'abord donnés par inhalation puis par voie orale, ils constituent une classe d'agents antiasthmatiques très efficaces et largement utilisés malgré leurs effets secondaires.

Les corticostéroïdes induisent la synthèse de lipocortine qui bloque la synthèse de PLA₂ et inhibent ainsi la libération d'acide arachidonique, précurseur des leucotriènes et des prostaglandines (Smith et coll., 1991). Ils ont également la faculté d'inhiber la transcription de gènes et les processus post-transcriptionnels de cytokines (comme l'IL-1, l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF) dans les macrophages, les lymphocytes et les autres cellules inflammatoires.

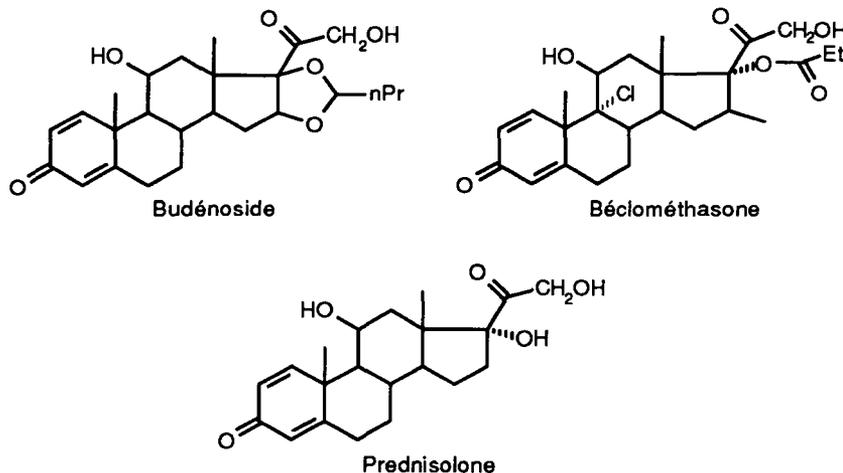


Figure 52 : Exemples de corticostéroïdes.

- *Cromoglycate de sodium et Nédocromil* (figure 53).

Ces deux molécules inhibent la dégranulation des mastocytes menant à la libération de médiateurs de l'inflammation, mais elles semblent également agir sur les nombreuses cellules de l'inflammation (macrophages, éosinophiles, lymphocytes T) ainsi que sur les cellules nerveuses des voies respiratoires. Bien que ces deux médicaments aient le même profil d'activité, le nédocromil paraît plus efficace pour stabiliser les mastocytes des muqueuses des voies respiratoires. Leur mode d'action n'étant pas connu, différentes hypothèses ont été émises : effet sur les échanges transmembranaires de calcium ou action antagoniste sur les tachykinines (Nsouli et coll., 1988 b ; Savoy, Junod, 1989).

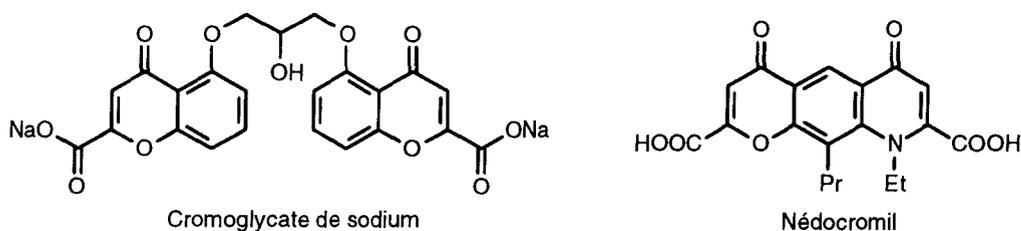


Figure 53.

- *Kétotifène.*

Bien que les antihistaminiques n'aient pas d'effet bénéfique dans le traitement de l'asthme, le kétotifène (figure 54) garde une indication en raison de sa faculté supplémentaire à inhiber la libération de médiateurs par les différentes cellules inflammatoires. Ce médicament inhibe l'entrée de calcium au niveau du mastocyte isolé et est capable d'inhiber la contraction du muscle lisse bronchique provoquée par la dépolarisation de la membrane, phénomène également dépendant du calcium. Il est utilisé dans des cas d'asthme léger (Savoy, Junod, 1989 ; Nsouli et coll., 1988 b).

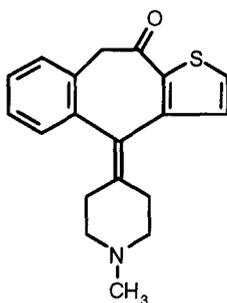


Figure 54 : Kétotifène.

III -1-2- Principaux axes de recherche.

La pathologie de l'asthme est très complexe, impliquant nombre de cellules, de médiateurs, d'enzymes et de neurotransmetteurs qui interagissent entre eux, sans que l'un ou l'autre ne semble avoir de rôle prédominant. Afin de mieux connaître les mécanismes de cette pathologie et de procurer une meilleure qualité de vie aux patients, les nouvelles stratégies thérapeutiques développées dans le cadre de l'asthme se focalisent chacune sur un médiateur précis des processus biologiques. Voici quelques exemples des axes de recherche actuels.

III -1-2-1- Inhibition de la libération de médiateurs de l'inflammation.

Les différentes cellules impliquées dans l'asthme, une fois activées, peuvent libérer des médiateurs de l'inflammation qui contribuent à l'aggravation de la maladie. Différentes classes de molécules ont été envisagées dans le but d'inhiber ces processus.

- *Inhibiteurs de phosphodiésterases.*

Les phosphodiésterases sont des enzymes intracellulaires qui clivent l'AMP cyclique. Une

diminution du taux d'AMP cyclique provoque la contraction des cellules musculaires lisses et l'activation des cellules inflammatoires, d'où la libération des médiateurs.

Les inhibiteurs de phosphodiésterases, notamment les inhibiteurs sélectifs de l'isoforme IV tels que le Rolipram et le Ro 20-1724, sont intéressants dans la mesure où ils augmentent le taux intracellulaire d'AMP cyclique, et induisent ainsi la relaxation des cellules musculaires lisses des voies respiratoires. De plus, différentes études ont montré que l'élévation du taux d'AMP cyclique dans les cellules inflammatoires atténue leur activation et donc la libération de médiateurs. Il reste à évaluer les effets de ces composés chez l'homme pour déterminer leur potentiel réel (David Nicholson, Shahid, 1992 ; Christensen, Torphy, 1994).

• *Inhibiteurs de la 5-LO.*

Les peptidoleucotriènes, métabolites de l'acide arachidonique par la voie de la 5-LO, sont des agents bronchoconstricteurs puissants et ont un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires. Inhiber leur biosynthèse constitue une nouvelle opportunité pour le traitement de l'asthme. Les inhibiteurs de la 5-LO, première enzyme impliquée dans la métabolisation de l'acide arachidonique, ont donc été envisagés mais nous en reparlerons par la suite. Le Zileuton (figure 55) est un inhibiteur de la 5-LO actuellement en phase clinique III (Ford-Hutchinson et coll., 1994 ; Brooks et coll., 1993 a).

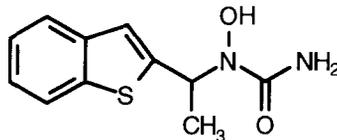


Figure 55 : Zileuton.

III -1-2-2- Antagonistes de médiateurs de l'inflammation.

Le développement d'antagonistes spécifiques de l'un ou l'autre des médiateurs constitue une stratégie de choix pour évaluer le rôle du ligand naturel dans l'évolution de la maladie.

• *Antagonistes des peptidoleucotriènes.*

De telles molécules sont développées depuis quelques années et se sont révélées efficaces notamment sur la phase précoce de la crise asthmatique (SK&F 104,353 ; MK 571 ; ICI 204,219) (figure 56). Leur activité bronchodilatatrice a également été démontrée dans des cas d'asthme sévère (Kuitert, Barnes, 1992). Il est maintenant nécessaire de développer des antagonistes spécifiques à l'aide desquels on pourrait déterminer la structure des récepteurs mais aussi accéder à de nouvelles molécules médicamenteuses plus efficaces.

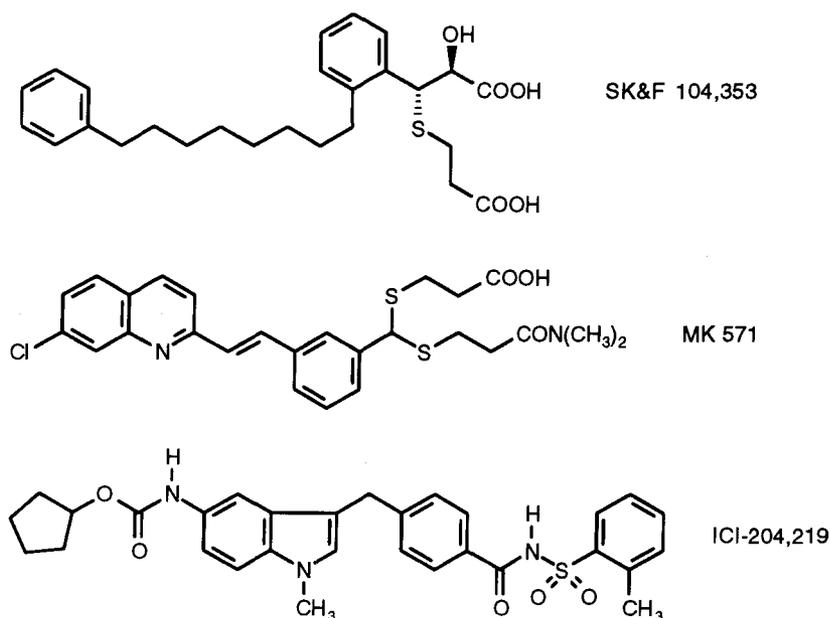


Figure 56.

• *Antagonistes du PAF.*

Les antagonistes du PAF ont été étudiés dans différents modèles animaux avec des résultats encourageants. Ils inhibent l'agrégation des plaquettes induite par le PAF, mais aussi l'activation des éosinophiles, la bronchoconstriction, l'hyperréactivité bronchique et la formation d'un œdème. L'évaluation de leur potentiel thérapeutique chez l'homme en est aux premiers stades.

III -1-2-3- Immunothérapie.

Des progrès récents en biologie moléculaire et dans le domaine de l'immunothérapie ont permis d'identifier les mécanismes cellulaires qui contrôlent la biosynthèse d'IgE en réponse à un allergène. On pense que les lymphocytes T de type Th-2, qui produisent l'IL-4 et l'IL-5, sont les cellules clefs dans l'initiation de la production d'IgE. Une telle théorie a une application thérapeutique : des inhibiteurs de la biosynthèse de l'IL-4 et / ou de l'IL-5 ou des antagonistes de ces cytokines pourraient réduire le taux d'IgE résultant de l'exposition à un allergène, et donc diminuer l'inflammation bronchique chez les asthmatiques.

L'IPD-1151T (figure 57) inhibe la production d'IL-4 induite par un allergène au niveau des lymphocytes T "helper". Une étude clinique (phase III) a montré que les niveaux d'IgE étaient réduits très sensiblement par cette molécule (Duplantier, Cheng, 1994).

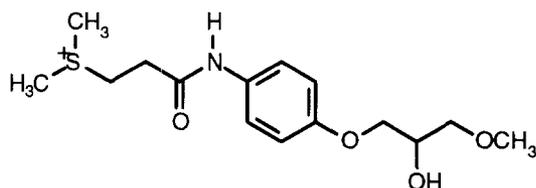


Figure 57 : IPD-1151T.

III -1-2-4- Action sur les neuromodulateurs.

Différentes fibres nerveuses sont également impliquées dans la réponse asthmatique : la voie cholinergique, la voie adrénargique et le système NANC. Ce dernier implique différents neuropeptides :

- Le VIP inhibe le système NANC (et induit une relaxation du muscle lisse bronchique).
- La substance P (SP) et la neurokinine A (NKA) activent ce système, d'où une bronchoconstriction.

On peut donc penser que des agonistes du VIP ou des antagonistes de la SP et de la NKA ont une application dans le traitement de la maladie asthmatique.

Deux volets de la pathologie de l'asthme ont retenu notre attention. Nous nous sommes intéressée d'une part aux processus tardifs de l'asthme où intervient la prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires (ce domaine a très peu été exploré dans le cadre d'une stratégie antiasthmatique). D'autre part, dans l'optique d'éliminer une composante de l'inflammation bronchique, nous avons développé des inhibiteurs potentiels de la 5-LO / antagonistes de peptidoleucotriènes. Ces deux approches constituent également deux moyens de lutte contre la contraction du muscle lisse bronchique.

III -2- Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques.

L'inflammation chronique observée au cours de la réponse asthmatique conduit, selon des mécanismes que nous avons relatés dans un paragraphe précédent, à une hyperplasie du muscle lisse bronchique. Cette prolifération cellulaire est due principalement aux systèmes de transduction induits par les protéines tyrosine-kinase et par les protéines kinases C.

Les facteurs de croissance impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires (PDGF, TGF α , EGF) se lient à des récepteurs à activité PTK (Protéine-Tyrosine Kinase), comme dans le cas de l'athérosclérose et de la resténose. Ayant à notre disposition des molécules développées dans le cadre de ces maladies cardiovasculaires conçues comme des inhibiteurs de PTK, il nous a paru intéressant de les tester dans l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses des voies respiratoires.

Nous avons d'autre part comparé les structures de ces molécules à celle du PD 153035, inhibiteur spécifique de l'activité PTK du récepteur EGF. Nous avons remarqué que leurs squelettes étaient en partie superposables et nous avons proposé un autre composé inhibiteur potentiel de la prolifération des cellules musculaires des voies respiratoires dans lequel on a adjoint deux groupements méthoxy vicinaux au noyau benzénique (figure 58).

Cette structure éther de cathécol est d'autre part caractéristique d'une classe d'inhibiteurs des phosphodiesterases, dont la molécule Ro 20-1724 est un représentant, qui induisent la relaxation

des cellules musculaires lisses des voies respiratoires (Christensen, Torphy, 1994). Ainsi, notre molécule est susceptible de posséder deux activités de grande utilité dans le traitement de l'asthme : ce pourrait être un inhibiteur à la fois de la prolifération des cellules musculaires lisses (via l'inhibition de l'activité PTK) et un inhibiteur de la bronchoconstriction (en allant se lier aux récepteurs des phosphodiésterases).

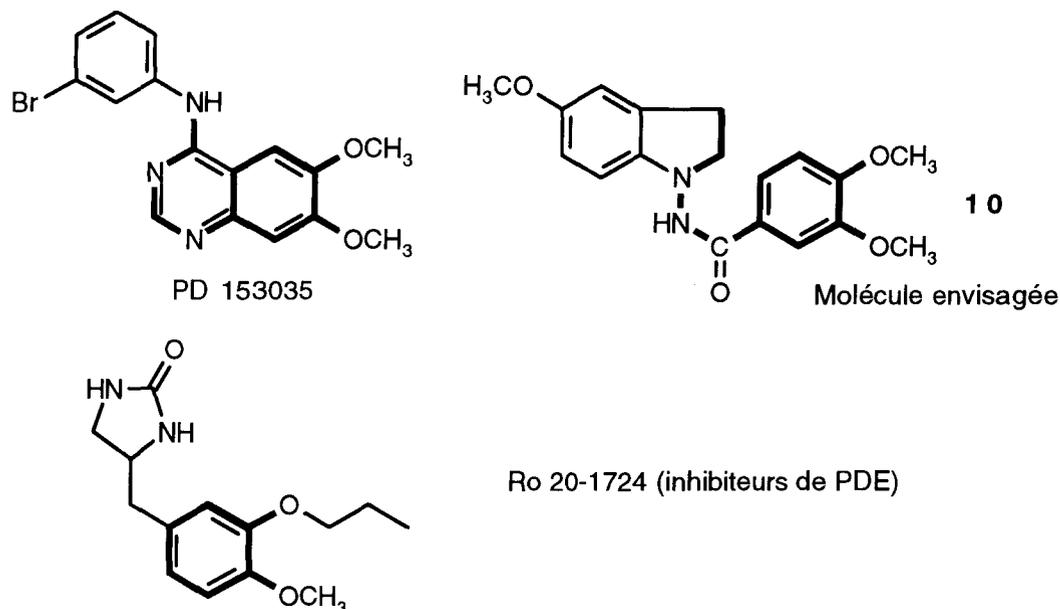


Figure 58.

III -3- Inhibiteurs de la 5-LO et antagonistes du LTD₄.

Les leucotriènes, métabolites de l'acide arachidonique par la voie de la 5-LO, constituent une cible intéressante de l'asthme. Synthétisés et libérés par les cellules inflammatoires, ils ont une activité potentielle au niveau de chaque symptôme caractéristique de l'asthme, à savoir le spasme musculaire (les peptidoleucotriènes sont de puissants bronchoconstricteurs), l'œdème de la muqueuse (les peptidoleucotriènes induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire), l'hypersécrétion bronchique (augmentée par les peptidoleucotriènes) et le recrutement de cellules inflammatoires (le LTB₄ est chimiotactique notamment pour les éosinophiles). Ils participent donc activement aux processus responsables de l'obstruction progressive des voies respiratoires. Bloquer la formation des leucotriènes, particulièrement des peptidoleucotriènes, ou inhiber leur activité constitue une nouvelle voie de recherche d'antiasthmatiques.

III -3-1- Biosynthèse des leucotriènes.

Le point de départ de la formation des leucotriènes est l'acide arachidonique. Ce dernier est généré à partir des phospholipides membranaires sous l'action de la PLA₂ (Phospholipase A₂) en réponse à des signaux biologiques variés tels que l'activation des mastocytes via leurs récepteurs IgE-

dépendants. L'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie des cyclooxygénases (prostaglandines, thromboxane, prostacycline) ou par la voie des lipoxygénases (biosynthèse des leucotriènes) à laquelle nous nous sommes intéressée.

La 5-LO est l'enzyme clef de la formation de ces leucotriènes (figure 59). C'est une protéine cytosolique et sa translocation vers la membrane cellulaire est stimulée par les leucocytes. Une fois dans la membrane, la 5-LO est activée par la FLAP (5-Lipoxygénase Activating Protein), protéine membranaire de 18 kD. La présence simultanée de la 5-LO et de la FLAP sont requises pour catalyser l'oxygénation en position C₅ de l'acide arachidonique conduisant à la formation du 5-HPETE. Ce système enzymatique convertit aussi le 5-HPETE en LTA₄ qui peut être métabolisé en LTB₄ ou en LTC₄.

La biosynthèse du LTB₄ est catalysée par la LTA₄ hydroxylase, protéine cytosolique. le LTB₄ est inactivé par ω -oxydation à l'intérieur de la cellule.

D'autre part, le LTA₄ peut être métabolisé par la LTC₄ synthase ou glutathion S-transférase et génère ainsi le LTC₄. La coupure de l'acide glutamique par la γ -glutamyl transpeptidase conduit au LTD₄ qui est lui même transformé en LTE₄ sous l'action de la γ -glutamyl dipeptidase responsable du départ de la glycine (Kuitert, Barnes, 1992 ; Bjornsdottir, Bush, 1993).

Différentes approches thérapeutiques peuvent être envisagées pour inhiber l'activité des peptidoleucotriènes. Une des stratégies est l'inhibition des enzymes critiques de la biosynthèse des leucotriènes, et l'enzyme de choix est la 5-LO impliquée à deux niveaux de cette cascade ; nous nous sommes surtout intéressée à cette stratégie. Les antagonistes des récepteurs des peptidoleucotriènes constituent une autre approche possible.

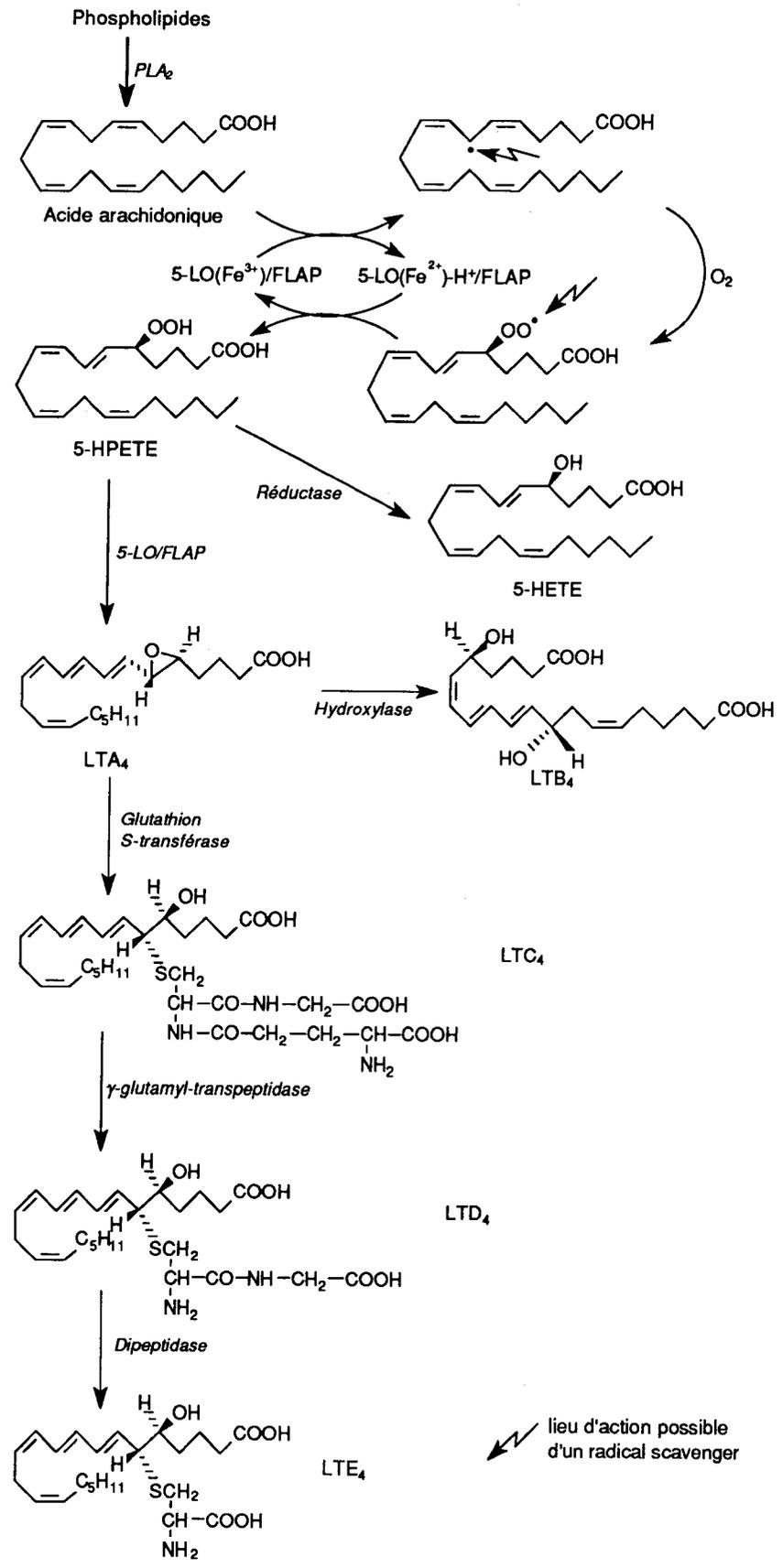


Figure 59 : Biosynthèse des leucotriènes.

III -3-2- Inhibition de la 5-LO.

III -3-2-1- Généralités sur la 5-LO.

La 5-LO humaine est une protéine de 78 kD, de 674 acides aminés, qui présente 93 % d'homologie avec le 5-LO du rat. Elle possède un atome de fer non hémique et on admet que au repos, elle est sous sa forme inactive Fe^{2+} . Il faut remarquer que les 5-, 12- et 15-lipoxygénases présentent des homologies dans le domaine supposé de liaison au fer : cinq histidines, considérées comme cruciales pour cette liaison, sont conservées, dont deux en positions 367 et 372. De plus, la 5-LO possède une séquence homologue à celle des lipases, ce qui suggère une association périphérique de la 5-LO avec la membrane plasmique (McMillan, Walker, 1992).

III -3-2-2- Mode d'action (figure 60).

La 5-LO se situe normalement dans le cytosol à l'état ferreux (Fe^{2+}) inactif. Par activation par des traces d'hydroperoxydes, présents dans la cellule ou formé à partir des lipides, la 5-LO inactive est convertie en sa forme ferrique active (Fe^{3+}). Cette forme subit une translocation vers la membrane de la cellule ; ce mécanisme est activé par exemple par l'ATP, Ca^{2+} et la phosphatidylcholine. Une fois dans la membrane, la 5-LO s'associe à la FLAP présente dans la membrane des leucocytes et ne présentant pas d'homologie avec d'autres protéines connues. Une fois liée à la membrane, la 5-LO agit sur son substrat, l'acide arachidonique, qui est oxydé selon un processus stéréosélectif et radicalaire. On admet que la 5-LO agit comme activateur de l'acide arachidonique par interaction avec l'ion Fe^{3+} . Le mécanisme radicalaire implique un départ stéréospécifique d'hydrogène ainsi qu'une addition stéréospécifique d'oxygène moléculaire. La forme Fe^{3+} oxyde spécifiquement le système 5,8-diène pour générer un radical pentadiényle et un proton, avec réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Le radical, situé dans le site actif de l'enzyme, réagit avec O_2 pour générer le radical 5 (S)-hydroperoxy. Cela implique un transfert d'électron et une protonation pour régénérer la forme Fe^{3+} et former le 5-HPETE. Le système enzymatique 5-LO / FLAP catalyse ensuite la déshydratation du 5-HPETE en LTA_4 (Musser, Kreft, 1992).

La cinétique de la 5-LO est complexe. On observe dans un premier temps une phase de latence durant laquelle la génération de métabolites de l'acide arachidonique augmente lentement, puis une phase stationnaire. La phase irréversible d'inactivation de l'enzyme est probablement due à une dégradation induite par des radicaux libres (McMillan, Walker, 1992).

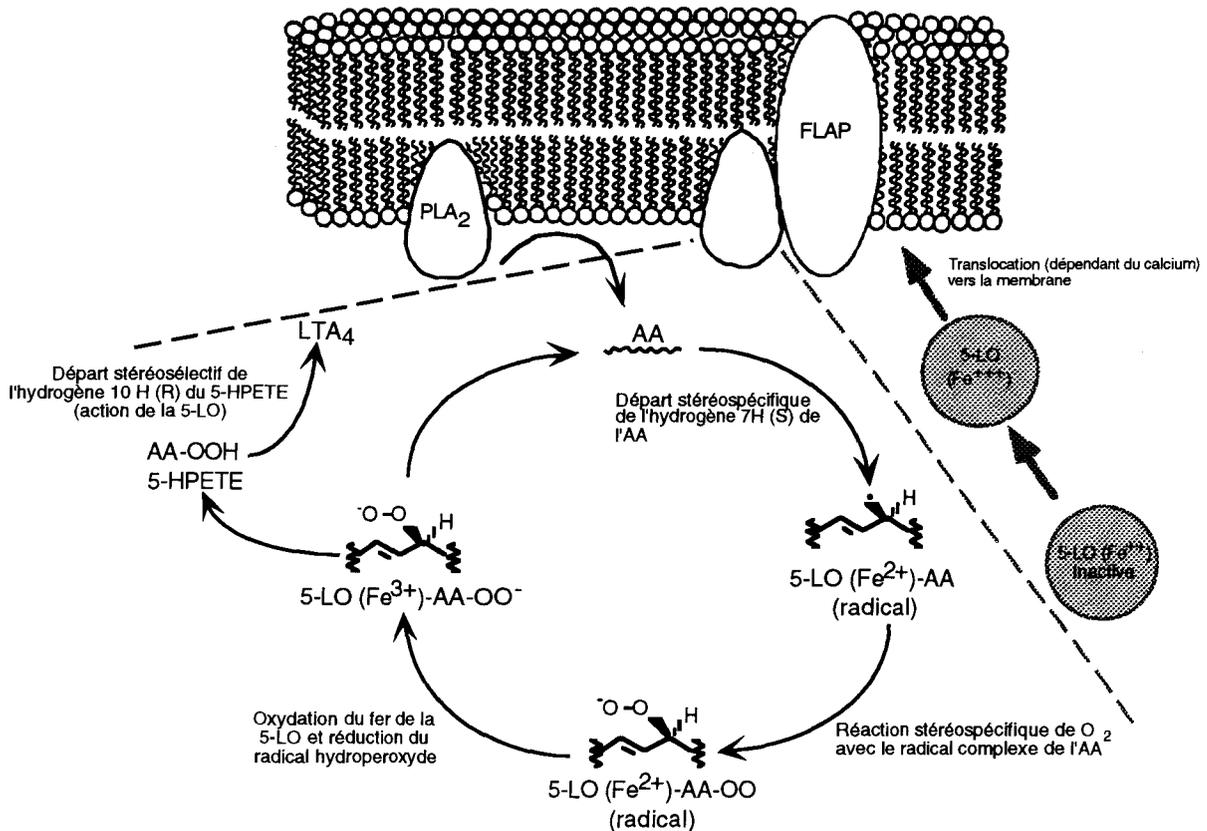


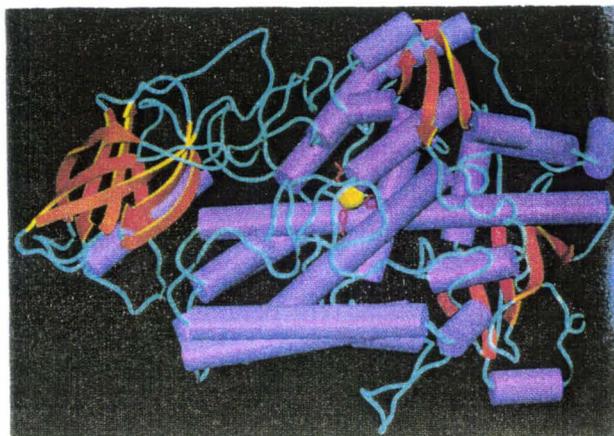
Figure 60 : Mécanisme d'action supposé de la 5-LO avec l'acide arachidonique (AA) (Musser, Kreft, 1992).

III -3-2-3- Inhibiteurs de la 5-LO.

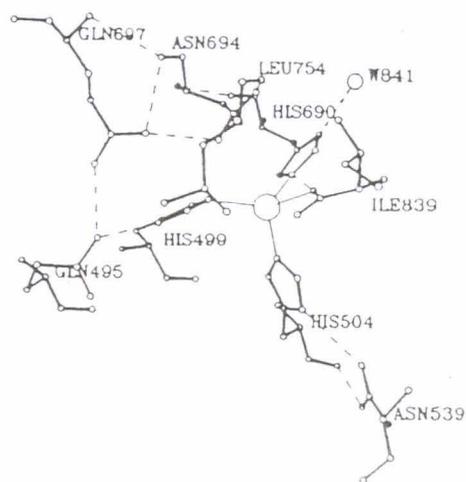
La structure tridimensionnelle des 5-LO n'est pas connue. Par contre, celle de la 15-LO de soja, qui présente des homologues avec les 5-LO dans le domaine de liaison au fer, a été déterminée (figure 61a). Les résidus histidine en position 499, 504 et 690 ainsi que le groupement carboxylique du résidu Ile en position 839 sont directement coordonnés au fer (figure 61b). Cette lipoxygénase possède deux cavités (figure 61c) : la cavité I n'existe que dans le cas des lipoxygénases végétales ; la cavité II comprend le site de liaison de l'acide arachidonique à l'enzyme (Boyington et coll., 1993).

Des études de mutagenèse dirigée sur la 5-LO humaine ont montré que le remplacement des histidines 367, 372 ou 551 par une glycine conduit à des mutants complètement inactifs ; ces trois histidines sont donc indispensables à l'activité de la 5-LO et semblent être impliquées dans la chélation du fer. Par contre, le remplacement des histidines 362, 390 ou 399 mène à des mutants ayant une activité enzymatique réduite (Yi Zhang et coll., 1992).

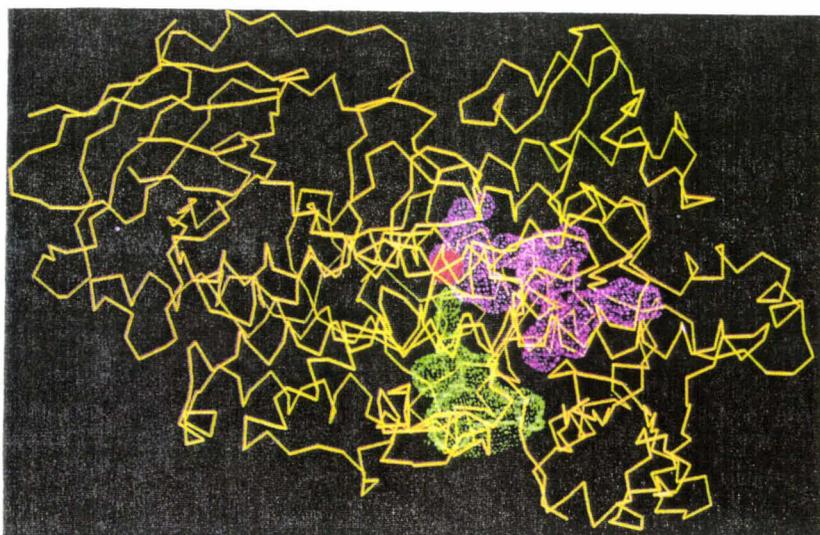
Bien que la structure tridimensionnelle de la 5-LO n'ait pas encore été déterminée, les différentes études réalisées pour concevoir des inhibiteurs de cette enzyme montrent que son site actif possède quatre domaines différents : une région lipophile qui interagit avec la chaîne grasse insaturée de l'acide arachidonique, un domaine accepteur de proton, un atome de fer qui interagit de façon spécifique avec le carbone C₅ insaturé du substrat et un site de liaison pour le groupement carboxylique de l'acide arachidonique (Brooks et coll., 1993 b).



a) Diagramme schématique de la structure tridimensionnelle de la 15-LO (les hélices α sont représentées par des cylindres violets, les feuillets β par des flèches orange et le fer par une sphère jaune. Seulement trois des quatre ligands du fer (en rouge) sont représentés).



b) Le fer dans la 15-LO : Les résidus histidine 499, 504 et 839 ainsi que le groupement carboxylique de l'Ile 839 sont directement coordonnés au fer.



c) Localisation du fer (sphère orange) et des cavités I (en vert) et II (en violet) de la 15-LO.

Figure 61 : Structure tridimensionnelle de la 15-LO de soja (Boyington et coll., 1993).

Au regard de ces différentes caractéristiques du site actif de la 5-LO et de son mécanisme d'action, les inhibiteurs de la 5-LO peuvent agir selon quatre mécanismes différents :

- *Antioxydants.*

La 5-LO peut être inhibée par des composés à faible potentiel oxydo-réducteur. Les prototypes de cette classe d'inhibiteurs sont la phénidone et le BW 755C (figure 62). Ces composés agissent à différents stades du mécanisme de la 5-LO : ils peuvent réduire l'ion ferrique de la forme active de l'enzyme en ion ferreux pour régénérer la forme inactive ; ils sont également susceptibles de réduire l'un des intermédiaires radicalaires, ce qui mène également à la forme ferreuse inactive de la 5-LO (figure 59).

De tels inhibiteurs possèdent plusieurs inconvénients. Ils ont en général une faible sélectivité pour la 5-LO par rapport à la cyclooxygénase et sont donc capables d'inhiber les deux voies métaboliques de l'acide arachidonique. De plus, bien qu'ils aient une activité *in vitro*, ils se sont souvent révélés inactifs *in vivo* quand ils sont administrés par voie orale. L'activité de ces composés augmente avec leur lipophilie (McMillan, Walker, 1992 ; Ford-Hutchinson, et coll., 1994).

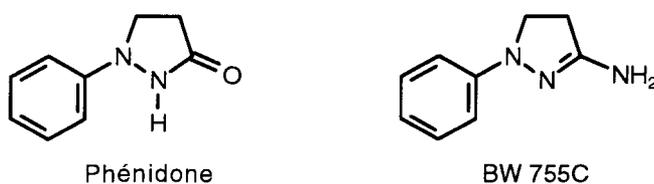


Figure 62.

- *Chélateurs du fer.*

L'acide hydroxamique étant un ligand puissant des ions métalliques, de nombreuses molécules contenant cette entité ont été développées comme inhibiteurs potentiels de la 5-LO. Le premier hydroxamate à avoir été décrit est l'analogue de l'acide arachidonique (synthétisé par Corey). De nombreux autres hydroxamates de type A ont été synthétisés et le plus actif *in vitro* est le A-61442 (figure 63). Cependant, comme pour tous les autres composés de type A, son activité *in vivo* est très faible. Cela semble être dû à une demi-vie courte et à une métabolisation rapide en acide carboxylique inactif correspondant.

Par opposition aux composés de type A, les groupes Abbott et Wellcome ont développé des dérivés de l'acide hydroxamique de type B ou "rétro" dans lesquels les groupements CO et N-OH ont été inversés. De telles molécules ne subissent pas la même métabolisation que leurs analogues de type A ; leur demi-vie est plus longue et elles inhibent la 5-LO *in vivo*.

Le BW A4C est environ vingt fois plus sélectif pour la 5-LO que pour la cyclooxygénase. Un inhibiteur sélectif de la 5-LO est le Zileuton qui est actuellement en phase clinique III (McMillan, Walker, 1992 ; Brooks et coll., 1993 a ; Ford-Hutchinson et coll., 1994).

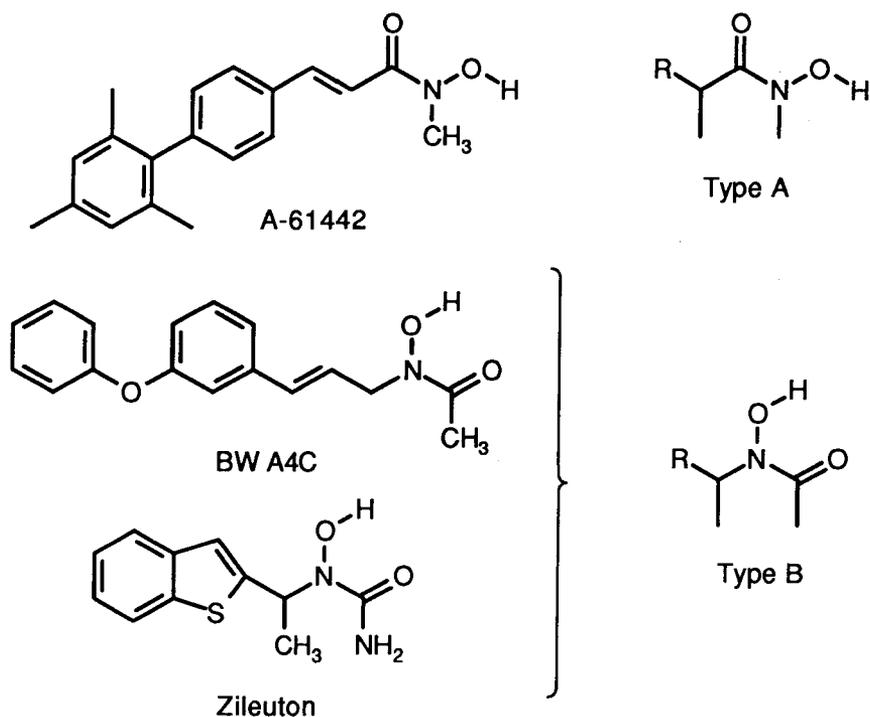


Figure 63.

• *Inhibiteurs de la translocation de la 5-LO vers la membrane cellulaire.*

Une autre méthode d'inhibition de la 5-LO est d'empêcher sa translocation vers la membrane de la cellule ainsi que sa liaison à la protéine FLAP. Des inhibiteurs de la protéine FLAP ont donc été développés.

La protéine FLAP a été découverte grâce au MK-886, inhibiteur de la biosynthèse des leucotriènes ne se liant pas directement à la 5-LO mais affectant son activation. Le MK-886, de structure indolique, se lie spécifiquement et avec une très haute affinité à la FLAP (figure 64) (Ford-Hutchinson, 1991).

D'autres structures chimiques, comme les quinoléines - dont le Bay-X-1005 - ont ensuite été identifiées comme étant des inhibiteurs de la translocation de la 5-LO via leur liaison à la FLAP.

Des structure hybrides, les "quindoles" ont ensuite été développées dont le MK-591.

Le MK-886, le Bay-X-1005 et le MK-591 sont tous actuellement en développement clinique.

• *Les faux substrats.*

Il existe enfin des composés qui se lient à la 5-LO et inhibent cette enzyme sans affecter les mécanismes oxydo-réducteur et radicalaire. C'est par exemple le cas du D-2138 (figure 65), inhibiteur spécifique de la 5-LO. La comparaison de la structure de cette molécule et de celle de la Jucticine C, inhibiteur modéré de la 5-LO, a conduit au design de molécules hybrides, comme le L-697198, composé actif par voie orale et qui a une meilleure biodisponibilité (Ford-Hutchinson et coll., 1994).

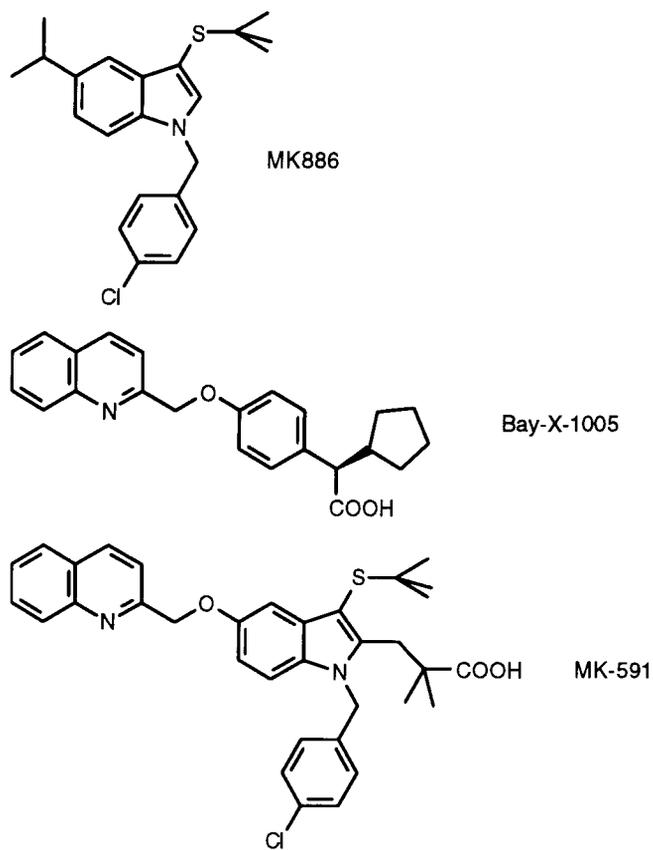


Figure 64.

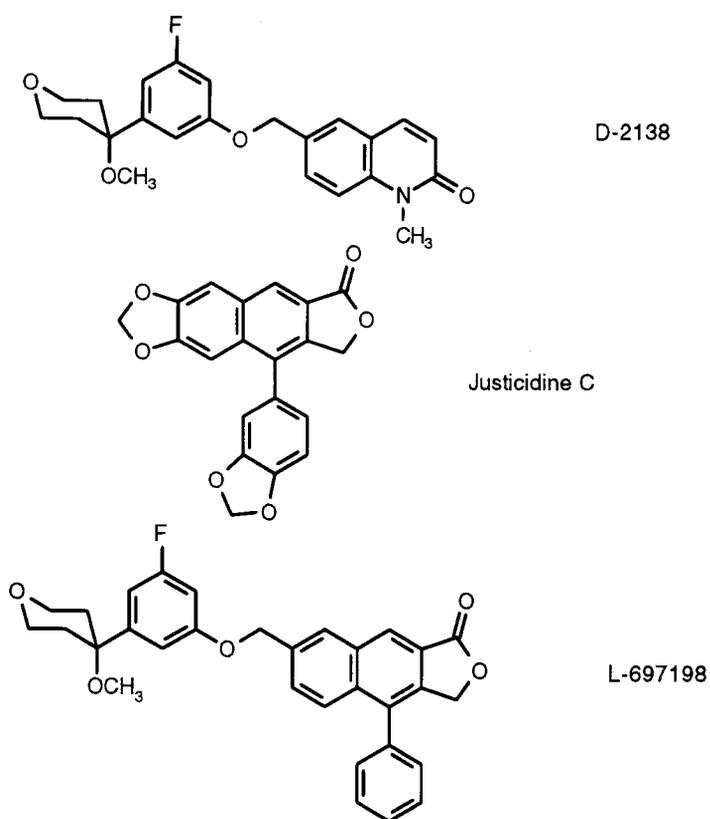


Figure 65.

Il est possible que deux inhibiteurs de l'enzyme agissant selon des mécanismes différents aient, lorsqu'ils sont co-administrés, des effets synergiques et soient ainsi complémentaires l'un de l'autre. Un composé possédant la faculté d'inhiber deux mécanismes de l'activation de la 5-LO devrait être très actif.

III -3-2-4- Conception d'inhibiteurs potentiels de la 5-LO.

Nos molécules possèdent une analogie de structure avec la phénidone, antioxydant inhibiteur de la 5-LO. En utilisant la théorie des cycles potentiels, on pouvait imaginer que les composés comportant un groupement benzoyle aient une activité inhibitrice de la 5-LO (figure 66). De plus, ces composés, conçus comme des capteurs de radicaux libres et actifs dans l'inhibition de l'oxydation des LDL, sont capables de bloquer la forme radicalaire de la 5-LO (figure 59).

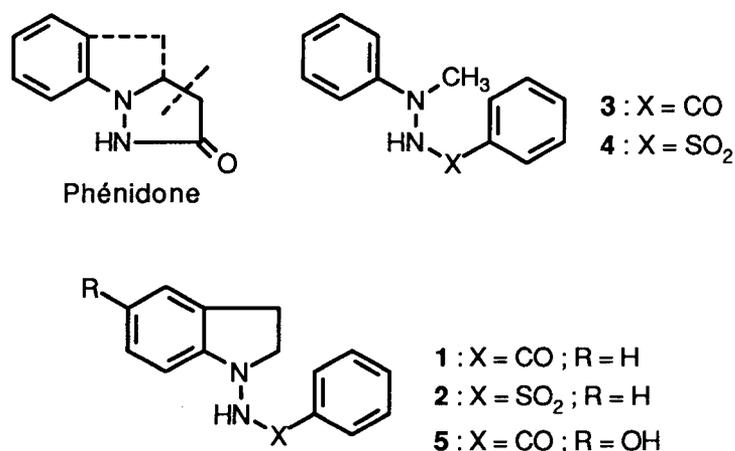


Figure 66.

Nous avons de plus envisagé des composés dans lesquels le groupement C₆H₅ est remplacé par un groupement CH₃ afin de se rapprocher encore plus de la structure de la phénidone (figure 67).

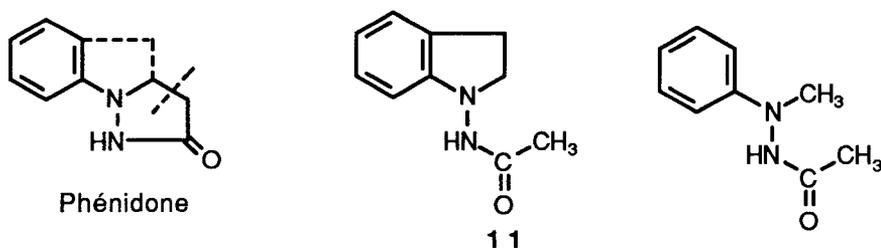


Figure 67.

Afin de déterminer si la présence en position 5 de l'indoline d'un groupement tel que OH, pouvant former une liaison hydrogène avec l'enzyme, a une quelconque importance, nous avons envisagé de remplacer cette fonction par un groupement méthoxy (figure 68).

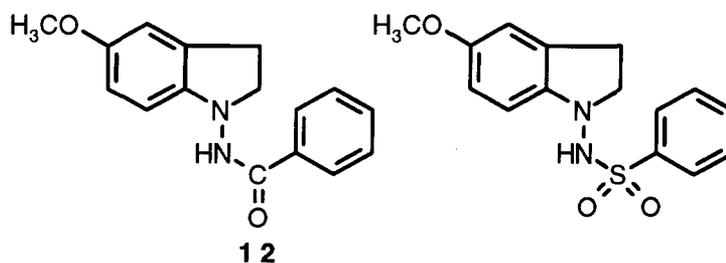


Figure 68.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le site actif de la 5-LO possède un site de liaison pour la fonction carboxylique de l'acide arachidonique. Nous avons dans cette optique imaginé des molécules ayant d'une part un caractère antioxydant et, d'autre part, une analogie de structure avec l'acide arachidonique afin d'obtenir un faux substrat de l'enzyme. Ayant obtenu de meilleurs résultats biologiques pour les composés indoliniques possédant un groupement benzoyle, nous avons décidé de réaliser ces modifications sur le composé **1**. Nous avons pour cela ajouté au noyau benzénique de cette molécule une chaîne insaturée portant une fonction acide (figure 69). La molécule ainsi obtenue comporte, comme l'acide arachidonique, un groupement carboxylique et quatre insaturations dans un espace limité.

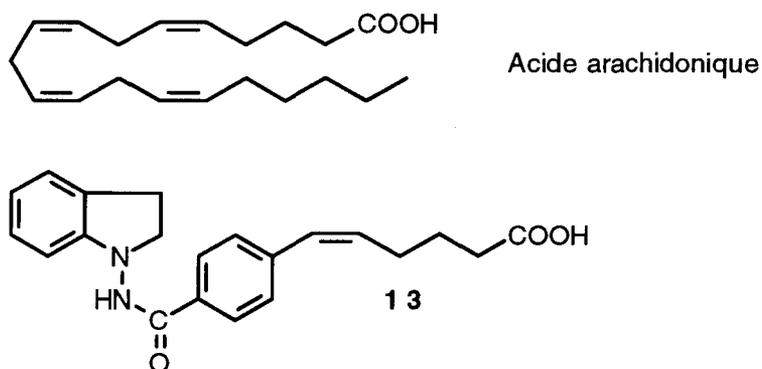


Figure 69.

Etant donné que les acides hydroxamiques sont des chélateurs puissants des ions métalliques, le remplacement du groupement carboxylique par un groupement hydroxamique (figure 70) pourrait nous conduire à des dérivés antioxydants se liant de surcroît à l'atome de fer non hémique de la 5-LO : ils pourraient donc inhiber la 5-LO selon deux mécanismes différents. La synthèse d'un hydroxamate de type A étant accessible à partir de l'acide carboxylique correspondant, nous avons sélectionné la molécule **14**.

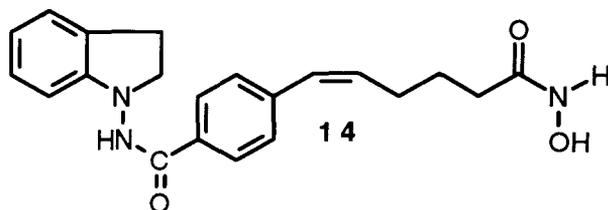


Figure 70.

Enfin, à partir du moment où nous possédons l'acide **13**, nous avons l'opportunité de synthétiser facilement des amides et d'accéder ainsi à des inhibiteurs potentiels du LTD₄ possédant, comme ceux qui ont été développés par le groupe Pfizer (Kadin, 1982), une fonction N-décylamide (figure 71).

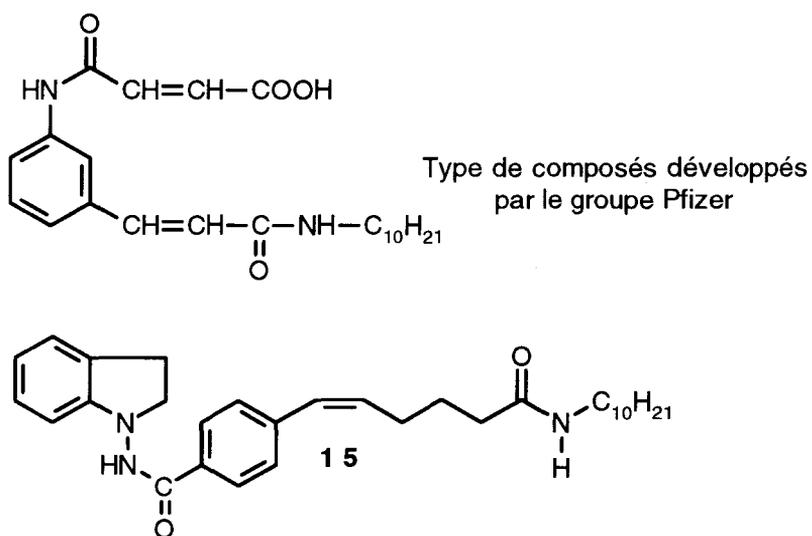


Figure 71.

STRATEGIE DE SYNTHESE

Les différents composés sélectionnés sont récapitulés dans le tableau 5. Nous allons dans cette partie envisager leur synthèse en tenant compte des différents squelettes (composés ouverts ou fermés) et des différents substituants.

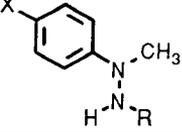
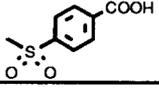
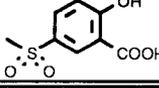
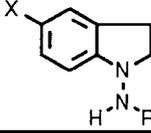
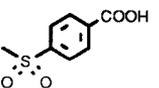
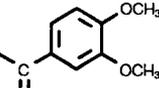
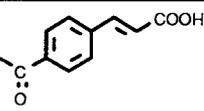
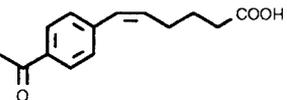
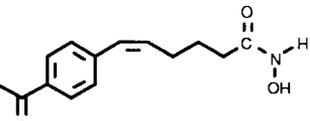
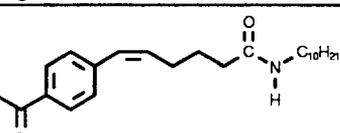
Produits ouverts		
		
n°	X	R
3	H	COPh
4	H	SO ₂ Ph
6	H	
8	NO ₂	
Produits fermés		
		
n°	X	R
2	H	SO ₂ Ph
7	H	
1	H	COPh
11	H	COCH ₃
5	OH	COPh
12	OCH ₃	COPh
10	OCH ₃	
9	H	
13	H	
14	H	
15	H	

Tableau 5.

I - Synthèse des composés ouverts.

I-1- Synthèse de la benzoylhydrazine 3 et de la benzènesulfonylhydrazine 4.

Les composés **3** et **4** sont obtenus respectivement par réaction du chlorure de benzoyle ou du chlorure de benzènesulfonyle sur la N-méthyl-N-phénylhydrazine **16** commerciale en présence de triéthylamine et à 0°C (Glamkowski, Reitano, 1979 ; Organic Syntheses, 1967). Les hydrazines N,N-disubstituées ont de nombreuses propriétés analogues à celles des amines : elles forment notamment, comme les amines, des composés acylés avec les dérivés fonctionnels des acides carboxyliques, cela étant dû aux réactivités comparables du NH₂ hydrazinique et du NH₂ d'une amine (N nucléophile).

Les rendements obtenus, après recristallisation, sont bons (figure 72).

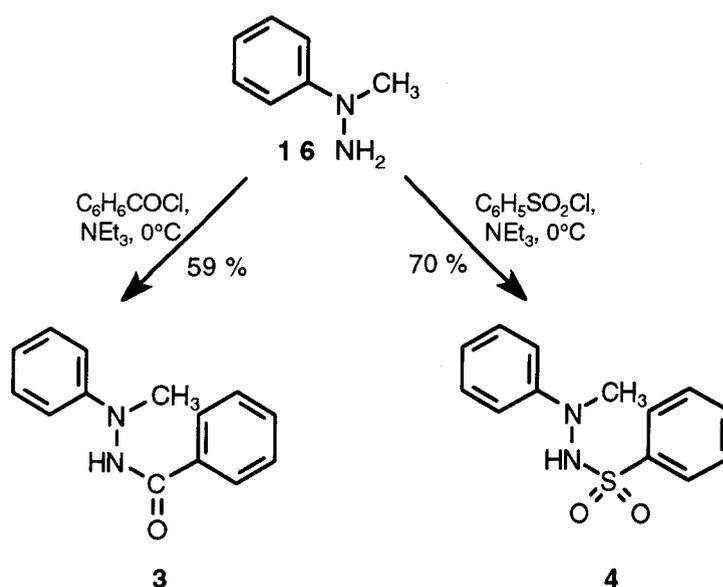


Figure 72.

I-2- Synthèse du dérivé benzoïque 6.

Nous avons été amenée à effectuer la synthèse du composé **6** en présence de deux bases différentes. Dans un premier temps, nous avons fait réagir l'acide 4-chlorosulfonylbenzoïque sur l'hydrazine **16** en présence de carbonate de sodium et à 0°C. Le composé **6** a été obtenu, mais avec un rendement de 3 % environ. Lors du deuxième essai, nous avons remplacé Na₂CO₃ par la pyridine, sans addition supplémentaire de solvant (Holmes et coll., 1947). Le rendement est alors de 11 % (figure 73).

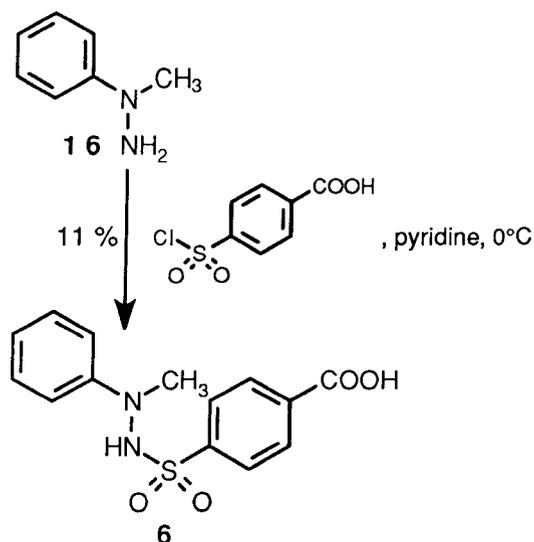


Figure 73.

I -3- Synthèse du dérivé salicylique 8.

La réaction du *para* chloronitrobenzène **17** avec la N-méthylhydrazine à 110°C permet d'accéder à l'hydrazine solide **18** (Rappoport, Sheradsky, 1968).

Parallèlement, nous avons synthétisé le chlorure de sulfonyle **20** par réaction de l'acide salicylique avec l'acide chlorosulfonique (Clark et coll., 1986).

Pour obtenir le composé **8**, plusieurs conditions réactionnelles ont été testées. La réaction du chlorure de sulfonyle **20** sur l'hydrazine **18** en présence de bicarbonate de sodium ou de triéthylamine ne nous a pas permis d'accéder au dérivé salicylique **8**. L'addition du chlorure de sulfonyle **20** à l'hydrazine **18** en présence de pyridine et à -15°C nous a permis d'isoler 12 mg d'un produit qui, d'après une analyse en RMN, correspond au composé **8** (rendement de 3 %) (figure 74). Nous n'avons cependant jamais réussi à en obtenir de plus grandes quantités. L'atome d'azote du NH₂ voit sa nucléophilie diminuer par la présence d'un groupement électroattracteur en *para*, ce qui pourrait expliquer l'inertie importante de la réaction. Ce produit n'a donc pas pu subir les tests pharmacologiques.

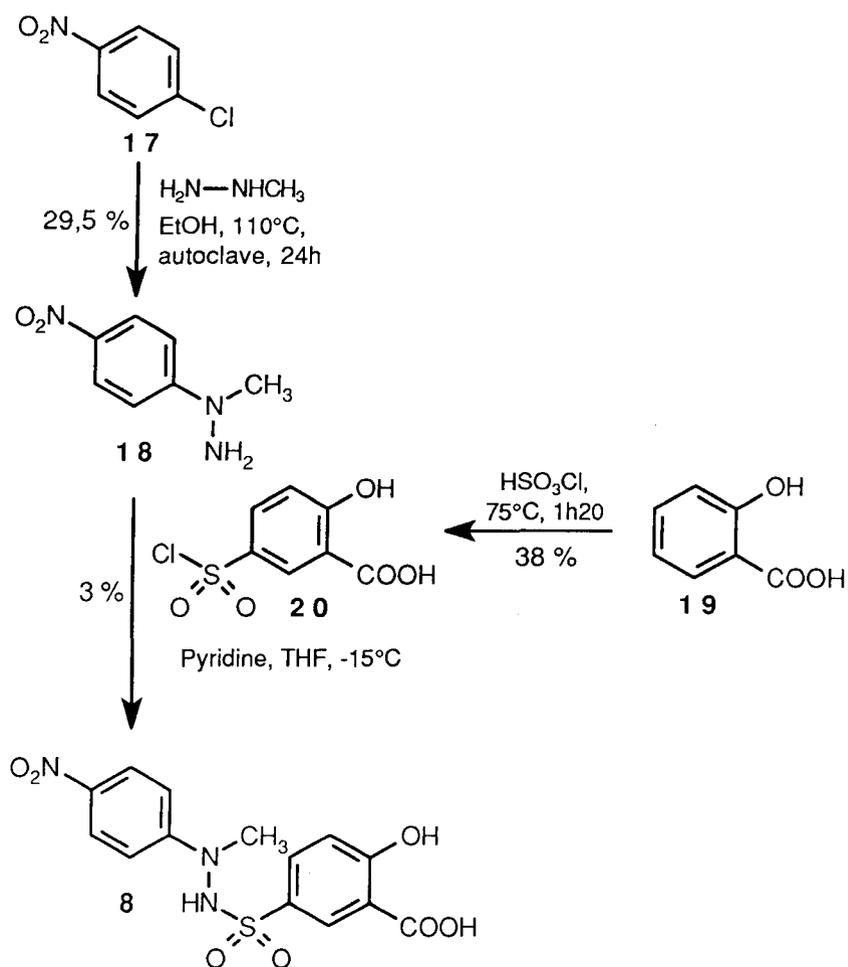


Figure 74.

Au cours de la synthèse de ces dérivés ouverts, nous avons remarqué que le rendement du couplage de l'hydrazine **16** avec un chlorure de benzoyle ou un chlorure de benzènesulfonyle diminue lorsque le groupement aromatique du réactif est substitué par une fonction carboxylique (tableau 6), ce qui n'était pas prévisible car un groupement capteur en *para* du COCl ou du SO_2Cl aurait dû augmenter la réactivité. Le faible rendement obtenu lors de la synthèse de **8** peut également être dû à la présence de substituants sur le chlorure de benzènesulfonyle.

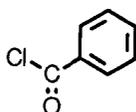
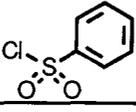
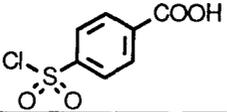
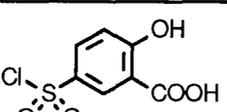
Hydrazine	Agent d'acylation ou de sulfonation	Produit obtenu	Rendement
16		3	59 %
16		4	70 %
16		6	11 %
18		8	3 %

Tableau 6 : Comparaison des rendements des réactions de couplage des hydrazine **16** et **18** avec un chlorure de benzoyle ou un chlorure de benzènesulfonyle (substitué ou non).

II - Synthèse des composés fermés non substitués par une chaîne éthylénique.

II -1- Préparation de la 1-benzamido indoline 1 et de la 1-benzènesulfonylamino indoline 2.

La réaction du nitrite de sodium avec l'indoline **21** diluée dans une solution d'acide chlorhydrique mène à la formation de la 1-nitroso indoline **22** stable (Wright, Willette, 1962) qui précipite dans le milieu (figure 75). Le groupe nitrosé de **22** est réduit à 0°C par LiAlH₄ dans l'éther anhydre pour fournir l'amino indoline **23** intermédiaire utilisée extemporanément pour réaliser la réaction suivante.

Le composé **2** est obtenu par réaction du chlorure de benzènesulfonyle sur l'amino indoline **23** non purifiée en présence de triéthylamine. Le rendement de cette réaction est de 15 %.

Pour l'obtention de **1**, nous avons utilisé deux bases différentes pour capter l'acide chlorhydrique. Nous avons dans un premier temps fait réagir le chlorure de benzoyle sur l'amino indoline **23** non purifiée à 0°C, en présence de triéthylamine (Glamkowski, Reitano, 1979). Le fait qu'il reste toujours, après plusieurs recristallisations, des traces de triéthylamine dans le produit nous a conduite à remplacer la triéthylamine par le bicarbonate de sodium. Ce second essai nous a permis d'accéder à la 1-benzamido indoline **1** pure avec un rendement de 45 %.

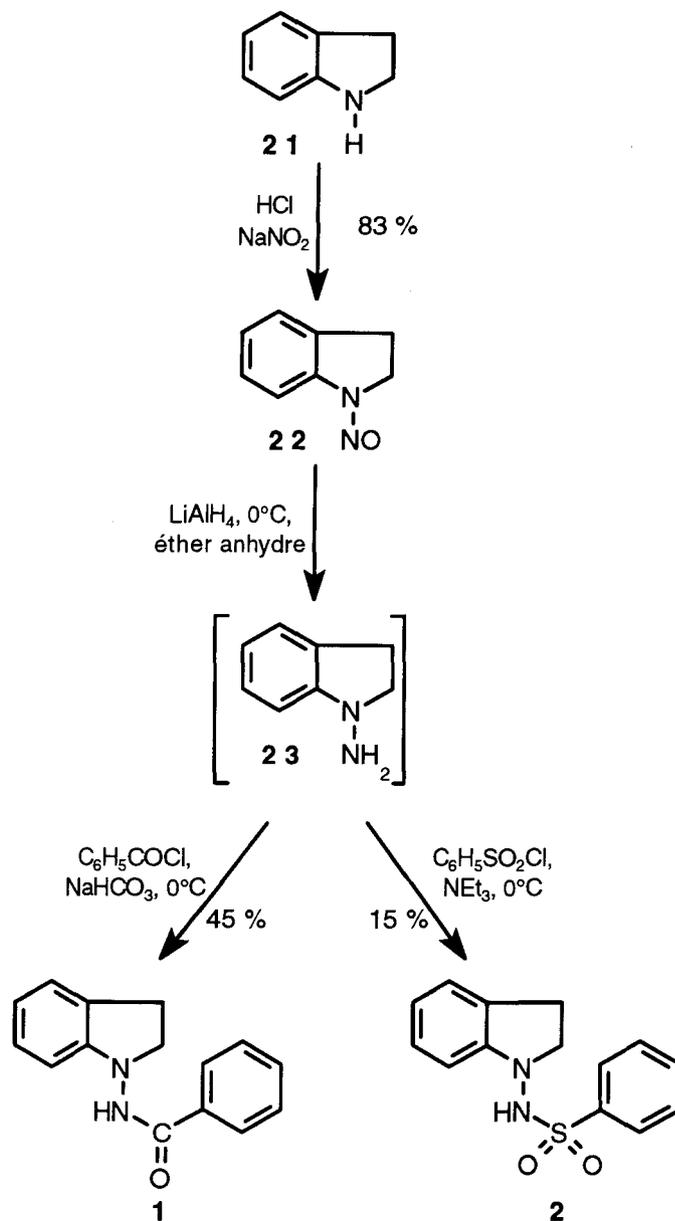


Figure 75.

II -2- Préparation de la 1-acétamido indoline 11.

Le produit de départ de cette synthèse est la N-nitroso indoline **22** dont la préparation a été mise au point pour l'obtention des dérivés **1** et **2**. Ce composé est réduit par LiAlH₄ afin d'accéder à l'amino indoline **23** utilisée telle quelle pour la réaction suivante. La réaction du chlorure d'acétyle en présence de triéthylamine avec l'amino indoline **23** nous permet d'obtenir le composé **11** avec un rendement de 31 % (figure 76).

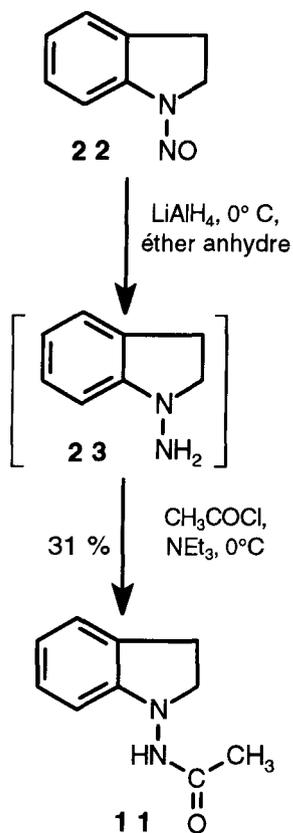


Figure 76.

Ayant remarqué, en réalisant un spectre RMN ^1H 1D à 25°C , que les signaux correspondant au groupement NH et au groupement CH_3 sont dédoublés, nous avons pensé que nous étions en présence de deux conformères en équilibre. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons enregistré les spectres RMN ^1H 1D à diverses températures ($25, 40, 60$ et 80°C). Cette étude montre, lorsqu'on augmente la température, la coalescence des signaux correspondant au fragment acétamide et au fragment aromatique de l'indoline. De plus, si après avoir effectué le spectre à 80°C , on réalise à nouveau un spectre à 60°C , on observe alors le dédoublement des signaux. L'équilibre conformationnel évalué à $72\%/28\%$ à 20°C est ainsi prouvé.

Les spectres ^1H 2D (NOESYPH, $\tau_m = 750$ et 1250 msec.) permettent d'affirmer que l'équilibre conformationnel ne concerne que le fragment acétamide et que ce groupement est perpendiculaire au plan de l'indoline. Bien que connaissant l'équilibre conformationnel, il est impossible de connaître le conformère principal (figure 77).

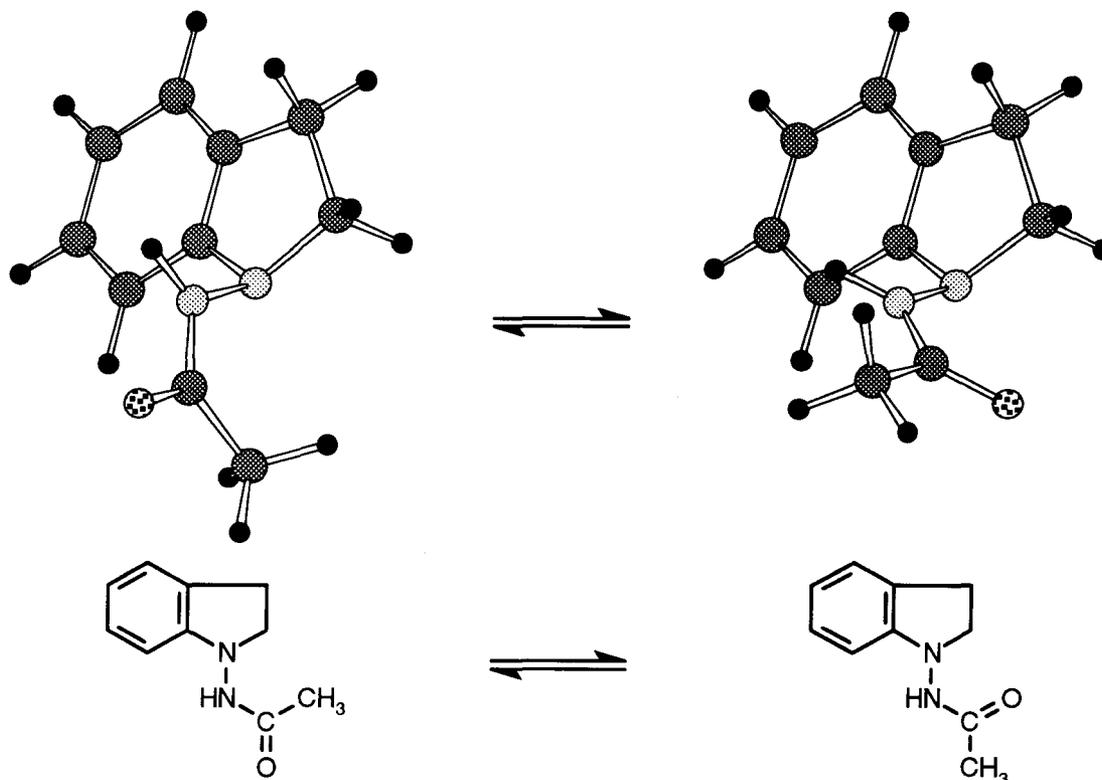


Figure 77.

II -3- Préparation de la 1-(4-carboxyphényl)sulfonylamino indoline 7.

Le produit de départ de cette synthèse est également la nitroso indoline **22** (figure 78). Après réduction de ce composé par LiAlH_4 , plusieurs essais de couplage avec l'acide 4-chlorosulfonyl benzoïque ont été réalisés.

La réaction de l'acide 4-chlorosulfonyl benzoïque sur l'amino indoline **23** à 0°C dans la pyridine, selon la méthode mise au point pour l'obtention du composé **6** (analogue ouvert de **7**), n'a donné qu'un rendement très faible. Nous avons donc cherché des méthodes plus efficaces. Le fait d'abaisser la température à -15°C n'a pas permis d'améliorer le résultat.

Nous avons ensuite envisagé l'adjonction d'un solvant organique au milieu réactionnel. L'utilisation d'éther éthylique n'a pas donné lieu à une amélioration. Par contre, l'utilisation de THF nous a conduite au composé **7** désiré avec un rendement de 11,5 %.

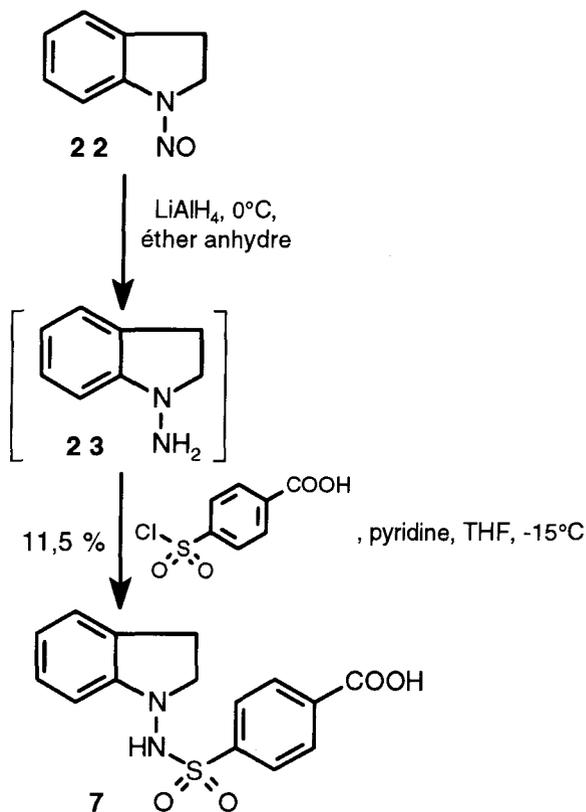


Figure 78.

II -4- Préparation de la 1-benzamido-5-hydroxy indoline 5.

Le produit de départ choisi est le 5-benzyloxy indole **24** commercial. Le fait que la fonction hydroxyle en position 5 soit protégée évite toute réaction d'oxydation à ce niveau au cours des synthèses (figure 79).

Le 5-benzyloxy indole est réduit en 5-benzyloxy indoline **25** par le cyanoborohydrure de sodium dans l'acide acétique glacial (Gribble et coll., 1974). Après traitement conventionnel, on obtient le produit **25** non pur sur lequel est effectuée directement la réaction de nitrosation, conformément à la méthode mise au point pour l'obtention de **22**. Le dérivé N-nitrosé **26** ainsi obtenu est ensuite réduit par LiAlH_4 pour donner l'hydrazine **27** qui, par réaction avec le chlorure de benzoyle en présence de triéthylamine, mène à la N-benzamido indoline **28**.

La dernière étape de cette synthèse menant à l'hydroxy indoline **5** correspond à l'hydrogénolyse de la fonction O-benzylique de **28** en présence de nickel de Raney.

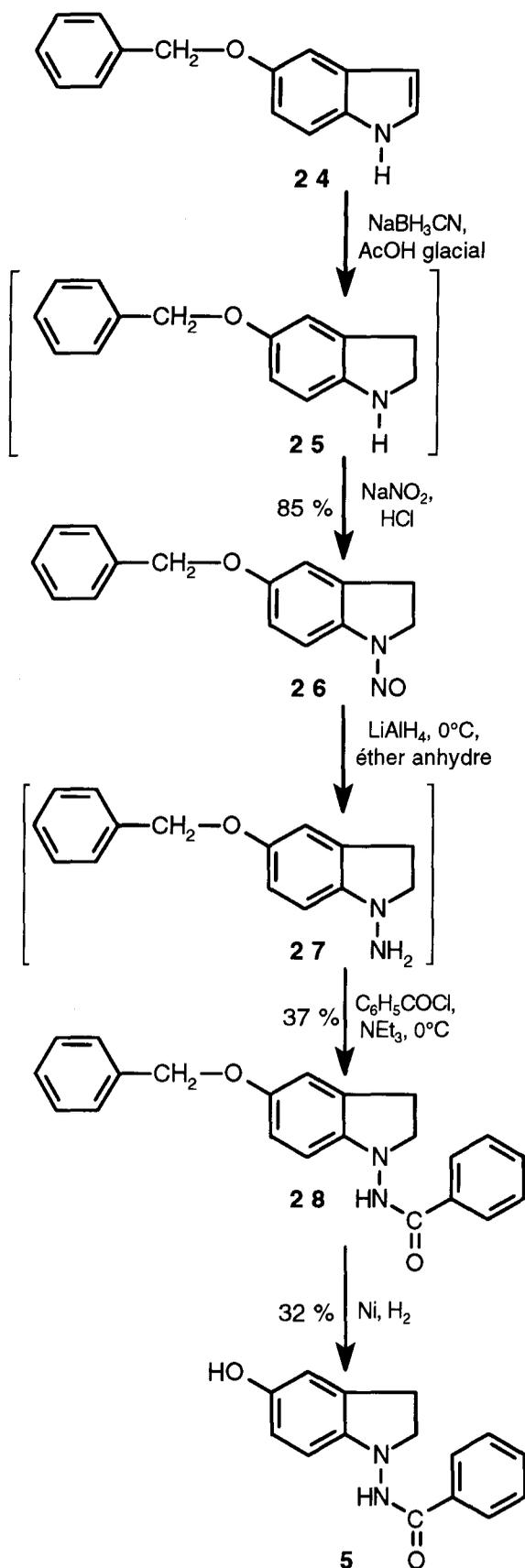


Figure 79.

II -5- Préparation des 1-benzamido-5-méthoxy Indolines 10 et 12.

Dans ce cas, le produit de départ choisi est le 5-méthoxy indole **29** commercial (figure 80). La nitroso indoline **31** est obtenue selon la méthode mise au point pour la synthèse du composé **26**, à savoir une réduction de l'indole **29** en indoline par NaBH_3CN suivie d'une nitrosation, avec un rendement de 51 % (ce qui est bon mais plus faible que dans le cas du composé **26** (85 %)). Le composé **31** est ensuite réduit par LiAlH_4 pour donner l'hydrazine **32** utilisée sans être purifiée pour les réactions suivantes.

La 1-benzamido-5-méthoxy indoline **12** est obtenue avec un rendement de 33 % par réaction du chlorure de benzoyle sur l'amino indoline **32** en présence de triéthylamine.

Les mêmes conditions réactionnelles ont permis la synthèse du composé **10**, le chlorure de benzoyle étant remplacé par le chlorure de l'acide 3,4-diméthoxy benzoïque.

Là encore, comme dans le cas des dérivés ouverts, nous avons observé des différences de rendement lors des réactions de substitution de la 1-amino indoline **23** par un chlorure de benzoyle ou un chlorure de benzènesulfonyle (tableau 7). L'utilisation d'un chlorure de benzènesulfonyle, substitué ou non, conduit à un rendement inférieur à 15 % (lignes 2 et 3) alors qu'avec le chlorure de benzoyle, il est de 45 % (ligne 1).

D'autre part, la présence d'un substituant en position 5 de l'amino indoline (lignes 1, 4 et 5) n'influence pratiquement pas le rendement de la réaction de couplage avec le chlorure de benzoyle. Par contre, le rendement diminue de façon significative lorsque le chlorure de benzoyle est substitué (lignes 5 et 6).

Lorsqu'on compare les rendements d'obtention des dérivés ouverts et des dérivés 1-amino indoliniques, on remarque une grande divergence : la réaction du chlorure de benzènesulfonyle avec l'hydrazine **16** a un bon rendement (70 %) (tableau 6) alors qu'avec l'amino indoline **23**, il n'est que de 15 % (tableau 7).

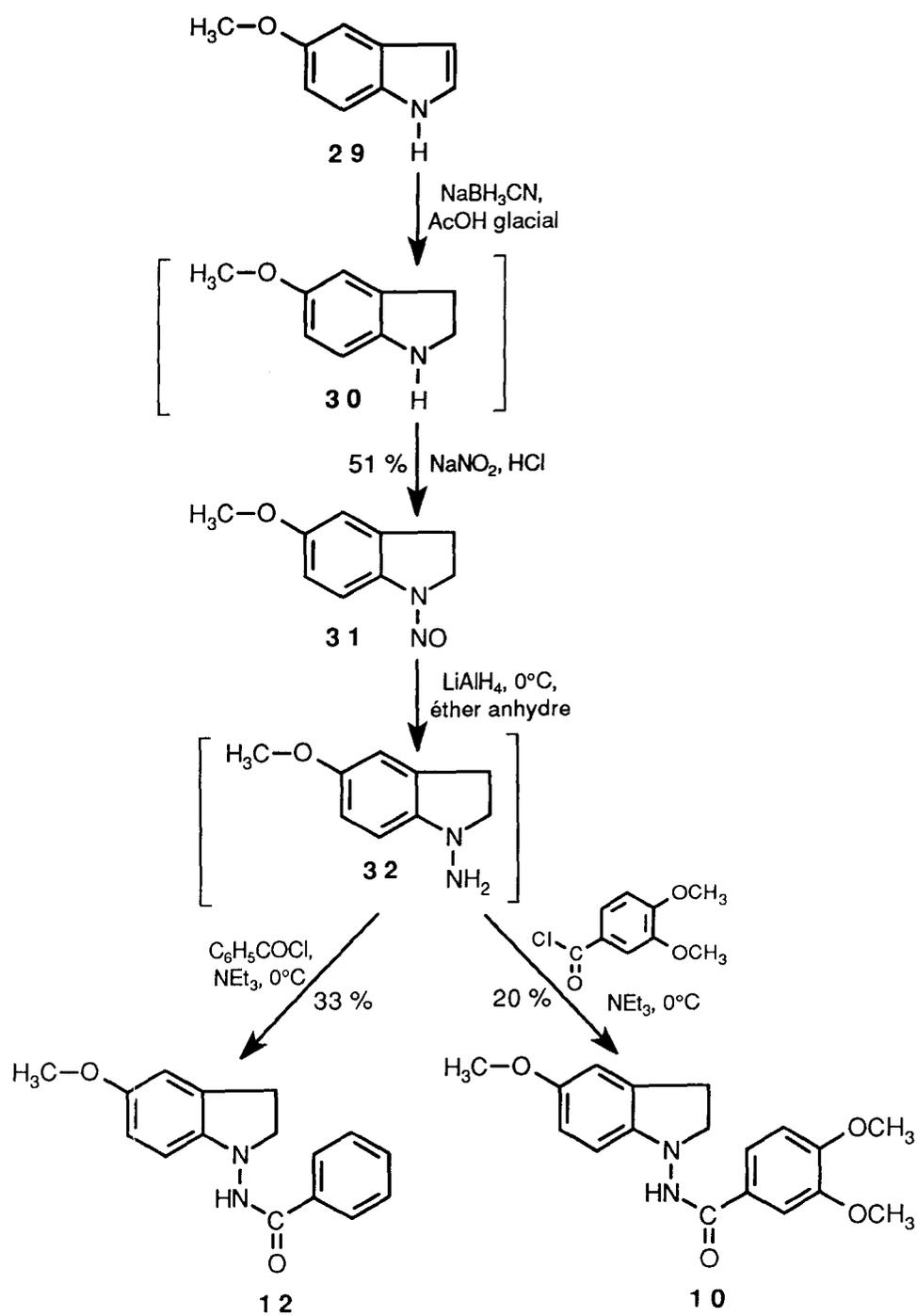


Figure 80.

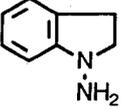
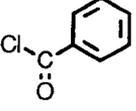
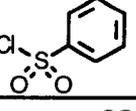
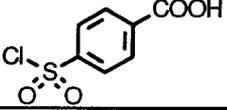
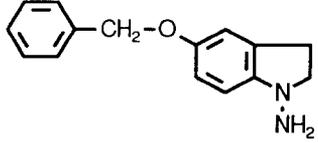
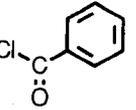
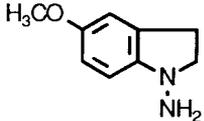
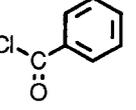
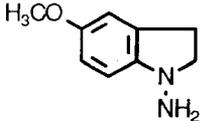
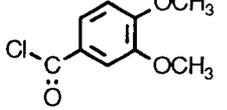
n° ligne	Indoline	Agent d'acylation ou de sulfonation	Produit obtenu	Rendement
1	 23		1	45 %
2	23		2	15 %
3	23		7	11,5 %
4	 27		28	37 %
5	 32		12	33 %
6	 32		10	20 %

Tableau 7 : Comparaison des rendements des réactions de couplage des amino indolines **23**, **27** et **32** avec un chlorure de benzoyle (substitué ou non) ou un chlorure de benzènesulfonyle.

III - Synthèse des dérivés fermés substitués par une chaîne éthylénique.

III -1- Préparation de la (E)-1-(4-carboxyvinylène)benzamido indoline 9.

III -1-1- Première voie de synthèse envisagée.

Notre idée initiale était d'obtenir le synthon **33** (figure 81) afin de pouvoir réaliser ensuite une réaction de Wittig et de substituer le noyau benzoyle par une chaîne α,β -éthylénique. Cette méthode devait nous permettre d'accéder non seulement au composé **9** mais aussi au composé hexénoïque **13**, et à ses dérivés **14** et **15**.

La réaction de Wittig conduisant la plupart du temps à des mélanges des conformères *Z* et *E*, nous avons prévu de séparer les isomères en fin de synthèse.

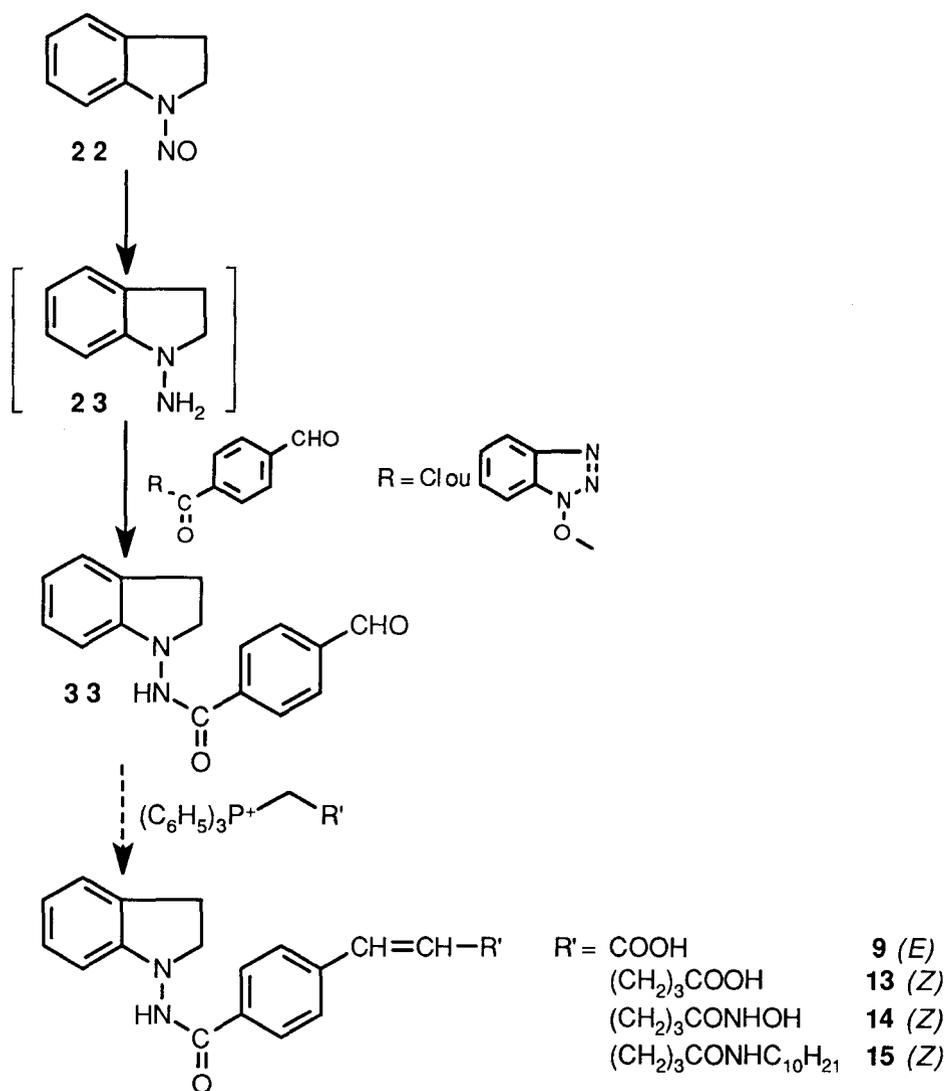


Figure 81.

Plusieurs conditions d'acylation ont été testées dans le but d'obtenir le synthon **33** à partir de la nitroso indoline **22**.

III-1-1-1- Passage par le chlorure d'acide.

Ayant, pour les synthèses décrites précédemment, utilisé des méthodes de substitution impliquant des chlorures d'acide, nous avons voulu dans un premier temps employer le même procédé (figure 82). Nous avons pour cela synthétisé le chlorure d'acide **35** par réaction du chlorure d'oxalyle sur le 4-carboxy benzaldéhyde **34** commercial (Carini et coll., 1990). La réaction de **35** non purifié sur l'amino indoline **23** ne nous a pas permis d'obtenir le synthon **33**. Nous avons isolé par cette méthode le produit de disubstitution **36** avec un rendement de 14 %.

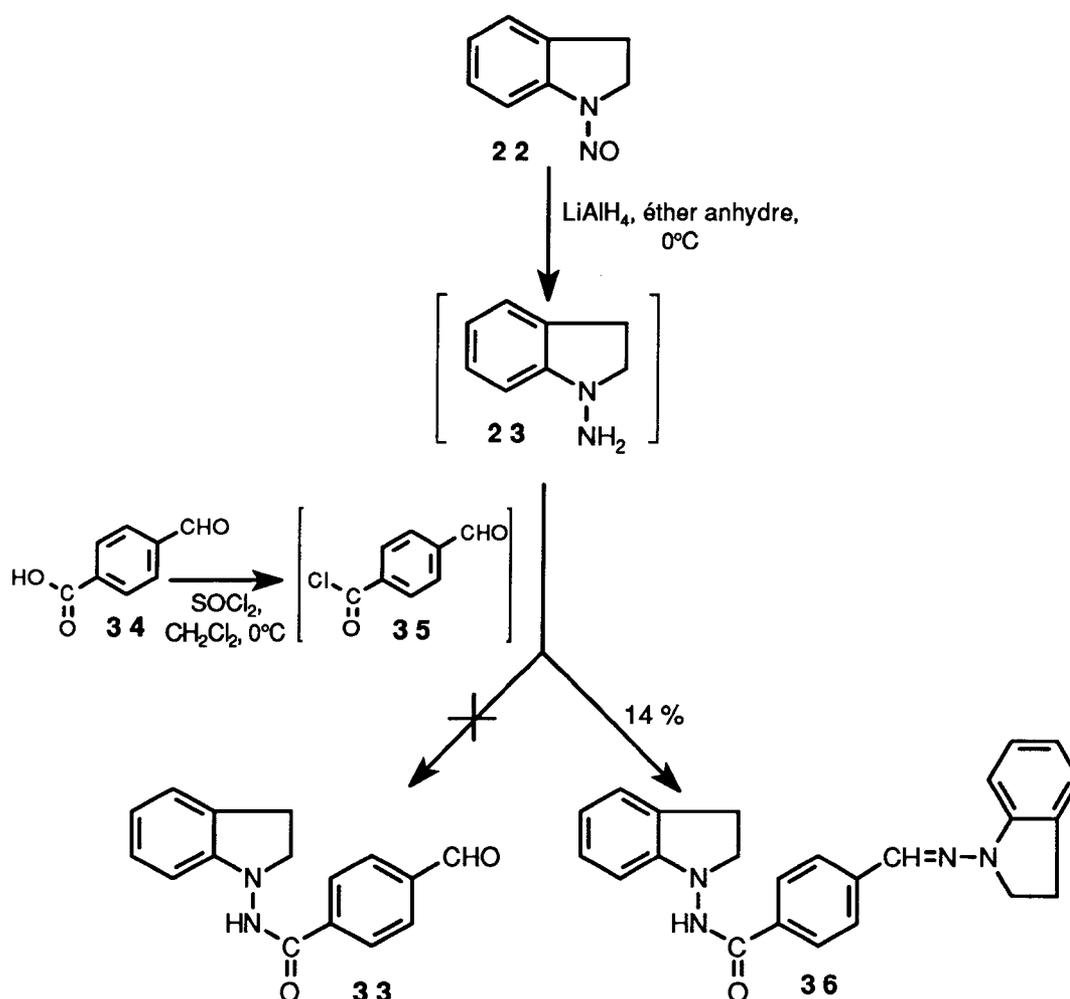


Figure 82.

III-1-1-2- Utilisation d'un ester activé.

La méthode utilisant un chlorure d'acide n'ayant pas abouti, nous avons envisagé une autre méthode empruntée au couplage peptidique. Pour ceci, nous nous sommes inspirée de la

formation de la liaison amide ; les hydrazines ayant, comme nous l'avons déjà évoqué, des propriétés chimiques analogues à celles des amines, il nous semblait possible de les opposer à un acide par l'intermédiaire d'un ester activé. La réaction de la DCC (dicyclohexylcarbodiimide) et de HOBT (hydrate du 1-hydroxybenzotriazole) sur le 4-carboxybenzaldéhyde nous conduit à l'ester activé **37** (figure 83) (Windridge, Jorgensen, 1971). Après mise en présence de **37** avec l'amino indoline **23**, seule la DCU (dicyclohexylurée) a été isolée.

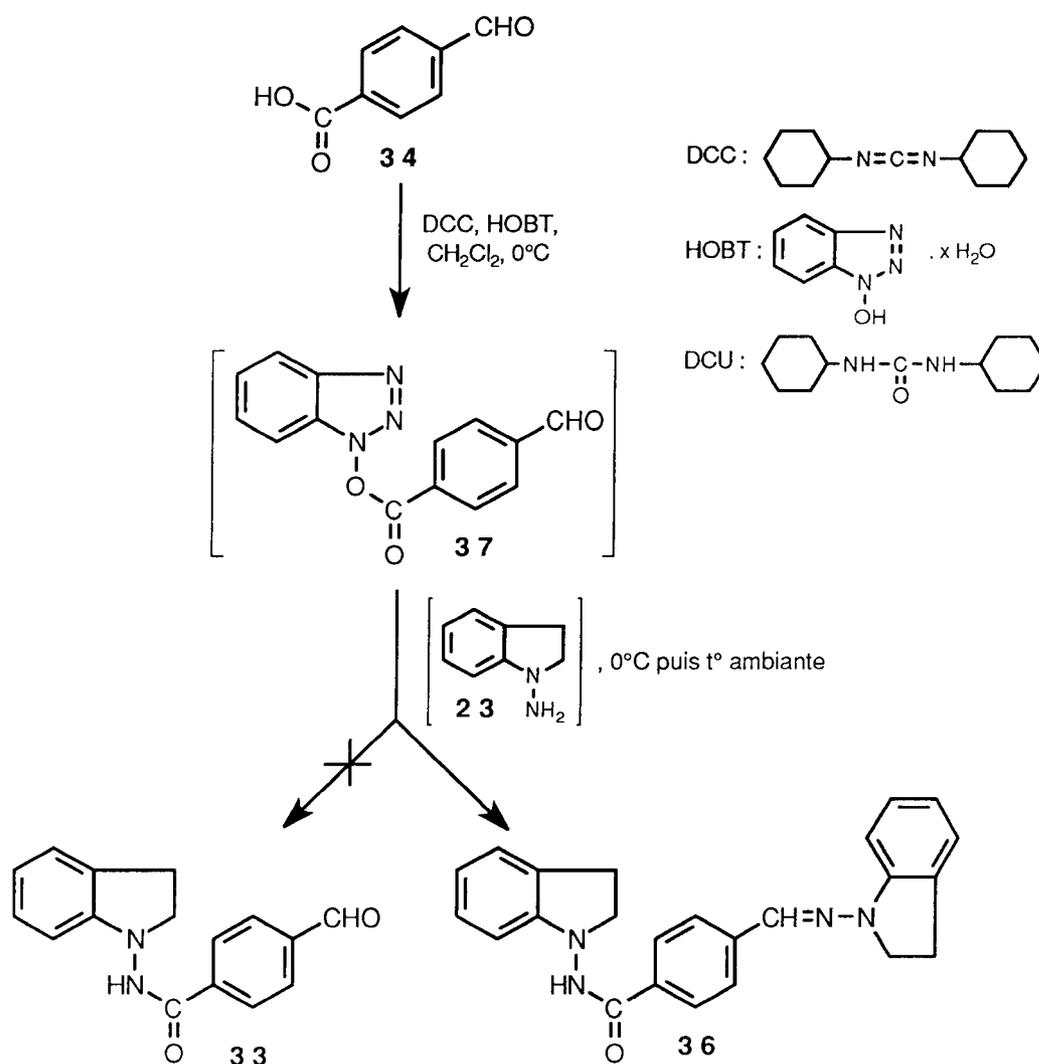


Figure 83.

Nous avons alors choisi de remplacer la DCC par l'EDCI, ou 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthyl carbodiimide (figure 84), qui est soluble dans l'eau et, par conséquent éliminable beaucoup plus facilement. Nous n'avons pas utilisé de HOBT dans ce cas. La triéthylamine a été ajoutée au milieu pour capter le HCl libéré, l'EDCI étant un chlorhydrate. Cet essai nous a conduit au produit de disubstitution **36**, comme dans l'essai de couplage avec un chlorure d'acide.

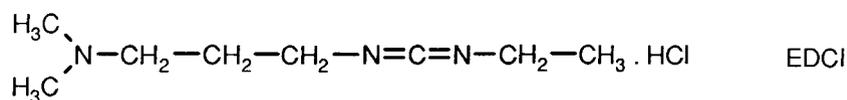


Figure 84.

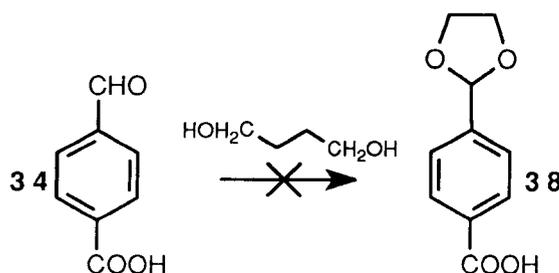
Au vu de ces résultats, la protection de la fonction aldéhydique de produit commercial **34** s'imposait.

III -1-1-3- Essais de protection du 4-carboxybenzaldéhyde **34**.

- par l'éthylène glycol :

Nous avons essayé deux méthodes différentes de protection de l'aldéhyde **34** par l'éthylène glycol (figure 85). La première réaction était catalysée par l'acide *para* toluènesulfonique (TsOH), dans le cyclohexane (Meskens, 1981) ; la réaction produisant de l'eau, cette manipulation a été réalisée par distillation azéotropique avec un séparateur de Dean Stark. Nous avons, après 24 heures de réaction, récupéré l'aldéhyde de départ.

Dans la deuxième méthode, le catalyseur était l'alumine activée (acide) (Kamitori et coll., 1985) mais, là encore, aucune évolution n'a eu lieu.



1^{ère} méthode : TsOH, cyclohexane, reflux 24h dans un appareil de Dean Stark.

2^{ème} méthode : Al₂O₃ activée (acide), CCl₄, reflux 70h.

Figure 85.

- par le 2,2-diméthoxypropane.

Nous nous sommes dans ce cas inspirée de la méthode de transacétalisation mise au point par Nagasawa et coll. (1990) (figure 86). Par CCM, nous avons observé la disparition quasi totale de l'aldéhyde, mais il semblerait que ce composé de départ soit régénéré au cours des différents essais de purification. La réaction de déprotection étant elle aussi catalysée par l'acide *para* toluènesulfonique, on a pu régénérer l'aldéhyde par faute d'avoir neutralisé cet acide.

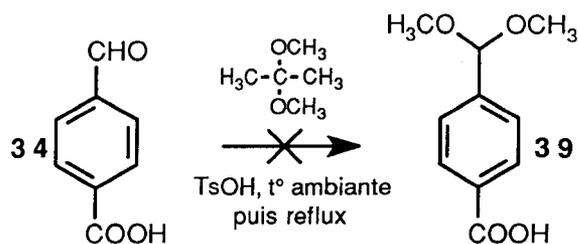


Figure 86.

Il est possible que la faible réactivité de **34** lors de ces différents essais de protection soit due à une désactivation de l'aldéhyde par la fonction carboxylique. Afin de vérifier cette hypothèse, il aurait fallu protéger la fonction acide de façon à pouvoir, dans la suite de la synthèse, régénérer cette fonction sélectivement : une possibilité aurait été de former l'ester de MEM (méthoxyéthoxyméthyle) ou l'ester de *t*Bu dont les conditions d'hydrolyse (avec l'acide trifluoroacétique) sont compatibles avec la présence d'une fonction acétal.

Nous avons pour notre part choisi d'abandonner cette voie de synthèse au profit d'une autre méthode n'impliquant malheureusement pas la formation d'un synthon.

III -1-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.

Cette deuxième voie de synthèse implique en premier lieu une réaction de Wittig afin d'accéder à l'acide benzoïque **40** substitué par une chaîne acrylique, qui par couplage avec la 1-amino indoline **23** donne l'indoline **41** (figure 87). L'hydrolyse de **41** conduit à l'acide **9** voulu.

L'acide *para* substitué **40** est obtenu par réaction du triphénylphosphoranylidène acétate d'éthyle sur le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (Eitel, Pindur, 1989) avec un rendement de 22 %.

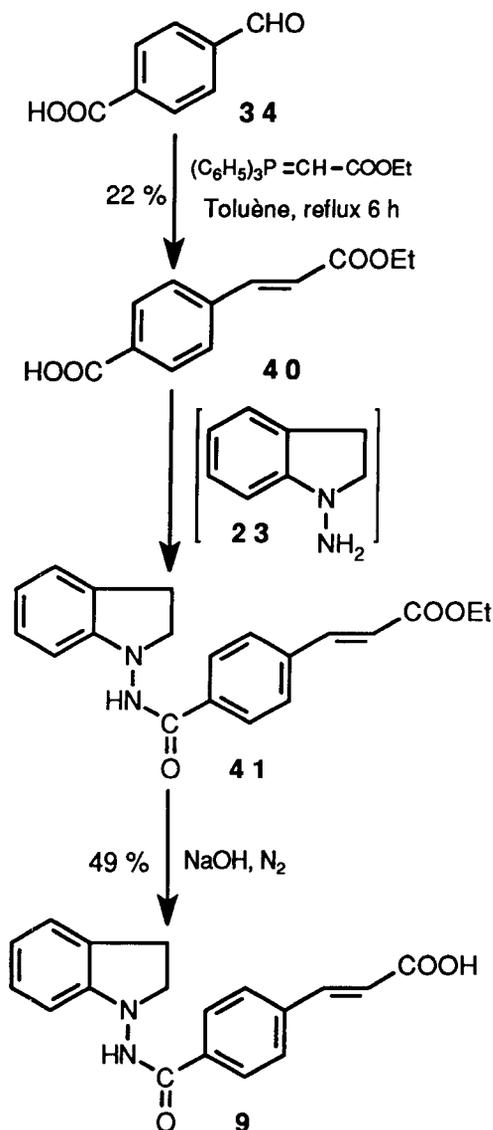


Figure 87.

III -1-2-1- Obtention de la benzamido indoline 41.

Ayant opté pour un couplage de type peptidique, nous avons initialement utilisé la DCC et le HOBT (figure 88). Lors d'un premier essai, deux produits ont été isolés : l'un, obtenu en faible quantité, correspondait au composé attendu **41** ; l'autre était l'ester activé intermédiaire **42**. Ces deux composés ayant été obtenus en faibles quantités, nous avons supposé que l'acide **40** n'avait pas totalement réagi.

C'est la raison pour laquelle, lors du deuxième essai, nous avons pris la précaution de vérifier en CCM la disparition totale de l'acide **40** avant d'ajouter l'amino indoline au milieu réactionnel, ainsi que la disparition totale de l'intermédiaire **42**. Nous avons ainsi isolé l'hydrazide **41** avec un rendement de 45 %.

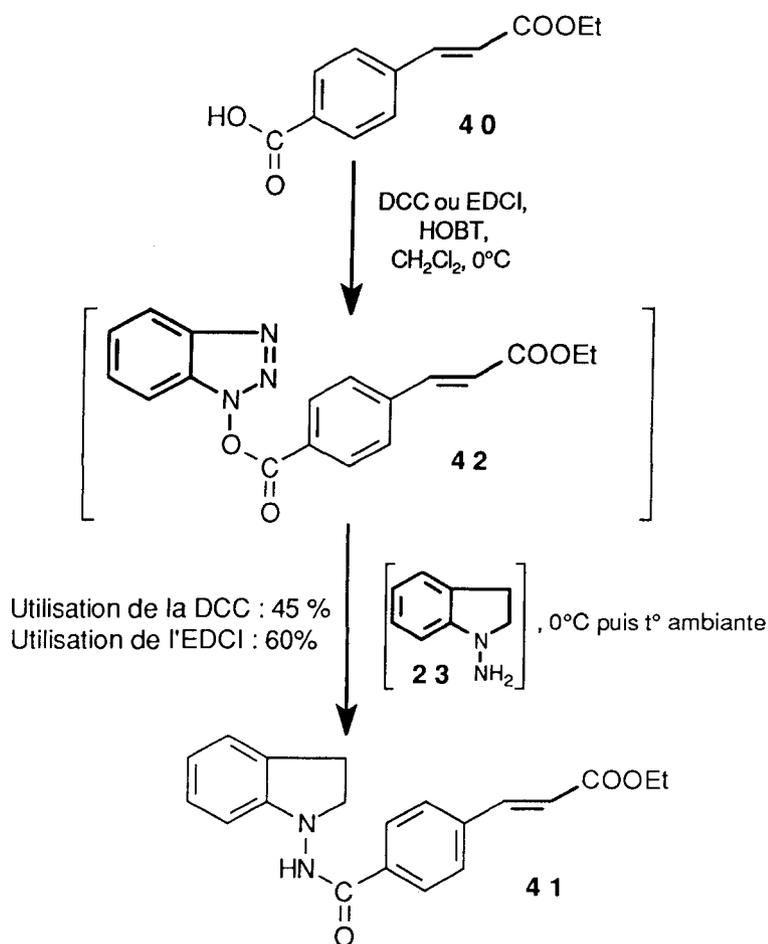


Figure 88.

Afin d'améliorer le rendement de la réaction, nous avons ensuite remplacé la DCC par l'EDCI (figure 84) : dans ce cas, le rendement est de 60%.

Nous avons alors retenu cette dernière méthode de couplage pour les synthèses ultérieures.

III -1-2-2- Hydrolyse basique de 41.

Nous avons tout d'abord réalisé cette saponification en utilisant une solution aqueuse de soude. Après traitement et recristallisation du solide obtenu dans un mélange éthanol / eau, nous avons obtenu un mélange de dérivé indolinique 9 attendu et de dérivé indolique 43 correspondant (figure 89). Une oxydation de l'indoline en indole avait donc eu lieu, soit au cours de la réaction elle-même (et il fallait dans ce cas utiliser une solution de soude dégazée et manipuler sous atmosphère inerte), soit au cours de la recristallisation (au cours de laquelle une coloration rose était apparue).

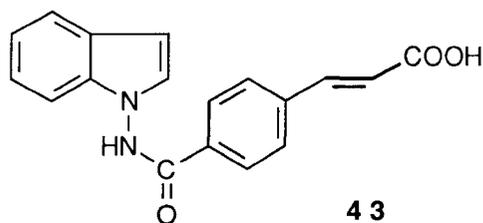


Figure 89.

Notre deuxième essai a donc consisté à vérifier le bien-fondé de notre première hypothèse. Malgré plusieurs recristallisations (mélange éthanol / eau puis acétone) et une purification sur colonne de silice, l'analyse élémentaire du composé n'a jamais été conforme.

Nous avons alors décidé de supprimer les recristallisations dans le mélange éthanol / eau, ce qui a conduit à un produit dont la RMN ^1H et l'analyse élémentaire sont conformes.

Les analyses en RMN, en masse et en HPLC analytique de ce composé nous ont montré que les deux isomères *Z* et *E* sont présents. D'après la RMN, l'isomère *E* ($J=16$) est prépondérant et il représente, d'après l'analyse en HPLC analytique, 92,6 % du mélange. Ces deux isomères n'ont pas été séparés et les tests pharmacologiques ont été réalisés sur le mélange.

III -2- Préparation de l'acide hexénoïque 13.

III -2-1- Première voie de synthèse envisagée.

N'ayant pas abouti dans notre essai d'obtention du synthon **34** qui aurait pu nous permettre d'accéder à tous ces composés en réalisant une réaction de Wittig, mais devant l'intérêt de disposer de tels composés, nous avons envisagé la préparation d'un autre synthon : le sel de phosphonium benzamido indolinique **46** (figure 90). Remarquons que cette méthode ne serait pas utilisable pour la formation du composé propénoïque **9** car l'acide glyoxylique n'existe que sous forme hydratée, ce qui est incompatible avec une réaction de Wittig qui doit être effectuée en milieu totalement anhydre.

Le composé bifonctionnel **45**, comportant une fonction acide et un groupement phosphonium, est obtenu avec un rendement de 82 % à partir de l'acide *para* bromométhylbenzoïque **44** et de triphénylphosphine (Tewari, Chaturvedi, 1978). Le couplage de type peptidique (mis au point pour la synthèse de **9**) de **45** avec l'amino indoline **23** nous permet d'accéder au nouveau synthon **46** avec un rendement de 56 %.

L'étape suivante consiste en une réaction de Wittig avec l'aldéhyde **49**. Cet aldéhyde est synthétisé à partir de la δ -valérolactone **47** (Marples et coll., 1986) : l'hydrolyse de **47**, en présence de méthoxyde de sodium, mène à l'alcool intermédiaire **48** qui est ensuite oxydé par le chlorochromate de pyridinium en aldéhyde **49** avec un rendement de 13 %. La réaction de Wittig réalisée avec un sel de phosphonium nécessite, pour accéder au phosphorane correspondant, l'utilisation d'une base forte. Différents essais effectués avec $\text{LiN}(\text{TMS})_2$ (Witkowski et coll., 1992) n'ont pas donné de

résultat, pas plus que les essais avec NaH (Dawson et coll., 1981 ; Tewari, Chaturvedi, 1978).

Il se pourrait que l'explication soit dans l'instabilité du synthon **46** (figure 91). En effet, en présence d'une base, se forme l'anion **51** qui, en raison de la conjugaison, pourrait se réarranger pour donner **52** puis mener à des dérivés secondaires tels que **53** et **54**. Toutefois, de tels composés n'ont jamais été isolés au cours de nos différents essais.

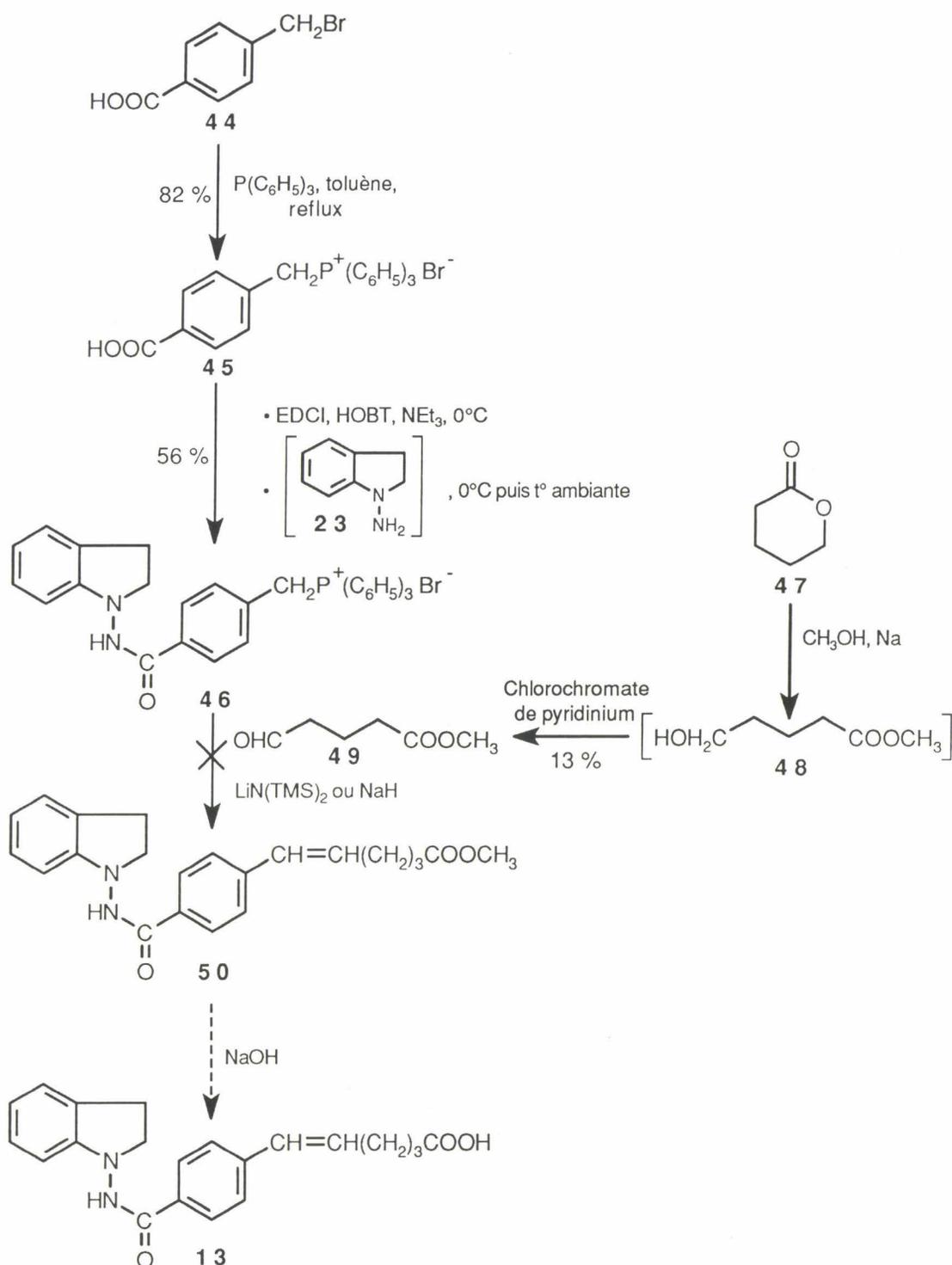


Figure 90.

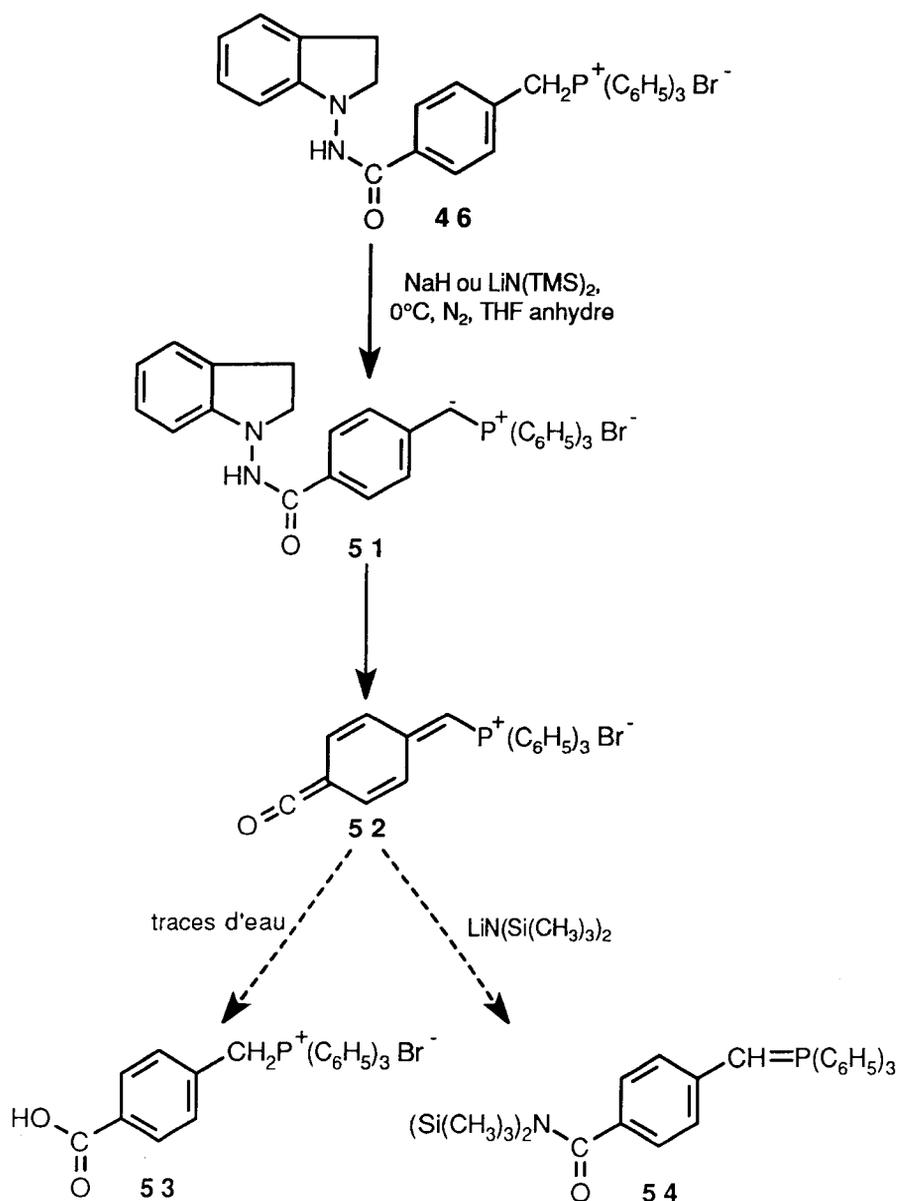


Figure 91.

A la vue des différents problèmes dérivant de l'utilisation du synthon conjugué **46**, nous avons mis un terme à cette voie de synthèse, et nous nous sommes dirigée vers une méthode analogue à celle mise au point pour la synthèse du composé **9**.

III -2-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.

Nous avons ici utilisé le sel de phosphonium aliphatique **56** synthétisé à partir du 5-bromoaléate de méthyle **55** et de la triphénylphosphine avec un rendement de 28 % (figure 92) (Tewari, Chaturvedi, 1978). La réaction de Wittig du dérivé **56** avec le 4-carboxybenzaldéhyde **34** en présence de LiN(TMS)_2 ne nous a pas permis d'accéder à l'ester hexénoïque **57** : parmi les

nombreux produits apparus au cours de cet essai (d'après les analyses en CCM), aucun ne semblait être majoritaire et nous n'avons tenté aucune purification à ce niveau. L'utilisation de l'hydruire de sodium nous a permis d'isoler deux composés : l'un correspond à $\text{PO}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ (et c'est la preuve qu'une réaction a bien eu lieu), l'autre est l'acide téréphtalique (qui dérive sûrement du 4-carboxybenzaldéhyde). Aucun de ces essais ne nous a conduit au composé **57** attendu.

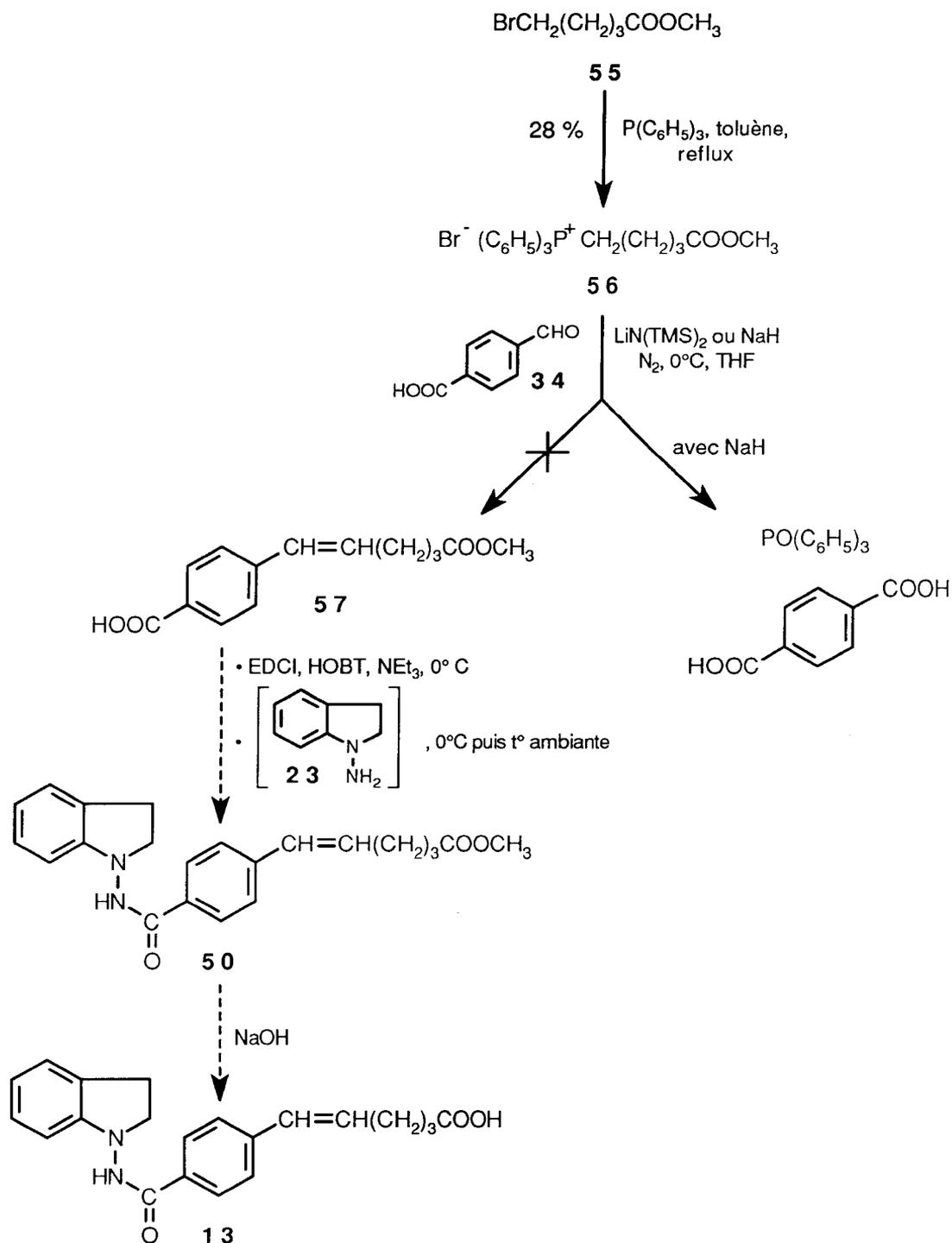


Figure 92.

Devant le manque de réactivité des sels de phosphonium utilisés dans le cadre de ces synthèses, nous nous sommes tournée vers l'emploi d'un phosphonate $(EtO)_2OPCH_2R$ qui, d'après la littérature, est plus réactif que le sel de phosphonium ou le phosphorane correspondant, surtout lorsque R est, comme un groupement aromatique, électroattracteur (Wadsworth, Emmons, 1961).

III -2-3- Troisième voie envisagée.

La méthode de Horner-Emmons mène, comme la réaction de Wittig, à des mélanges d'isomères *Z* et *E*. Toutefois, il semblerait que la formation de l'alcène *Z* soit thermodynamiquement influencée par la stabilisation du carbanion par un groupement électroattracteur, par un atome de phosphore riche en électrons (cas d'un phosphonate), par un excès de base, par une température de réaction élevée et par l'emploi d'un solvant apolaire. D'un point de vue cinétique, la formation de l'isomère *E* est favorisée par un atome de phosphore pauvre en électrons (cas d'un phosphorane), par la non-stabilisation du carbanion et par une température de réaction basse (Practical Organic Chemistry, 1989). Sachant que nous allions obtenir un mélange, nous avons prévu de séparer les isomères au niveau de l'avant dernière étape de synthèse.

Afin d'avoir à notre disposition un phosphonate aromatique, nous avons choisi de synthétiser le phosphonate **58** à partir de l'acide benzoïque **44** et de triéthylphosphite à 110°C (Durand et coll., 1980) (figure 93). La réaction de Horner-Emmons de ce composé avec l'aldéhyde **49** en présence de NaH (Dawson et coll., 1984 ; Ellingboe et coll., 1993 ; Thakkar et coll., 1993) nous a conduite aux composés **59** et **60** (dont le groupement OCH_3 peut provenir d'une réaction de transestérification en présence du composé bifonctionnel **49**), et non au dérivé éthylénique **57**.

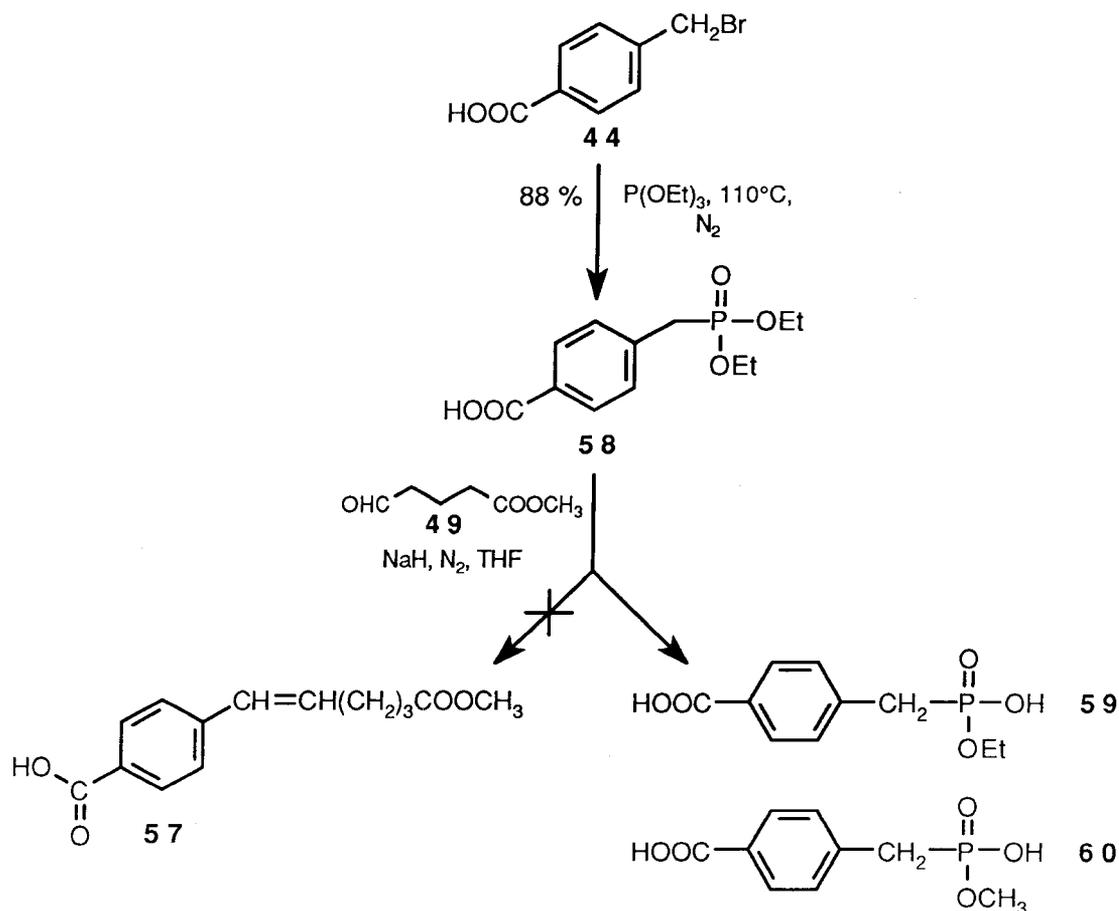


Figure 93.

Il semblerait que les différents problèmes rencontrés soient dus à la présence de la fonction carboxylique ; en effet, nous n'avons pas recensé, dans la littérature, la description d'une réaction de Horner-Emmons en présence d'un groupement COOH. Afin de remédier à ce problème, nous avons masqué cette fonction. Pour cela, il nous fallait choisir un groupement qui serait hydrolysé sélectivement à un stade précis de la synthèse. Nous avons dans un premier temps tenté de synthétiser l'ester de *tertio* butyle **61** (figure 94) qui aurait pu être hydrolysé en milieu acide sans que l'on affecte l'ester méthylique de la chaîne éthylénique ; l'utilisation de *t*BuOK ne nous a pas permis d'obtenir cet ester. Notre deuxième idée était de synthétiser l'ester de MEM (méthoxyéthoxyméthyle) **62** qui pouvait, lui aussi, être hydrolysé sélectivement. La réaction de Horner-Emmons de **62** avec l'aldéhyde **49** a conduit au dérivé éthylénique **64**, et non au composé **63** escompté.

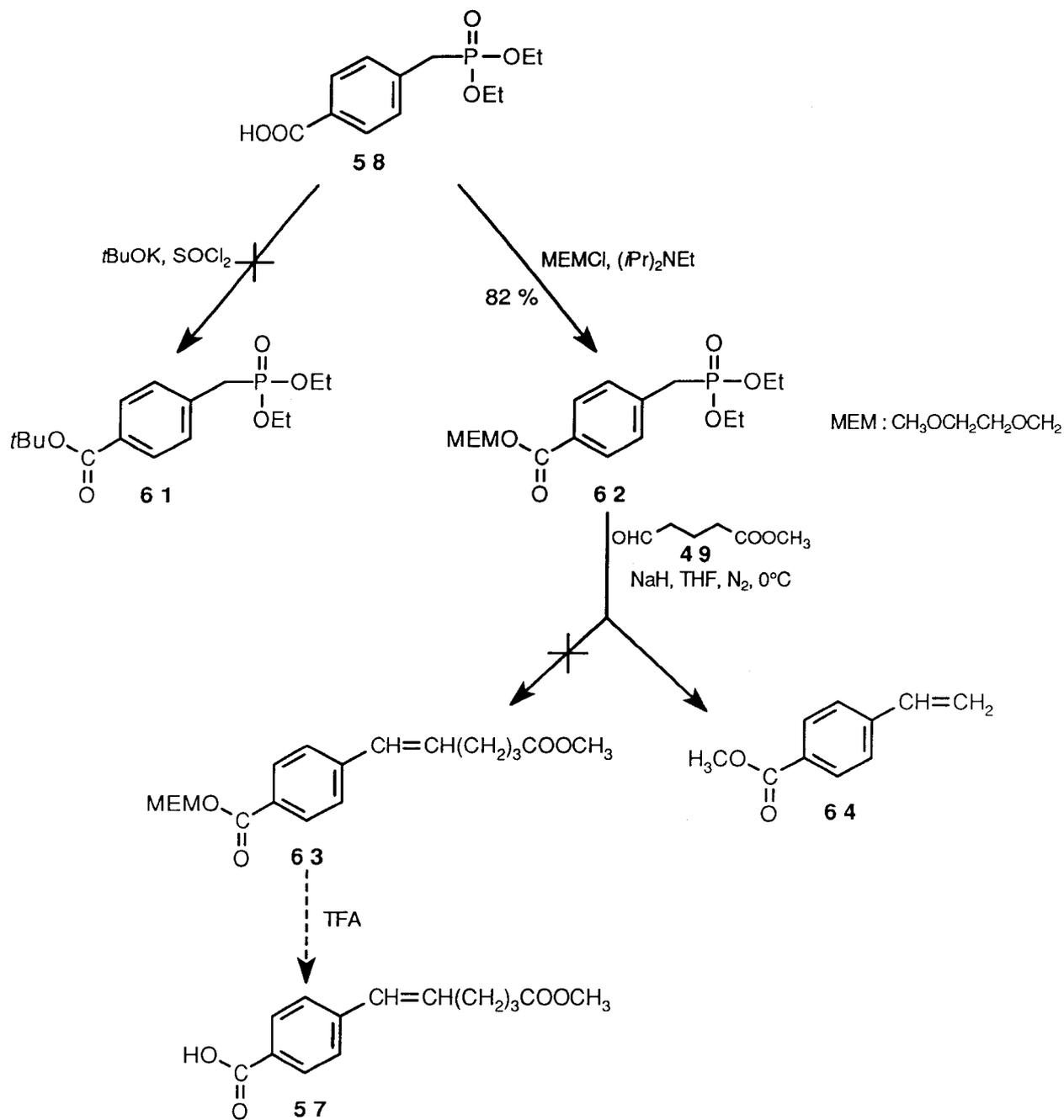


Figure 94.

Il nous a paru alors essentiel de vérifier que les conditions que nous utilisons pour réaliser cette réaction de Horner-Emmons étaient satisfaisantes. Pour ce faire, nous avons synthétisé l'ester méthylique **65** de l'acide **58** (figure 95). Le couplage de ce composé avec l'aldéhyde **49** en présence de NaH nous a permis d'obtenir le dérivé éthylénique **66**, comme attendu. Néanmoins, toute déprotection sélective de ce composé étant illusoire, nous ne pourrions pas nous en servir pour la synthèse de la benzamido indoline.

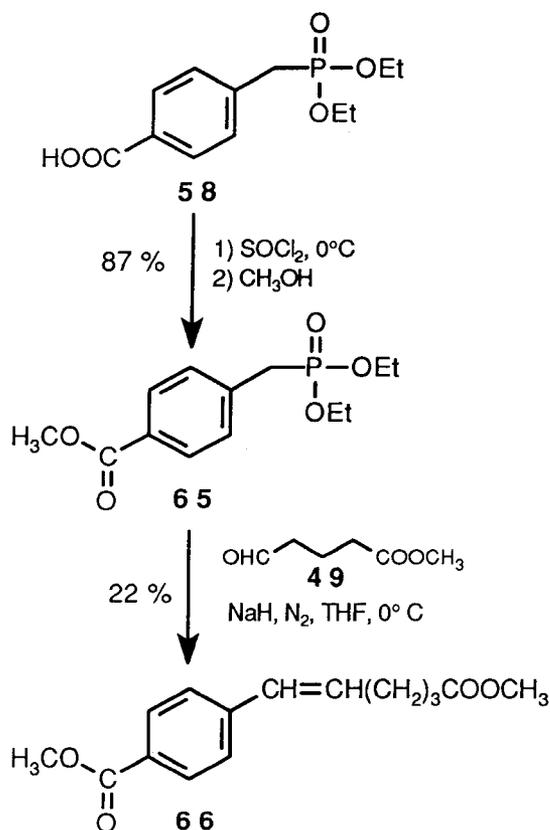


Figure 95.

Par contre, cette synthèse nous a permis de proposer un mécanisme concernant l'obtention de **64** (figure 96). La réaction de l'hydrure de sodium sur le phosphonate **62** conduit à l'anion **67** correspondant, devant théoriquement interagir avec l'aldéhyde **49**. Au lieu de cela, il y aurait une transestérification provoquant la libération de l'anion **69**. Cet anion se réarrangerait pour donner le formaldéhyde **70** qui réagirait ensuite, selon la réaction de Horner-Emmons, avec l'anion phosphonate **68** pour conduire aux intermédiaires **71** et **72** précurseurs de l'éthylénique **64**.

Aucune des méthodes impliquant un sel de phosphonium ou un phosphonate ne nous donnant satisfaction, nous nous sommes tournée vers un tout autre type de synthèse mettant en jeu un dérivé acétylénique intermédiaire précurseur de la chaîne éthylénique.

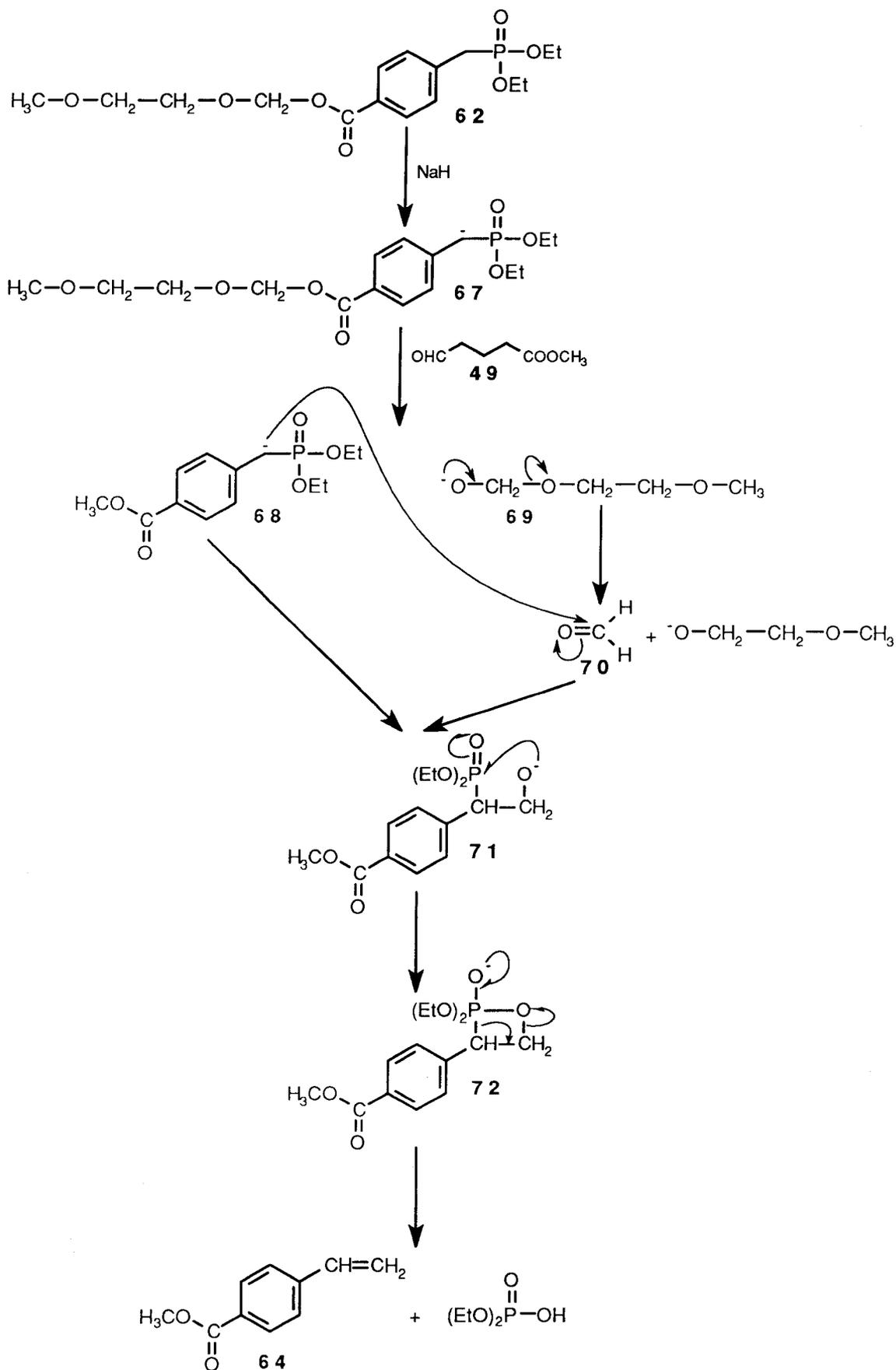


Figure 96.

III -2-4- Quatrième voie de synthèse envisagée.

Cette voie de synthèse utilise le couplage d'un dérivé halogéné aromatique, l'acide *para* iodo benzoïque commercial **76**, avec un alcyne vrai ω -carboxylé (figure 97). Pour répondre aux exigences de cette méthode, il était nécessaire que la chaîne aliphatique possède un groupement ester et non un groupement acide afin de pouvoir réaliser spécifiquement, par la suite, un couplage de type peptidique sur la fonction acide portée par le noyau benzoïque.

L'ester **75** de l'acide hexynoïque **73** est obtenu en deux temps : l'action du chlorure d'oxalyle conduit au chlorure d'acide intermédiaire **74** qui, en présence d'éthanol, donne l'ester éthylique **75** (Carini et coll., 1990). La réaction de substitution du composé **75** par l'acide *para* iodo-benzoïque **76** est catalysée par l'iodure de cuivre et le chlorure de *bis*(triphénylphosphine)platine II (Robins, Barr, 1983 ; Löffler, Himbert, 1990). On accède ainsi au composé **77** avec un rendement de 76 %.

L'hydrogénation de l'hydrocarbure acétylénique **77** a été dans un premier temps effectuée sur palladium désactivé sur sulfate de baryum (catalyseur de Lindlar) et de quinoléine (Rama Rao et coll., 1986 ; Vasiljeva et coll., 1993 ; Solladié et coll., 1993). L'utilisation d'un catalyseur hétérogène pour cette réaction devait nous permettre d'obtenir exclusivement l'alcène **78** de configuration *Z* nécessaire à la synthèse du composé **13**. Le rôle de la quinoléine est d'inhiber les interactions de l'alcène avec la surface du catalyseur, et d'augmenter ainsi la sélectivité de la réaction d'hydrogénation (Ulan et coll., 1987). Cependant, même en contrôlant le volume d'hydrogène absorbé au cours de la réaction, nous avons, lors de chaque essai, obtenu les alcènes **78** (*Z*) et **80** (*E*) ainsi que l'alcane **81** correspondant (figure 98). Lorsqu'on remplace la quinoléine par la pyridine (DeShong et coll., 1985), la proportion d'alcane est beaucoup moins importante.

La séparation par chromatographie sur silice de composés de structures très proches, possédant de surcroît une fonction carboxylique, se révèle expérimentalement peu aisée. Nous avons donc décidé d'effectuer le couplage avec l'amino indoline **23**, et de séparer les composés **79**, **82** et **83** (dépourvus de groupe carboxylique) ainsi formés par chromatographie ou par une autre méthode (figure 98). Les différents essais de recristallisation ne nous ayant pas permis d'isoler le dérivé éthylénique **79** de configuration *Z*, nous avons envisagé une séparation par chromatographie sur silice, mais là encore sans succès. Nous nous sommes alors dirigée vers une séparation sur colonne chirale, bien que ces composés ne possèdent pas de centre asymétrique. En effet, le nombre de sites de reconnaissance sur une phase chirale est très important, ce qui peut favoriser une discrimination des isomères éthyléniques (Armstrong et coll., 1985), et même de l'alcane correspondant (Takagi, Suzuki, 1992). L'analyse en HPLC chirale analytique de l'éluat obtenu par HPLC chirale préparative nous a montré que nous avons isolé **79**. Cependant, l'isopropanol contenu dans le mélange d'éluat pouvait constituer un nouveau problème : un essai de recristallisation de **79** dans ce solvant a induit une oxydation du noyau indolinique en noyau indolique. De plus, de trop grandes quantités d'éluant avaient été utilisées au cours de cette séparation. Nous devons rechercher une solution d'une part plus économique, et d'autre part dans laquelle les composés à séparer n'étaient pas susceptibles d'être oxydés.

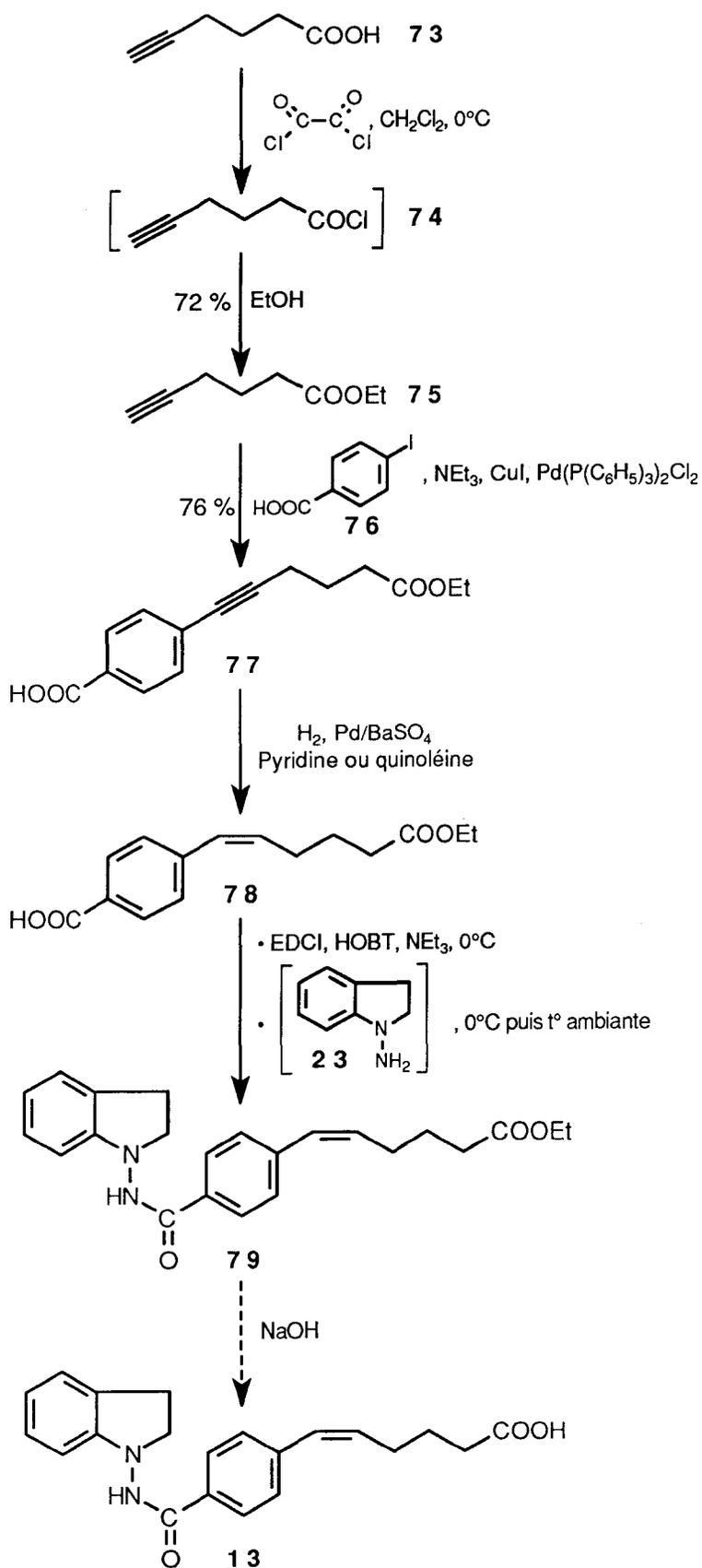


Figure 97.

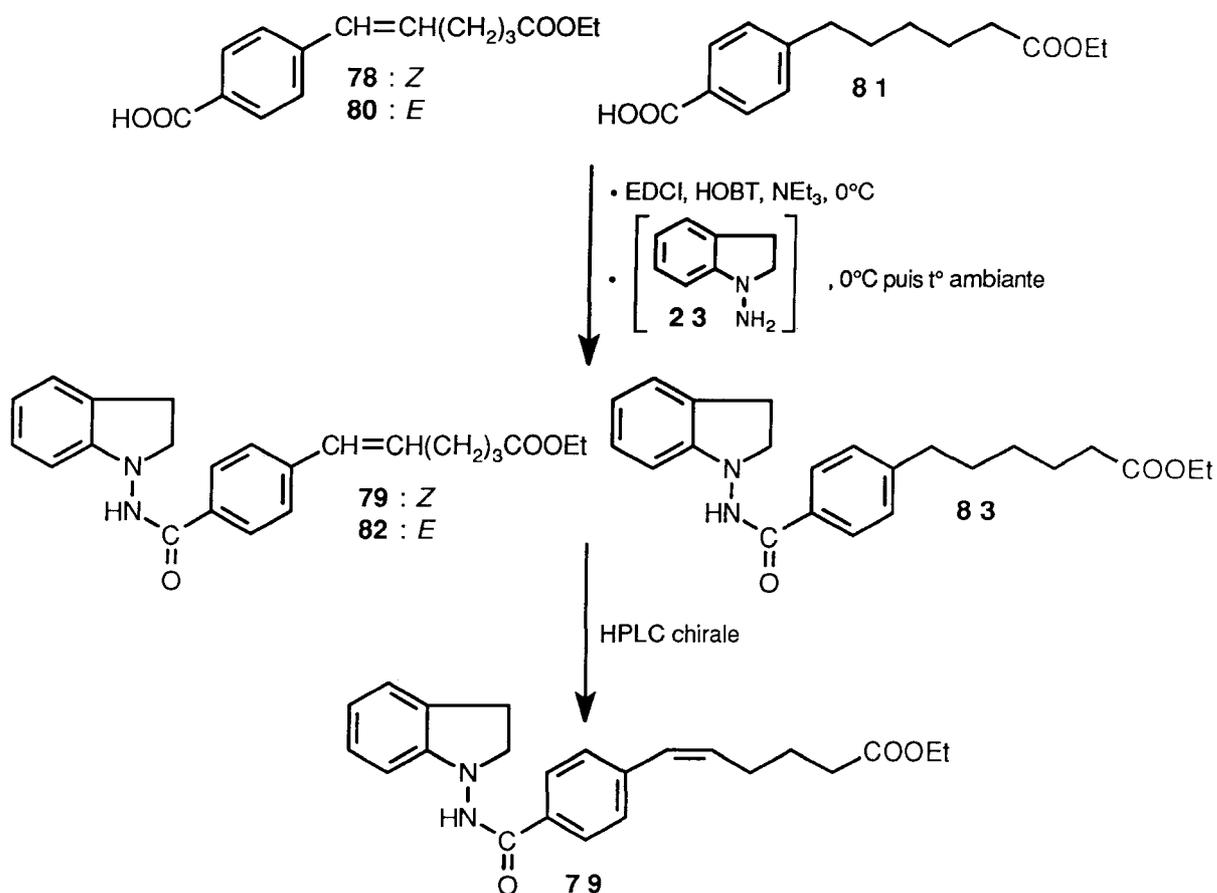


Figure 98.

Ayant analysé tous ces paramètres, nous avons décidé de synthétiser un nouvel intermédiaire qui pourrait être plus facilement purifiable par chromatographie chirale et à partir duquel nous pourrions obtenir l'acide **78** pur. Notre choix s'est porté sur un ester de MEM qui pourrait par la suite être hydrolysé sélectivement sans altérer l'ester éthylique de la chaîne aliphatique. Le mélange d'esters de MEM **84**, **85** et **86** est obtenu par réaction du chlorure de MEM sur le mélange d'acides **78**, **80** et **81** en présence de diisopropyléthylamine (Ireland, Thompson, 1979) (figure 99). On accède au composé **84** pur par une HPLC préparative sur phase chirale. Cet ester est ensuite hydrolysé par le TFA dans le dichlorométhane pour donner l'acide benzoïque substitué **78**. Le couplage de **78** avec l'amino indoline **23**, conformément à la méthode mise au point pour la synthèse de **9**, fournit la benzamido indoline **79**. La saponification par la soude de l'ester éthylique de la chaîne aliphatique de **79**, dans un mélange dioxane / eau et sous atmosphère inerte, permet d'accéder à l'acide **13** avec un rendement de 95 %. La conformation *Z* de ce composé a été vérifiée grâce à une étude en RMN (NOESY).

De nombreuses précautions ont été prises au cours de ces dernières étapes de synthèse. Nous avons manipulé à l'abri de la lumière et évité toute élévation de température afin de ne pas provoquer une isomérisation *Z-E*. De plus, afin de ne pas induire une oxydation du noyau indolinique en noyau indolique, tout usage d'alcool a été proscrit.

Bien que cette dernière voie de synthèse envisagée semble longue, elle nous a permis d'obtenir l'acide **13** avec dans l'ensemble de bons rendements. L'étape limitante est le couplage de la 1-amino indoline **23** avec l'acide **78** (rendement de 35 %).

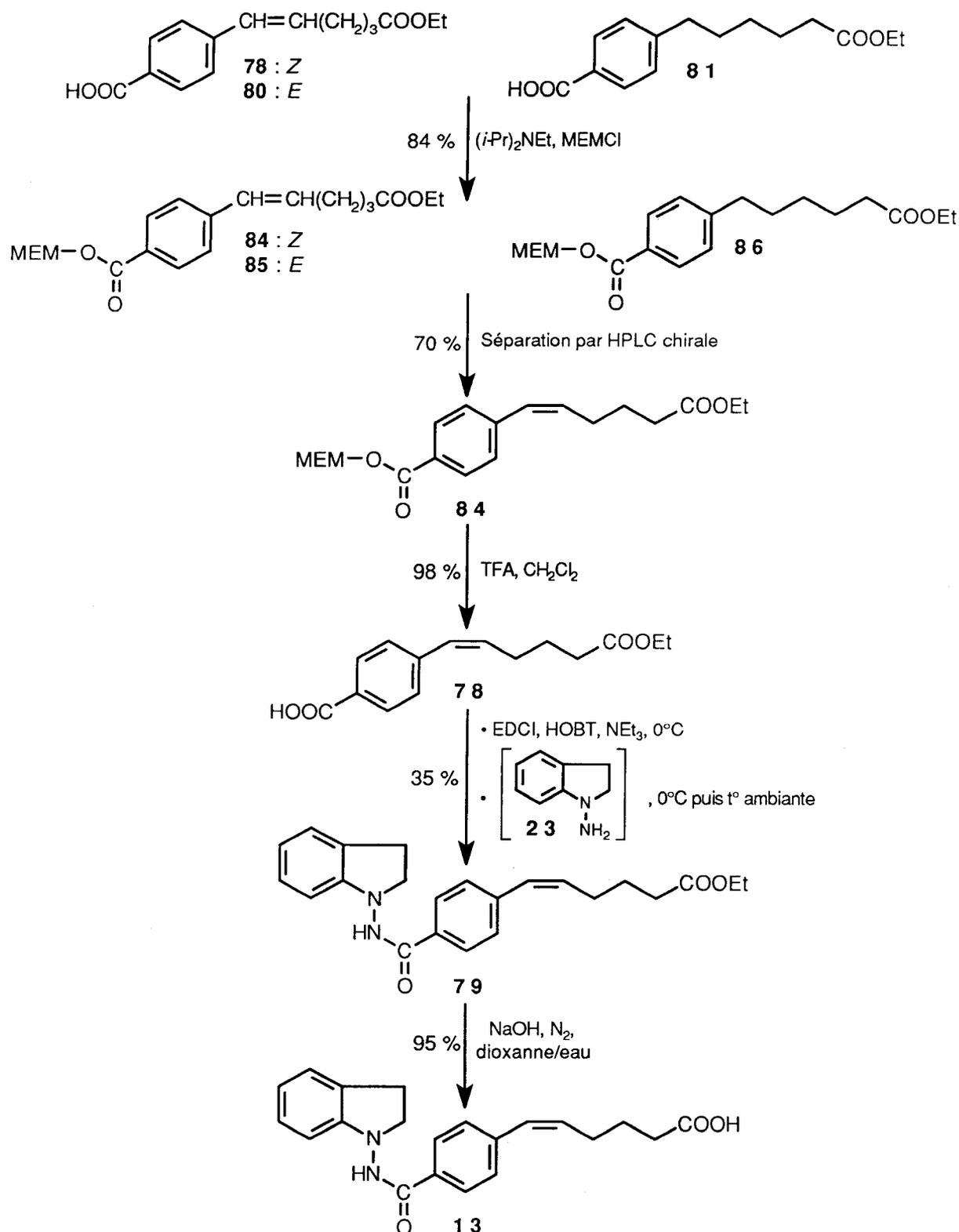


Figure 99.

III -3- Essai d'obtention de l'hydroxamate 14 et synthèse de l'amide 15.

Le point de départ de la synthèse de ces deux composés est l'acide hexénoïque **13** (figure 100).

Différents essais de synthèse de **14** avec le chlorhydrate de l'hydroxylamine ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), en utilisant un couplage avec l'EDCI et HOBT (Huang et coll., 1989), n'ont pas abouti. Bien que nous ayons observé la formation d'un produit en CCM, nous ne sommes pas parvenu à isoler un composé. L'utilisation du chlorhydrate de N-méthylhydroxylamine ne nous a pas permis non plus d'isoler un composé.

Par contre, le composé **15** est obtenu par couplage de l'acide **13** avec la décylamine, suivant la méthode mise au point pour la synthèse de **9**, avec un rendement de 38 %.

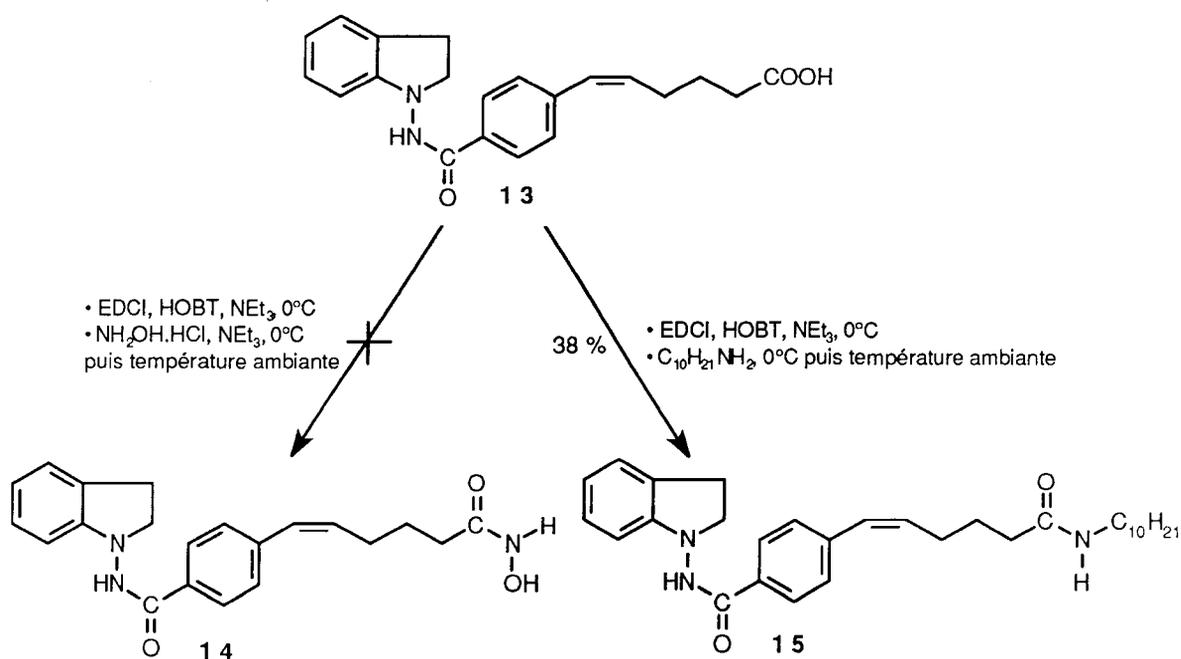


Figure 100.

ACTIVITE
PHARMACOLOGIQUE

Les travaux pharmacologiques concernant les produits que nous avons synthétisés ont été réalisés à **UCB Pharma**, dans le laboratoire de toxicologie de la **Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille** et au **Cerep**.

Plusieurs tests pharmacologiques ont été effectués :

- test d'Irwin (**UCB**).
- mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL (**UCB**).
- évaluation de leur effet sur l'activation, la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses d'aorte de rat (**UCB**).
- évaluation de leur effet sur la prolifération des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye (**FSPB**).
- inhibition de la 5-LO (**UCB**).
- évaluation de l'inhibition de liaison spécifique sur les récepteurs LTB₄ et LTD₄ (**Cerep**).
- inhibition de la PDE IV (**UCB**).

I- Test d'Irwin.

I -1- But et principe.

Dans le test d'Irwin (Irwin, 1968), les produits à l'étude sont administrés par doses croissantes à des souris.

Le but recherché est d'obtenir un profil d'activité dans les domaines du système nerveux central et végétatif. Le profil obtenu peut être notamment comparé à celui de l'indapamide.

I -2- Résultats.

Le test d'Irwin a été réalisé sur tous les composés, sauf sur ceux obtenus en trop faible quantité (**10**, **13** et **15**) (nous avons préféré les conserver pour les autres tests). Comme on peut le voir au niveau du test d'Irwin complet (tableau 8), ces produits commencent à avoir une activité à partir d'une dose de 100 µmol/kg. En dessous de cette dose, peu de paramètres (parmi les 51 envisagés) sont modifiés.

- Le composé **6**, à une dose de 32 µmol/kg, a une légère influence sur l'activité motrice, mais il faut attendre la concentration 100 µmol/kg pour observer une activité sur différents paramètres.
- Le composé **11** induit une faible modification de l'activité spontanée et de la miction après 1 heure à la dose de 32 µmol/kg.
- à cette même dose, le composé **12** modifie légèrement l'activité spontanée et le tonus du corps.

- Le composé 7 , dosé à 56 $\mu\text{mol/kg}$, affecte le paramètre tonus du corps ainsi que les réflexes des oreilles et l'ouverture palpébrale des yeux.
- A cette dose, le composé 9 affecte les réflexes de contorsion.

D'une façon plus générale, on remarque que certains paramètres, tels que la catalepsie et l'irritabilité, ne sont jamais affectés par les composés que nous avons synthétisés, même à des doses très élevées. Ces produits sont très peu toxiques vis-à-vis du SNA, et ils ont peu d'influence sur le profil neurologique, sauf en ce qui concerne le tonus musculaire. C'est au niveau du profil comportemental que l'on observe le plus d'interactions.

L'ensemble des produits testés ne présente donc pas ou très peu de caractère toxique dans ces tests sur la souris, ce qui est d'autre part confirmé par le test d'Irwin réduit (tableau 9) qui montre en plus que la dose létale de chacun est supérieure ou égale à 1800 $\mu\text{mol/kg}$. Ils n'ont, de plus, aucune influence sur le SNC. Par contre, les composés 6, 7, 9, 11 et 12 ont une faible influence sur la sédation.

n°	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	Indapamide
----	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	------------

PROFIL COMPORTEMENTAL

Aspect

• vigilance	1800	-	560	-	-	320	100	560	560	320	-
• stupeur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• placement visuel	1800	-	560	-	-	1000	320	560	560	100	-
• exploration	560	1800	560	-	-	100	100	100	100	560	3200
• passivité	1800	1000	1000	-	-	1000	320	320	320	-	-
• catalepsie	-	-	560	-	-	-	-	-	0	-	-
• stéréotypie	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-

Activité motrice

• activité spontanée	320	320	320	1000	1000	100	100	100	32	32	100
• réactivité	320	320	560	1800	1800	32	100	100	100	320	560
• activité induite au touché	1800	-	100	-	-	320	100	560	1000	100	-
• activité induite à la douleur	-	-	100	-	-	560	-	-	1000	-	-

Trouble du caractère

• toilette	320	100	320	1800	1000	320	100	180	100	32	100
• cris	-	-	-	-	-	560	-	-	-	-	-
• irritabilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• crainte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PROFIL NEUROLOGIQUE

Excitation SNC

• saisissement	-	-	560	1800	-	100	-	-	320	1000	-
• straub	-	-	100	-	-	1800	-	-	1000	-	-
• tremblements	-	-	-	-	-	1000	-	1000	-	1000	-
• dymétrie-mouvements anormaux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• secousses spasmodiques	-	-	-	1800	-	-	-	-	-	-	-
• opisthotonos (convulsion généralisée)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• convulsions	-	-	1000	-	-	-	-	-	1000	-	-

Tableau 8 : Test d'Irwin complet (paramètres en $\mu\text{mol/kg}$).

n°	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	Indapamide
----	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	------------

Incoordination motrice

• posture du corps	1800	-	1000	-	1800	320	-	100	560	1000	560
• posture des pattes	1800	-	1000	-	1800	320	-	100	560	1000	560
• démarche chancelante	1800	-	-	-	-	1800	-	560	1000	1000	-
• réflexe de redressement	-	-	560	-	-	-	-	1000	560	1000	-

Tonus musculaire

• tonus des membres	1000	1000	1000	-	1800	560	320	320	1000	560	-
• force d'agrippement	-	-	-	-	-	320	-	1000	1000	1000	-
• fléchissement du corps	1800	560	1000	-	1800	320	320	100	560	560	3200
• tonus du corps	100	320	100	-	560	100	56	100	100	32	320
• tonus de l'abdomen	1000	1000	560	-	1000	100	320	320	320	560	1000

Réflexes

• oreilles	1000	-	-	-	-	100	56	1000	1000	1000	-
• cornée	-	-	1000	-	-	560	-	-	1000	3200	-
• flexeur ipsilatéral	-	-	-	-	-	320	-	-	1000	1800	-
• grattage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• contorsions	320	-	-	-	-	560	-	56	-	-	320
• réflexe de redressement	-	-	560	-	-	-	-	1000	560	1000	-

PROFIL TOXICITE DU SNA

Yeux

• opacité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• diamètre de la pupille	1800	-	-	1800	-	-	320	-	-	1000	-
• ouverture palpébrale	-	-	1000	-	-	560	56	560	1000	320	-
• exophtalmie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sécrétion

• salivation	-	-	-	-	1800	-	-	-	-	-	-
• larmoiement	-	-	-	-	-	1800	-	-	-	-	-

Tableau 8 (suite): Test d'Irwin complet (paramètres en $\mu\text{mol/kg}$).

n°	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	Indapamide
----	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	------------

Excrétion

• diarrhée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• miction après 2h	-	-	-	-	-	-	-	-	32*	-	-

Général

• piloérection	320	-	320	320	1800	100	-	100	-	-	320
• température	1000	-	1000	1800	1800	1800	-	1000	320	560	-
• cyanose	-	-	1000	560	-	320	-	-	-	-	-
• rougeur	-	-	-	-	-	-	100	-	-	1000	1800
• paleur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• fréquence respiratoire	560	1800	560	1800	1000	320	100	100	-	560	1800

* miction après 1 heure

Tableau 8 (suite): Test d'Irwin complet (paramètres en $\mu\text{mol/kg}$).

n°	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	Indapamide
----	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	------------

Aucune activité	32	32	32	32	320	10	32	32	10	10	32
Hypoactivité	320	320	560	1800	1800	100	100	100	100	320	560
Hypotonicité	1800	1000	1000	-	1800	560	320	320	1000	560	-
Début de sédation	320	560	560	-	1000	100	100	100	320	320	560
Inhibition de réflexe de redressement	-	-	-	-	-	-	-	-	3200	1800	-
Début de stimulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Irritation de SNC	-	-	1000	-	-	1800	-	-	1000	-	-
Convulsions	-	-	1000	-	-	-	-	-	1000	-	-
Dose létale	>1800	>1800	1800	1800	>1800	>1800	-	>1000	>3200	3200	>3200

Tableau 9 : Test d'Irwin réduit (paramètres en $\mu\text{mol/kg}$).

II - Mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL.

II -1- But et principe.

L'oxydation des LDL peut être induite soit par un milieu cellulaire (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses), soit par incubation avec du CuSO_4 . C'est cette dernière méthode, identique au test mis au point pour l'indapamide décrit précédemment (page 34), que nous avons gardée.

Pour ce faire, les LDL sont isolées à partir du sang d'un volontaire sain. L'oxydation des LDL est induite par les ions Cu^{2+} : le mécanisme proposé (figure 101) fait intervenir une réaction catalatique (analogue au mécanisme d'action de la catalase sur l'eau oxygénée (Sigel et coll., 1969) : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$) sur des hydroperoxydes de LDL préformés dans l'échantillon. Cu^{2+} est réduit catalatiquement en Cu^+ qui, par réaction avec les hydroperoxydes, peut former des espèces activées de l'oxygène. Ces dernières réagissent avec les LDL et la peroxydation des lipides des LDL est ainsi amorcée. D'autre part, le radical peroxy formé lors de la réaction catalatique peut également initier l'oxydation des LDL (Thomas, Jackson, 1990).

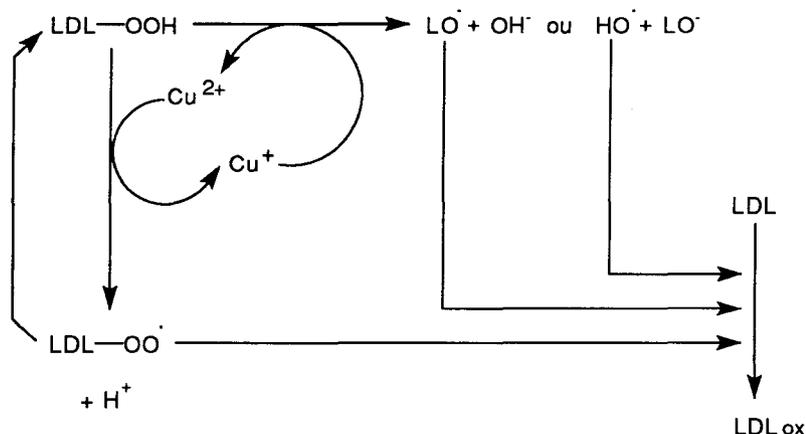


Figure 101 : Mécanisme proposé pour l'oxydation des LDL par Cu^{2+} .

L'évolution de l'oxydation peut être mesurée quantitativement par différentes méthodes : test à l'acide thiobarbiturique (absorbance en UV à 532 nm), mesure de la perte en acides gras polyinsaturés par analyse des acides gras en HPLC ou en GLC (Gutteridge, Halliwell, 1990).

Pour notre part, nous avons gardé le suivi utilisé pour l'inhibition de l'oxydation des LDL par l'indapamide (page 34), à savoir l'analyse par UV des variations d'absorbance à 234 nm caractéristiques des liaisons éthyléniques et dues à la formation d'hydroperoxydes conjugués des acides gras. Cette méthode permet de déterminer les activités des antioxydants d'une façon quantitative et

reproductible. Nous avons ainsi déterminé la capacité des cinq molécules synthétisées à inhiber l'oxydation des LDL, et l'avons comparée à celle de l'indapamide et du probucol pris comme références.

II -2- Description des résultats.

Seuls les composés 1, 2, 3, 4 et 5 ont subi ce test d'inhibition de l'oxydation des LDL, ce qui nous a permis de valider notre hypothèse : ces molécules sont bien des antioxydants et sont actifs dans l'inhibition de l'oxydation des LDL.

Toutefois, aucun produit faisant référence à ce principe d'inhibition de l'oxydation des LDL n'a montré son efficacité à ce jour. De plus, il n'existe pas de modèle pharmacologique permettant de tester de tels produits et la recherche d'un tel modèle représente un trop grand investissement pour l'industrie pharmaceutique. Le principe de l'inhibition de l'oxydation des LDL a donc été vérifié sur 5 composés mais a été estimé insuffisant pour justifier le développement d'une molécule sur cette seule base.

II-2-1- Détermination du temps d'incubation pour obtenir l'oxydation maximale.

La mesure en continu de la formation de diènes conjugués durant l'oxydation des LDL permet de distinguer trois phases (figure 102) (Esterbauer et coll., 1989). La première phase, durant laquelle il n'y a pas ou très peu de diènes conjugués, correspond à une phase de latence due aux antioxydants endogènes qui protègent la cellule contre la peroxydation lipidique. La deuxième phase, qui apparaît une fois que tous les antioxydants endogènes ont été consommés, est la phase de propagation : la quantité de diènes conjugués augmente très rapidement. La troisième phase, durant laquelle on observe une diminution des diènes conjugués dans le milieu, est la phase de décomposition des LDL oxydées.

Afin de connaître le temps d'incubation permettant d'avoir une oxydation maximale, il est nécessaire de déterminer, pour un donneur considéré, ces trois phases : en effet, la durée de ces différentes phases varie en fonction de la personne et en fonction de l'âge de l'échantillon. Les résultats obtenus sont décrits figure 103.

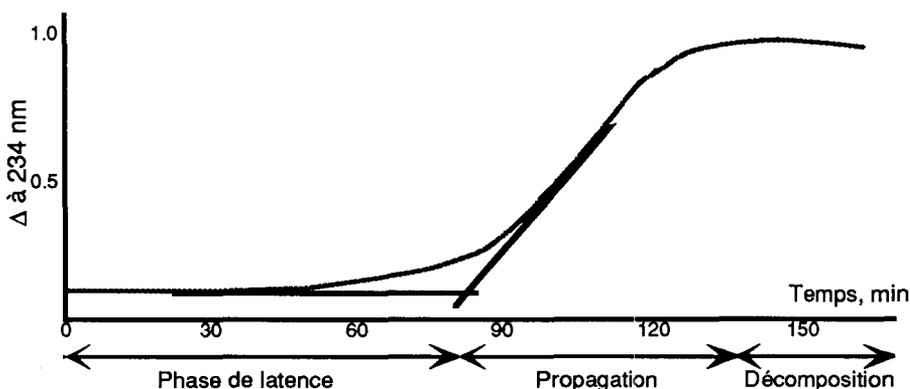


Figure 102 : Cinétique d'oxydation des LDL à 234 nm.

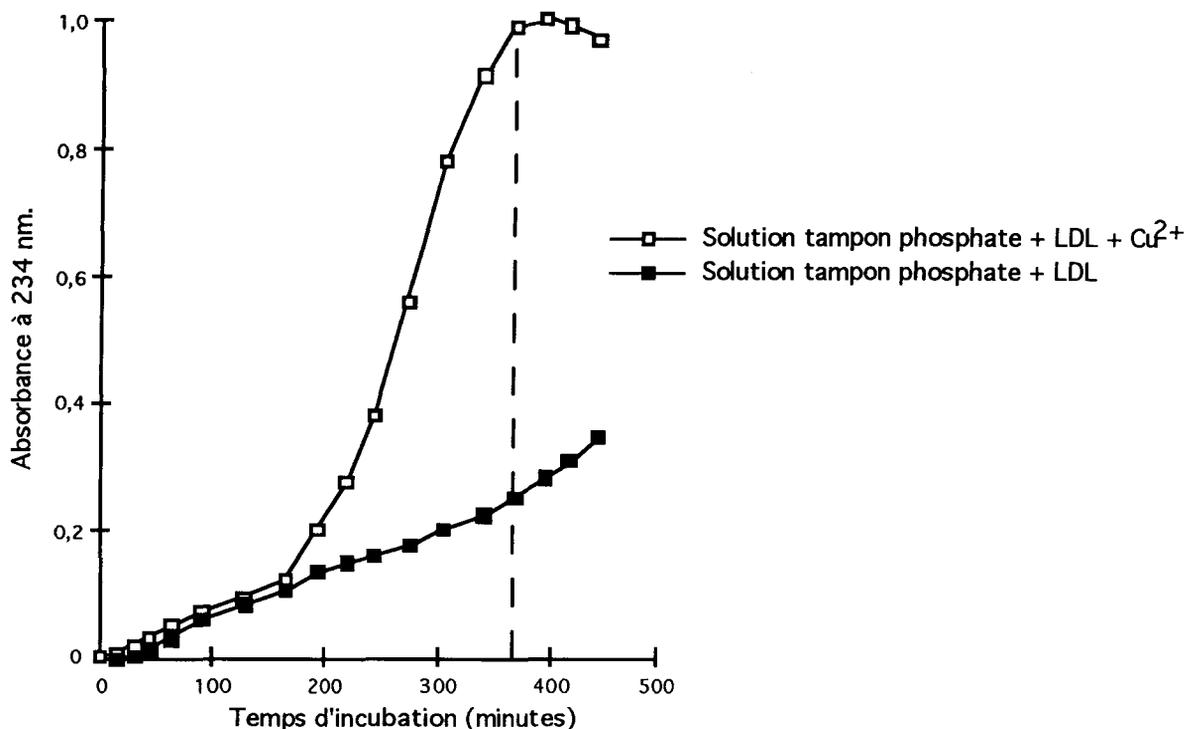


Figure 103 : Détermination du temps d'incubation permettant d'avoir une oxydation maximale.

II -2-2- Mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL à des concentrations variables en produit à tester.

C'est après 380 minutes d'incubation que les mesures d'inhibition d'oxydation des LDL à des concentrations variables en produit ont été effectuées. Les résultats obtenus (figure 104) montrent que les cinq produits étudiés sont des antioxydants plus actifs que le probucol mais moins actifs que l'indapamide sur l'inhibition de l'oxydation des LDL. Notons toutefois que 5 a une activité très proche de celle de l'indapamide.

Jusqu'à environ une concentration de 3 μM , l'oxydation des LDL est inhibée par tous les produits testés. Au delà de cette concentration, il y a toujours inhibition de l'oxydation des LDL, mais les absorbances des produits testés ne sont plus négligeables et faussent les résultats.

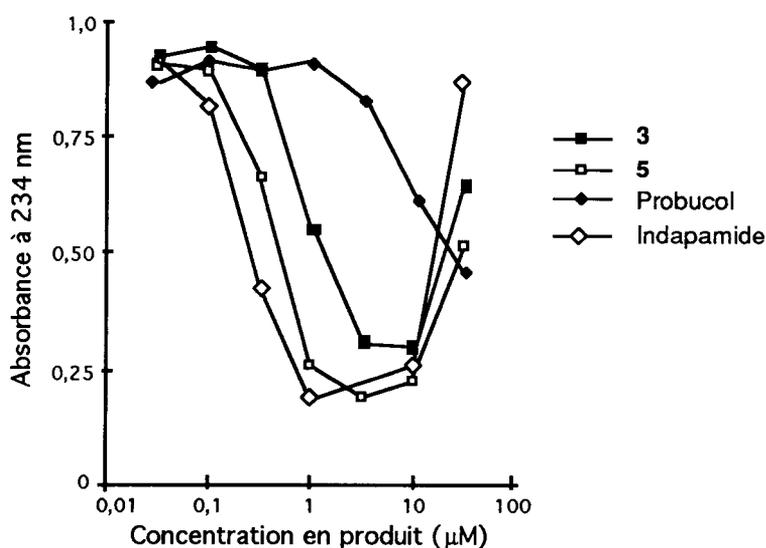
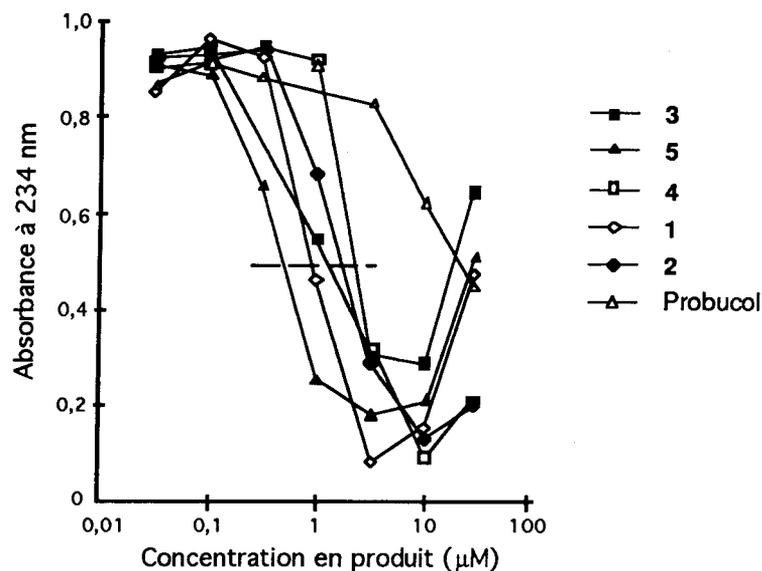
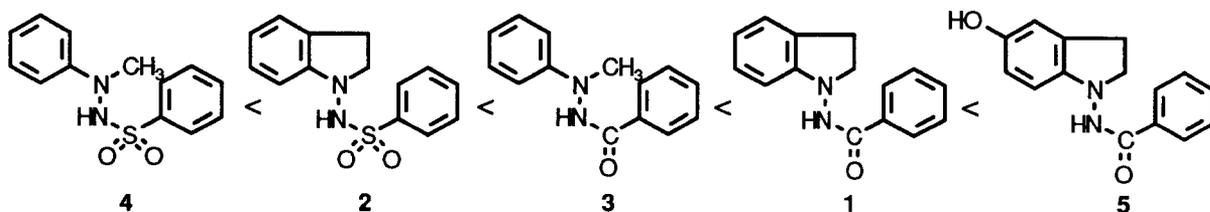


Figure 104 : Mesure de l'oxydation des LDL à des concentrations variables en produit à un temps donné.

D'après cette étude, les activités des produits à un temps donné (380 mn) et à une concentration donnée (1 μmol) peuvent être classées comme suit :

Probuco = 4 < 2 < 3 < 1 < 5 < Indapamide



II -2-3- Etude cinétique de l'oxydation des LDL pour une concentration en produit donnée.

En fonction des résultats obtenus préalablement (figure 104), la concentration choisie pour cette étude cinétique est de 1 μ M de façon à ne pas fausser les mesures par l'absorbance des produits testés. Les mesures effectuées en fonction du temps (figure 105) montrent que, comme dans le cas de l'indapamide, les produits 1, 2, 3, 4 et 5 provoquent une prolongation de la phase de latence.

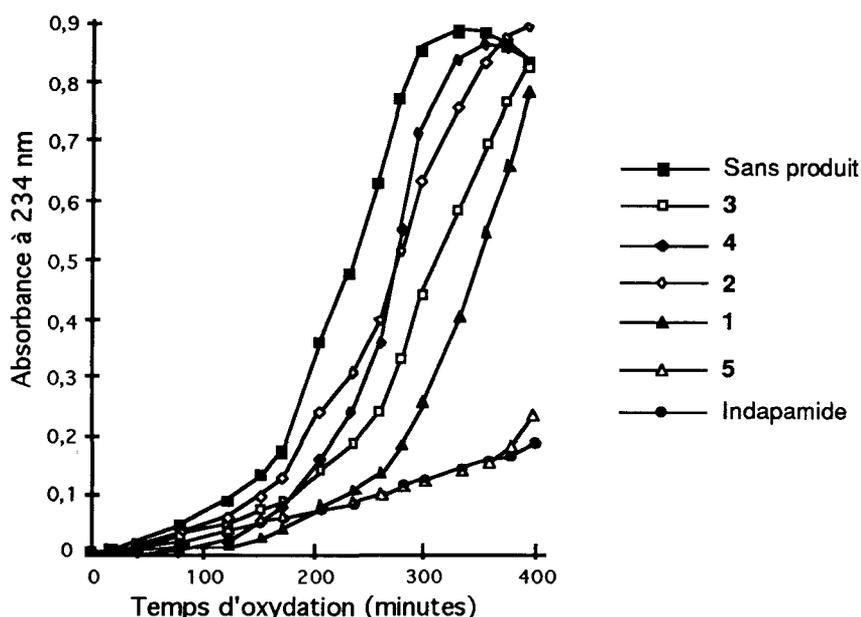
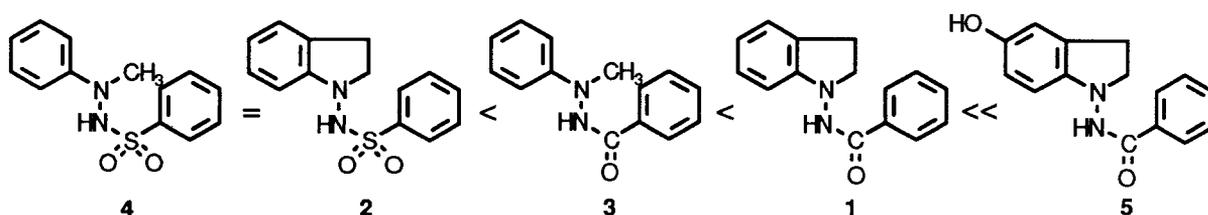


Figure 105 : Mesure de l'oxydation des LDL au cours du temps pour une concentration donnée en produit (1 μ M).

Selon cette étude, les composés peuvent être classés par activité croissante comme suit :

$$4 = 2 < 3 < 1 \ll 5 = \text{Indapamide}$$



Ces études nous apportent plusieurs renseignements relatifs à la pharmacomodulation effectuée :

- Les cinq produits testés sont tous des antioxydants qui inhibent *in vitro* l'oxydation des LDL induite par Cu^{2+} . Leurs activités sont comprises entre celle du probucol et celle de

l'indapamide.

- Le remplacement de -CO- par son bioisostère -SO₂- provoque une diminution de l'activité des produits vis-à-vis de l'oxydation des LDL.
- Les produits de structure indolinique (1 et 2) sont plus actifs que leurs analogues ouverts (3 et 4).
- Le comportement des composés 1 et 2 montre une bonne activité antioxydante bien que moins importante que celle de l'indapamide. La possible stabilisation captodative pour le radical semble donc augmentée dans le cas de l'indapamide (figure 23 p.36) par la présence de substituants (Cl, SO₂NH₂) sur le noyau phényle.
- L'apport d'un groupement hydroxyle en position 5 sur le noyau indolinique de 1, conduisant au composé 5, permet d'augmenter l'activité : 5 a une activité très proche de celle de l'indapamide ; le caractère antioxydant dû au OH aromatique s'ajoute donc à celui attribuable au caractère captodatif de son analogue non hydroxylé.

III - Evaluation de l'effet de substances sur l'activation, la prolifération et la survie de cellules musculaires lisses d'aorte de rat en culture.

III -1- But et principe.

Ce test a été réalisé dans le cadre de la recherche de substances prévenant la resténose, mais susceptibles également de retarder la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires intervenant dans les processus athérosclérotiques tardifs. Les substances de référence sont le MDHC et le picéatannol, des inhibiteurs de tyrosine-kinase.

Ce test consiste à mesurer différents effets sur les cellules musculaires lisses d'aorte de rat adulte, à savoir :

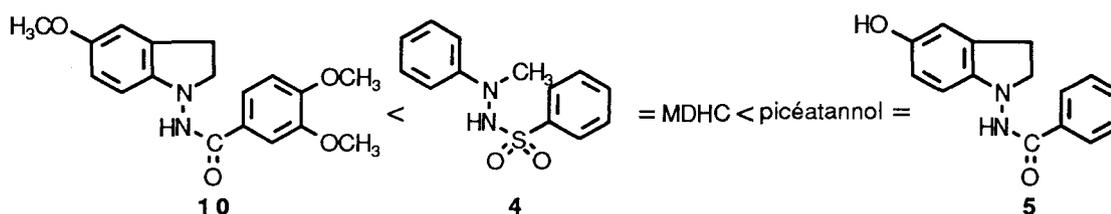
- l'effet des substances-test sur l'activation des cellules musculaires lisses par des facteurs de croissance : les cellules en culture confluentes à ± 80 % sont mises en état de repos par déprivation de sérum. Elles sont ensuite activées par le PDGF en présence de différentes concentrations (1 à 100 μ M) des substances-test. L'activation des cellules est déterminée 24 heures plus tard par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (Boscoboinik et coll., 1991).
- l'effet cytotoxique des substances-test : différentes concentrations (10 à 1000 μ M) des substances-test sont ajoutées à des cultures de cellules musculaires lisses à ± 80 % de confluence. La viabilité des cellules est mesurée 24 heures plus tard par la méthode au MTT (bromure de diméthylthiazolyltétrazolium - mesure spectrophotométrique de formazan produit) (Carmichael et coll., 1987).
- l'effet des substances-test sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires induite par du sérum de veau fœtal 10 % (v/v) : ces cellules sont mises en culture pendant 5

jours en présence de différentes concentrations (1 à 100 μM) des substances-test. La prolifération des cellules est alors déterminée par la méthode au MTT (Carmichael et coll., 1987).

III -2- Résultats.

Trois des composés testés inhibent l'activation des cellules musculaires lisses induite par le PDGF : **4**, **5** et **10**, dont les IC_{50} sont respectivement de 30, 11 et 70 μM (tableau 10). Le composé **10** est moins actif que les deux substances de référence. L'activité de **4** est comparable à celle du MDHC et inférieure à celle du picéatannol. Parmi les molécules que nous avons synthétisées, **5** est la plus active ; son activité est comparable à celle du picéatannol. Les autres substances ont une tendance à inhiber cette activation à la concentration de 100 μM . Les molécules **3** et **9** ne montrent aucun effet à cette concentration élevée. Le composé **15** n'a pas pu être testé du fait de sa faible solubilité.

Les substances les plus intéressantes peuvent être classées de la façon suivante :



Les composés **5** et **6** s'avèrent toxiques pour les cellules respectivement à des concentrations de 200 et 600 μM . Les autres substances montrent une faible toxicité à 1000 μM . En ce qui concerne le picéatannol, on observe à la concentration de 32 μM la mort de 35 % des cellules. Nos molécules paraissent donc moins cytotoxiques.

La molécule **5** inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses induite par le sérum à la concentration de 40 μM et est moins active dans ce test que le picéatannol (14 μM). Pour les autres composés, on observe une légère inhibition de cette prolifération à la concentration de 100 μM .

En ce qui concerne le rapport cytotoxicité/PDGF, le composé **5** donne les meilleurs résultats : ce rapport est de 18. Pour les autres molécules synthétisées, ce rapport est d'une façon générale moins bon puisque inférieur à 10. Dans le cas du picéatannol, nous savons seulement que ce rapport est supérieur à 2 ; nous ne pouvons donc pas effectuer de comparaison.

Substance testée	PDGF	Cytotox.	Prolif.	Cytotox./PDGF
picéatannol	15	> 32	14	> 2
MDHC	22	nd	nd	nd
1	> 100	> 1000	> 100	< 10
3	# 100	> 1000	> 100	< 10
4	30	nd	nd	nd
5	11	200	40	18
6	> 100	600	> 100	< 6
7	>100	nd	nd	nd
9	# 100	> 1000	> 100	< 10
10	70	Interférence avec MTT		nd
11	# 100	> 1000	> 100	nd
12	> 100	Interférence avec MTT		nd
13	> 100	> 1000	> 100	< 10
15	non testé	non testé	non testé	non testé

Tableau 10 : Effet des substances-test sur l'activation et la prolifération des cellules musculaires lisses d'aorte de rat adulte (n=1) (PDGF : effet sur l'activation des cellules par le PDGF, IC₅₀ en μ M (> : tendance à inhiber ; # : inactif jusqu'à la concentration indiquée) ; Cytotox. : effet sur la survie des cellules sans addition de PDGF, IC₅₀ en μ M ; Prolif. : effet sur la prolifération des cellules sans addition de PDGF, IC₅₀ en μ M ; nd : non déterminé).

Les résultats obtenus dans l'inhibition de l'activation induite par le PDGF des cellules musculaires lisses nous permettent d'émettre quelques observations quant aux pharmacomodulations effectuées.

- Le composé **4** a une activité comparable à celle du MDHC. Par contre, les produits **6** et **7**, dont le groupement benzènesulfonyle est substitué en *para* par une fonction carboxylique, ont seulement une tendance à inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses à la concentration de 100 μ M. On en déduit que l'apport de ce groupement acide provoque une diminution de l'activité des composés.

D'autre part, le composé **3**, analogue benzoylé de **4**, n'est pas du tout actif à la concentration de 100 μ M. Le remplacement de -SO₂- par son bioisostère -CO- provoque une diminution très nette de l'activité des produits vis-à-vis de l'inhibition de l'activation des cellules musculaires lisses induites par le PDGF.

- Le composé **10** est moins actif que le MDHC et que **4**. Si on compare son activité à celle du composé **12**, dont le groupement benzoyle n'est pas substitué par deux groupements méthoxy vicinaux, on en déduit que la structure éther de catéchol est responsable de cette activité.

- Parmi les composés synthétisés, la molécule **5**, substituée en position 5 de l'indoline par un groupement -OH, est la plus active. Son activité est supérieure à celle du composé **1** (non substitué) ainsi qu'à celle du composé **12** (dans lequel -OH a été remplacé par -OCH₃). L'apport d'un groupement hydroxyle en position 5 de l'indoline permet donc d'augmenter sensiblement l'activité des composés benzoylés. Il se peut qu'il y ait formation d'une liaison hydrogène entre le OH et un résidu du site actif du récepteur auquel la molécule **5** se lie.

IV - Evaluation de l'effet de substances sur la prolifération de cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.

IV- 1- But et principe.

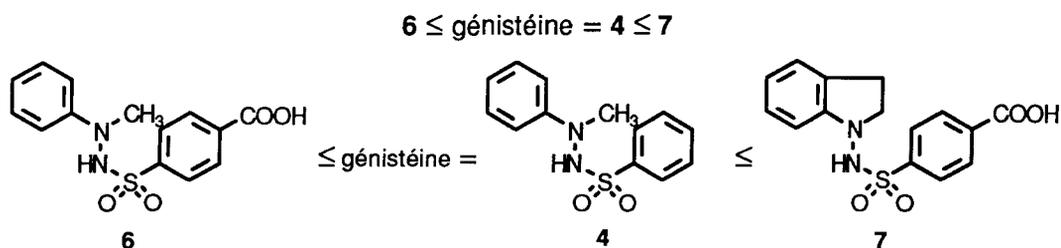
Ce test a été réalisé afin de déterminer l'activité des molécules synthétisées sur la prolifération des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye induite par le sérum de veau foetal 3 %. L'effet des substances testées est comparée à celui de la génistéine, un inhibiteur de tyrosine-kinase.

Deux techniques ont été utilisées : le comptage cellulaire et la méthode au MTT. Cette dernière méthode permet d'apprécier indirectement la prolifération cellulaire par la mesure de l'activité succinyl déshydrogénase mitochondriale qui clive un sel de tétrazonium jaune, le MTT, en un dérivé formazan coloré en bleu ; la formation de ces cristaux bleus insolubles dans l'eau peut être suivie par spectrophotométrie (méthode adaptée de Hirst et coll., 1992).

IV -2- Résultats.

Trois composés ont montré une activité sur la prolifération des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye : **4**, **6** et **7** (tableau 11). A la concentration de 100 µM, la méthode au MTT nous indique qu'après 24 heures de traitement avec la génistéine et les composés **4** et **6**, l'augmentation de la formation du dérivé formazan représente respectivement 15, 52 et 29 % de la réponse témoin. Par contre, cette méthode nous indique qu'avec le composé **7**, cette augmentation atteint 144 % de celle des cellules témoin. Avec les autres composés, nous n'observons pas de grande différence avec la réponse témoin. Le composé **15** n'a pu être testé qu'à 10 µM du fait de sa faible solubilité.

Les IC₅₀ de la génistéine et des composés **4**, **6** et **7** ont été déterminées par comptage cellulaire (tableau 11), ce qui permet de classer ces substances comme suit :



Les résultats quantitativement différents, voire contradictoires pour le composé **7**, entre ces deux tests pourraient éventuellement provenir d'une modification de l'activité succinyl déshydrogénase mitochondriale par les agents. Cela montre les limites du test MTT, surtout intéressant pour réaliser un "screening" des molécules.

La viabilité des cellules traitées avec les différents agents à 10 μM n'est pas différente de celle des cellules témoin (99 %). Elle est respectivement de 94, 54, 90 et 74 % pour les cellules traitées avec **6**, la génistéine, **4** et **7** à la concentration de 100 μM . Les composés que nous avons synthétisés sont donc moins cytotoxiques que la génistéine.

Substance testée	Métabolisation du MTT en présence des substances-test à 100 μM (en pourcentage de la réponse témoin) (n=3)	IC ₅₀ (μM) (déterminée par comptage cellulaire) (n=2)	Viabilité des cellules traitées avec les substances à la concentration de 10 μM	Viabilité des cellules traitées avec les substances à la concentration de 100 μM
génistéine	15 %	10	99 %	54 %
1	87 %	nd	nd	nd
3	93 %	nd	nd	nd
4	52 %	9,8	99 %	90 %
5	93 %	nd	nd	nd
6	29 %	28	99 %	94 %
7	144 %	7	99 %	74 %
9	91 %	nd	nd	nd
10	nd	inactif à 100 μM	nd	nd
11	103 %	nd	nd	nd
12	nd	inactif à 100 μM	nd	nd
13	nd	inactif à 100 μM	nd	nd
15	102 % *	nd	nd	nd

Tableau 11 : Evaluation de l'effet des substances testées sur la prolifération des cellules musculaires lisses de trachée de cobaye à l'aide du test MTT et/ou du comptage cellulaire (* : réponse à 10 μM car insoluble à 100 μM ; nd : non déterminé).

Cette étude nous apporte plusieurs renseignements sur la pharmacomodulation effectuée :

- Seuls les produits ayant un groupement benzènesulfonyle sont actifs dans l'inhibition de l'oxydation de la prolifération des cellules musculaires lisses de trachée de cobaye. Le remplacement de $-SO_2-$ par son bioisostère $-CO-$ provoque la perte de l'activité.
- La substitution en *para* du benzènesulfonyle par le groupement $-COOH$ provoque une diminution de l'activité (composés **6** et **4**).
- Le composé **7** de structure indolinique est plus actif que son analogue ouvert **6**.

V - Inhibition de la 5-lipoxygénase.

V -1- But et principe.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de diverses substances sur la génération d'un produit de la 5-LO, le 5-HETE.

Pour cela, les basophiles de rat (cellules RBL-1) sont stimulés *in vitro* par l'ionophore calcique A23187 et incubés en présence d'acide arachidonique. L'activité 5-lipoxygénase est mise en évidence par la conversion d'acide arachidonique en 5-HETE. La quantité de 5-HETE formé est mesurée en HPLC (McColl et coll., 1986 ; Bennet et coll., 1993).

L'effet des substances testées est comparé à celui du NDGA (acide nordihydroguaiarétique) (Carter et coll., 1991) à la concentration de 0,5 μM .

V -2- Résultats.

A la concentration de 10 μM , deux molécules s'avèrent actives avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % (tableau 12) : **5** (80 %) et **9** (83 %). Le composé **15**, du fait de sa faible solubilité, n'a pas pu être testé à 10 μM ; à la concentration de 1 μM , son pourcentage d'inhibition est de 57 %. Toutefois, ces composés sont beaucoup moins actifs que le NDGA dont le pourcentage d'inhibition de la 5-LO à la concentration de 0,5 μM est d'environ 70 %.

D'autre part, certains résultats obtenus n'ont aucune signification car la marge d'erreur est trop grande (cas des composés **1**, **11** et **12**). Ces composés semblent cependant être inactifs.

Les renseignements relatifs à la pharmacomodulation effectuée apportés par ce test sont les suivants :

- Lorsqu'on compare les composés **1** et **5**, on déduit que l'apport d'un groupement OH en position 5 de l'indoline augmente l'activité. D'autre part, il semble que ce groupement OH ait un rôle dans la liaison de **5** au site actif de la 5-LO puisque le dérivé **12**, dans lequel OH est remplacé par OCH_3 , est inactif. Il se peut que dans le cas de **5**, il y ait formation d'une liaison

hydrogène entre le OH et un résidu du site actif de la 5-LO.

- Le composé **9**, qui est substitué par une chaîne latérale $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ de configuration *E* sur le noyau benzoyle, est plus actif que son analogue non substitué **1**. Cette chaîne est donc importante pour la liaison de **9** au récepteur. Par contre, la substitution du groupement benzoyle par la chaîne $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ de configuration *Z* (composé **13**), envisagée dans l'optique d'obtenir un faux substrat de l'acide arachidonique, n'a apporté aucune amélioration.
- Le composé **15**, qui comporte la chaîne latérale $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CONHC}_{10}\text{H}_{21}$, est beaucoup plus actif que l'acide **13** correspondant. Le groupement amide $-\text{CONHC}_{10}\text{H}_{21}$ semble donc favoriser l'inhibition de la 5-LO.

Substance testée	% d'inhibition (10 μM)
NDGA*	73 \pm 8
1	15 \pm 13 n=3
3	28 \pm 3 n=3
4	53 \pm 19 n=4
5	80 \pm 8 n=4
6	30 \pm 19 n=4
7	21 \pm 5 n=2
9	83 \pm 35 n=4
10	36 \pm 13 n=3
11	22 \pm 16 n=4
12	20 \pm 18 n=4
13	18 \pm 9 n=3
15**	57 \pm 8,5 n=2

Tableau 12 : Mesure de l'inhibition de la 5-LO (* testé à 0,5 μM ; ** testé à 1 μM)

VI - Pourcentages d'inhibition de liaison spécifique obtenus avec les composés 13 et 15 testés sur les récepteurs LTB₄ et LTD₄.

VI -1- But et principe.

Le but de ces études est d'évaluer la capacité des composés **13** et **15** à se lier aux récepteurs LTB₄ et LTD₄.

Les cellules U937 sont incubées avec du [³H]LTB₄ (Winkler et coll., 1988) ou du [³H]LTD₄ (Frey et coll., 1993) en présence ou non des substances à tester. Après traitement et transfert du matériel ainsi obtenu dans des fioles contenant un liquide scintillant, la radioactivité fixée par les cellules est déterminée avec un compteur à scintillation liquide (LS 6000, Beckman)

VI -2- Résultats.

Les composés **13** et **15** se lient très peu ou pas du tout aux récepteurs LTB₄ et LTD₄ à des concentrations très supérieures aux IC₅₀ obtenues avec les molécules de référence (tableau 13). La pharmacomodulation effectuée sur le composé **15** pour obtenir un antagoniste du LTD₄ n'a pas donné de résultat.

Récepteur	13 10 µM	15 1 µM	molécule de référence
LTB ₄	12	29	LTB ₄ IC ₅₀ =0,69 nM
LTD ₄	-	-	LTD ₄ IC ₅₀ =4,8 nM

Tableau 13 : Pourcentages d'inhibition de liaison spécifique obtenus avec les composés **13** et **15** testés sur les récepteurs LTB₄ et LTD₄ (- : inhibition inférieure à 10 %).

VII - Inhibition de la PDE IV par le composé 10.

VII -1- But et principe.

Le but de cette étude est d'évaluer la capacité du composé **10** à inhiber la PDE IV. Pour cela, les cellules U937 sont incubées avec du [³H]cAMP. Le [³H]5'-cAMP formé est ensuite converti en [³H]adénosine par incubation avec une 5'-nucléotidase. La radioactivité de l'adénosine est ensuite déterminée avec un compteur à scintillation liquide après addition de liquide scintillant (Kono, 1988 ; Ong, Rennie, 1976).

La molécule de référence utilisée est le Rolipram.

VII -2- Résultats.

Comme nous le voyons dans le tableau 14, le composé **10** a une IC₅₀ de 32,7 µM. Il est beaucoup moins actif que le Rolipram qui, à la concentration de 0,1 µM, a un pourcentage d'inhibition de 43 %.

Substance testée	Activité
10	IC ₅₀ = 32,7 µM (Intervalle de confiance à 95 % : ± 10,6 µM)
Rolipram	Inhibition à 0,1 µM : 43 %

Tableau 14 : Comparaison des activités du composé **10** et du Rolipram dans l'inhibition de la PDE IV (n=1).

CONCLUSION

Parmi les molécules que nous avons synthétisées, quelques-unes se démarquent de par leur activité selon le test envisagé :

- Inhibition de l'oxydation des LDL.

Parmi les cinq molécules testées, la plus intéressante est la molécule **5** (figure 106) caractérisée par un noyau indolinique portant un groupement hydroxyle en position 5 et par un groupement hydrazide.

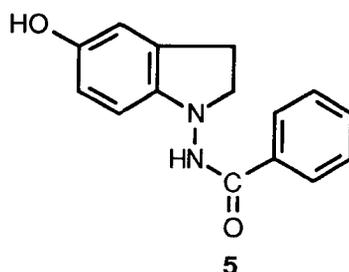


Figure 106.

- Inhibition de la 5-LO.

Deux molécules se détachent : **5** et **9** (figure 107). Le composé **9** possède un noyau indolinique et un groupement hydrazide dont le noyau phényle est substitué en *para* par la chaîne éthylénique -CH=CH-COOH de configuration *E*.

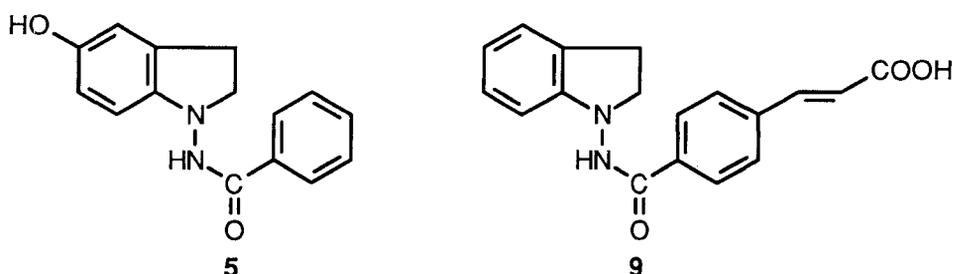


Figure 107.

Il serait maintenant intéressant de synthétiser un composé associant les caractéristiques de ces deux composés (figure 108) et d'évaluer son activité dans l'inhibition de la 5-LO.

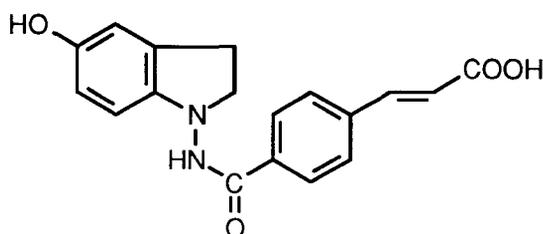


Figure 108.

• Evaluation de l'effet de substances sur l'activation (par le PDGF), la prolifération et la survie de cellules musculaires lisses d'aorte de rat.

Dans ce cas, les trois composés les plus actifs sont **4**, **5** et **10** (figure 109).

La molécule **5** (la plus active) est caractérisée par un noyau indolinique portant un groupement hydroxyle en position 5 et par un groupement hydrazide.

4 a été conçu à partir des composés indoliniques en utilisant la théorie des cycles potentiels. Il possède un noyau hydrazinique et un groupement benzènesulfonylamide.

Le composé **10** est caractérisé par une structure indolinique, un groupement hydrazide et une structure éther de catéchol. Cette molécule est, de plus, active (faiblement) dans l'inhibition de la PDE IV. Sa capacité à inhiber l'activation par le PGDF des cellules musculaires lisses peut être associée d'une part à une inhibition de l'activité PTK et d'autre part à son activité sur la PDE IV : en effet, les inhibiteurs de la PDE IV inhibent, en général à des concentrations assez élevées, la prolifération des cellules musculaires lisses induites par les facteurs de croissance.

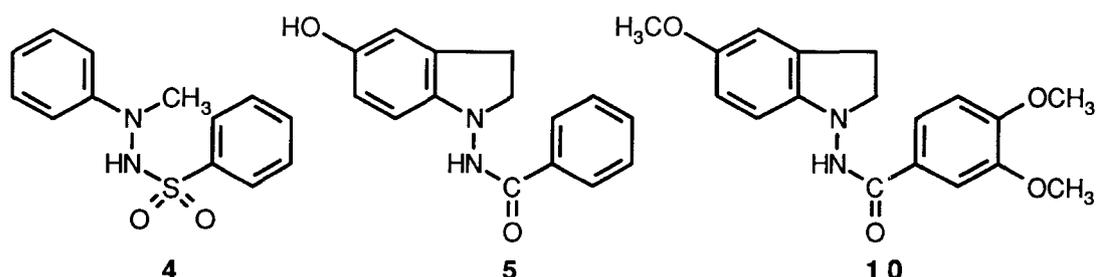


Figure 109.

Des molécules possédant un groupement hydroxyle en bonne position, un groupement benzènesulfonylamide et une structure éther de catéchol (figure 110) pourraient être encore plus actives.

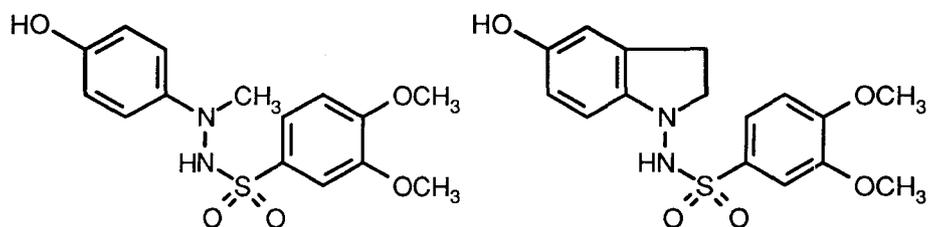


Figure 110.

• Evaluation de l'effet de substances sur la prolifération de cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.

Les composés les plus actifs dans ce test sont **4** et **7** (figure 111). Le composé **7** a une structure indolinique, un groupement benzènesulfonylamide dont le noyau phényle est substitué en para par un groupement -COOH.

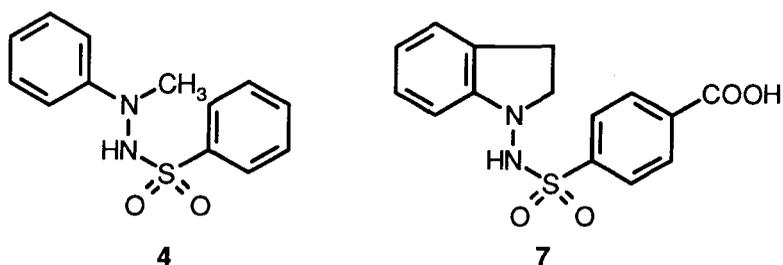


Figure 111.

Lorsqu'on compare les résultats obtenus dans ces deux derniers tests, on remarque que les composés **5** et **10** ont une bonne activité dans le cas des cellules musculaires lisses d'aorte de rat activées par le PDGF, alors qu'elle est nulle dans le cas des cellules musculaires lisses de trachée de cobaye activées par le sérum de veau. La structure éther de catéchol et le groupement hydroxyle en position 5 de l'indoline semblent importants pour l'interaction de ces composés avec le récepteur à activité tyrosine-kinase du PDGF des cellules musculaires d'aorte de rat.

Par contre, les composés **6** (figure 112) et **7** montrent une activité dans le cas des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye, alors qu'ils sont inactifs dans le cas des cellules musculaires lisses de l'aorte de rat adulte. On peut penser que ces structures comportant un groupement -COOH n'interagissent pas avec le récepteur à activité PTK du PDGF alors qu'ils interagissent avec l'un des récepteurs impliqués dans l'activation des cellules par le sérum de veau fœtal.

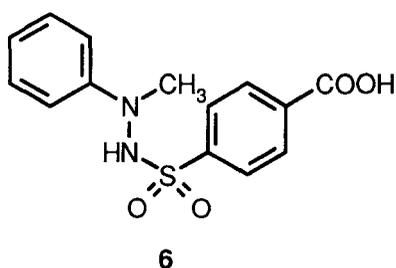


Figure 112.

Il serait maintenant intéressant de substituer ces composés par un groupement -NO₂ en bonne position (figure 113) pour obtenir des dérivés nitrés se rapprochant de la structure des sulfonilbenzoylnitrostyrènes (développés par Traxler), inhibiteurs "multisubstrats" de l'activité tyrosine kinase.

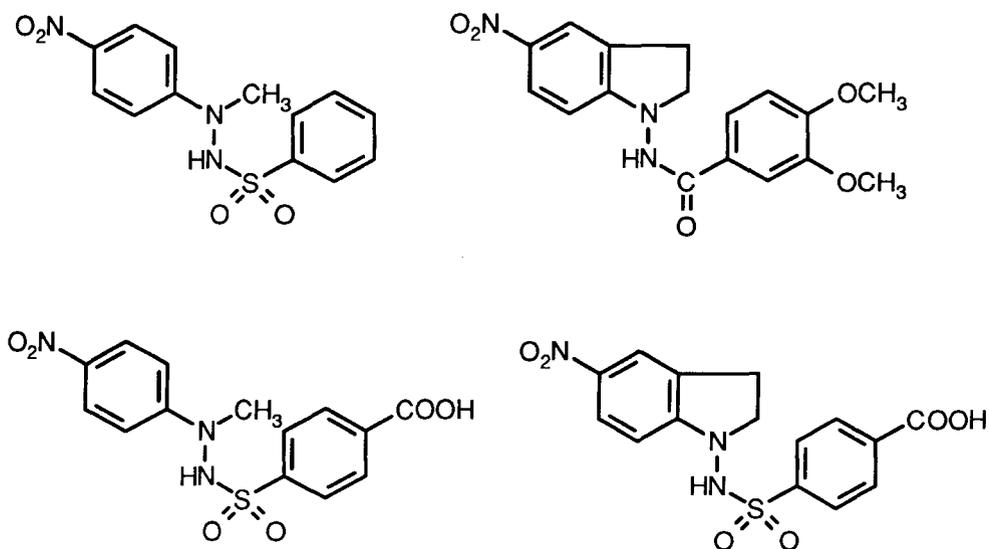


Figure 113.

Plus généralement, on remarque que les composés les plus actifs dans l'inhibition de mécanismes mettant en jeu des processus radicalaires et oxydatifs sont les composés ayant un groupement hydrazide.

Par contre, si on ne tient pas compte des composés **5** et **10** (ayant tous les deux des caractéristiques bien particulières), les molécules actives dans l'inhibition de l'activation des cellules musculaires lisses par un mitogène sont caractérisées par un groupement benzènesulfonamide.

Bien que les molécules synthétisées ne montrent pas une activité exceptionnelle dans les quatre tests principaux que nous venons de citer, certaines d'entre elles peuvent donc être le point de départ de nouvelles pharmacomodulations afin d'accéder à des composés plus actifs dans l'inhibition de la 5-LO ou dans l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses.

Suivant l'activité recherchée, certaines caractéristiques devront être conservées, à savoir :

- un caractère antioxydant et un groupement tétraénoïque pour des inhibiteurs de la 5-LO.
- une structure catéchol alkylée, un groupement hydroxyle en bonne position ou un groupement benzènesulfonamide substitué en bonne position par un -COOH dans le cas d'inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase.

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

I - Remarques générales.

La pureté des produits est vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince dans les conditions suivantes :

- * support : gel de silice 60 F 254 d'épaisseur 1,25 mm, référence 5735 Merck.
- * révélation : UV (254 et 366 nm), iode et ninhydrine.

Les points de fusion sont déterminés à l'aide d'un appareil de Tottoli (Büchi 510), ne sont pas corrigés et sont exprimés en °C (F = Fusion).

Les spectre IR sont réalisés sur un spectrographe Perkin-Elmer 1310, sous forme de film pour les liquides ou en dispersion pour les solides. Les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).

Les spectres de RMN ^1H sont enregistrés sur un appareil à transformée de Fourier Bruker WP 80 MHz, Bruker AM 250 MHz ou Bruker AC 300 MHz, avec le TMS pour référence interne. Chaque signal est repéré par son déplacement chimique δ (ppm), son intensité, sa multiplicité (s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : massif) et son éventuelle constante de couplage J exprimée en Hertz. Les spectres de RMN ^1H 2D (COSY et NOESY) sont enregistrés sur les appareils Bruker AM 250 MHz et Bruker AC 300 MHz.

Les spectres de masse en modes impact électronique et FAB sont réalisés sur un spectromètre quadripolaire Funnigan TSQ 700 (couplé à un système de contrôle DEC). Nous indiquons la position, l'attribution et l'intensité des fragments principaux .

Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été réalisées sous de faibles pressions (entre 1 et 3 bars) sur gel de silice 60 de granulométrie 0,040-0,063 mm (230-400 mesh ASTM), référence 9385.5000 Merck.

A **UCB**, les HPLC analytiques sont réalisées sur un appareil de marque Hewlett-Packard 1090 Liquid Chromatograph avec une colonne de type phase inverse (Licrospher 60 RP-select B C8 5 μm 250*4,6 mm) ; les produits sont détectés par balayage UV de 210 à 350 nm. A l'**ICPL**, elles sont réalisées sur un appareil Waters Delta Prep 4000 avec une colonne phase inverse à compression radiale (Novapak C8 4 μm 100*8 mm).

Dans les deux cas, l'élution est réalisée avec deux solutions : la solution A (H_2O : 80 %, Pic B8 5.10^{-3} M : 5 %, MeOH : 15 %) et la solution B (H_2O : 10 %, Pic B8 5.10^{-3} M : 5 %, MeOH : 85 %). En mode isocratique, nous indiquons entre parenthèses le pourcentage de A et de B. En mode gradient, on utilise la méthode GRAD50.M (t=0 : 85 % de A et 15 % de B ; t=10 min. : 15 % de A et 85 % de B ; t=20 min. : 15 % de A et 85 % de B).

Les HPLC chirales analytiques sont effectuées sur un appareil Hewlett-Packard 1050 équipé d'un détecteur à barrettes de diodes et d'un four Mistral à effet Peltier. La colonne Chiralpak AD Daicel (250*4,6 mm) est thermostatée à $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Le débit d'élution est de 1 ml/min.

Les HPLC chirales préparatives sont réalisées avec une colonne Chiralcel AD Daicel (500*100 mm). Cette colonne est thermostatée à 20°C par un bain thermostatique Julabo F18 VC. Cette installation est munie de pompes Lewa et d'un détecteur LKB Univord SII.

Le chloroforme et le dichlorométhane sont distillés et conservés sur CaCl_2 . L'acétate d'éthyle est distillé et conservé sur tamis moléculaire. Le THF de pureté 99,9 % est conservé sur potasse et sous atmosphère d'azote. La pyridine et la triéthylamine sont séchées sur potasse. L'éther est conservée sur sodium.

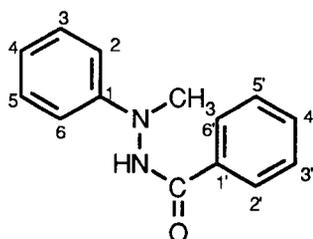
II - Protocoles chimiques.

Nous avons conservé, dans cette partie descriptive, l'ordre utilisé dans la partie "Stratégie de synthèse", à savoir :

- Préparation des composés ouverts **3**, **4**, **6** et **8**.
- Préparation des composés fermés non substitués par une chaîne éthylénique **1**, **2**, **11**, **7**, **10** et **12**.
- Synthèse des dérivés fermés substitués par une chaîne éthylénique **9**, **13** et **15**.

II -1- Préparation des composés ouverts 3, 4, 6 et 8.

N'-méthyl-N'-phényl-N-benzoyl hydrazine : 3.



A une solution de N-méthyl-N-phénylhydrazine **16** (1,0 g ; 8,2 mmol) dans le chloroforme (20 ml), on ajoute 0,69 g de bicarbonate de potassium (8,2 mmol). A cette suspension, refroidie à 0°C, est additionnée goutte à goutte une solution chloroformique (10 ml) de chlorure de benzoyle (0,96 ml ; 8,2 mmol). On laisse revenir à température ambiante, puis on maintient l'agitation pendant deux heures. Après évaporation à sec, le solide **3** obtenu est abondamment lavé à l'eau, séché puis recristallisé dans l'éthanol.

Rendement : 59 %.

R_f (CH₂Cl₂/Hexane) : 0,14.

F : 157-158°C.

IR : 3270 (NH) ; 1650 (CO-NH).

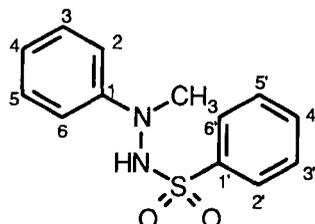
RMN ¹H (CDCl₃, 250) : 3,28 (3H, s, CH₃) ; 6,92 (3H, m, H_{2,4,6}) ; 7,24 (2H, d dédoublé, H_{3,5}) ; 7,44-7,52 (3H, m, H_{3',4',5'}) ; 7,82 (2H, d, H_{2',6'}, J=7,4) ; 7,92 (1H, s, NH).

Masse (IE) : m/z 226 (M^+ , 41) ; 121 ($M-C_6H_5CO$, 91) ; 105 (C_6H_5CO , 100).

Analyse : Calc. : C : 74,30 ; H : 6,23 ; N : 12,38.

Tr. : C : 74,02 ; H : 6,24 ; N : 12,36.

N'-méthyl-N'-phényl-N-benzènesulfonyl hydrazine : 4.



A une solution de N-méthyl-N-phénylhydrazine **16** (1,0 g ; 8,2 mmol) dans le chloroforme (20 ml) on ajoute 0,69 g de bicarbonate de sodium (8,2 mmol). A cette suspension refroidie à 0°C est additionnée goutte à goutte une solution chloroformique (10 ml) de chlorure de benzènesulfonyle (1,06 ml ; 8,2 mmol). On laisse revenir à température ambiante et on maintient l'agitation pendant 18 heures. Après évaporation à sec, le solide **4** obtenu est lavé à l'eau puis recristallisé quatre fois dans l'éthanol.

Rendement : 70 %.

R_f (CH_2Cl_2 /Hexane) : 0,30.

F : 131-132°C.

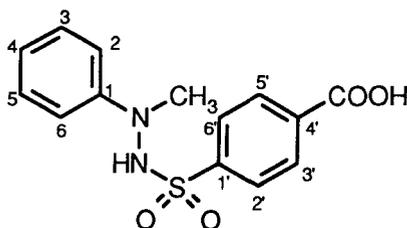
IR : 3190 (NH) ; 1340 et 1160 (SO_2-NH).

RMN 1H ($CDCl_3$, 250) : 3,02 (3H, s, CH_3) ; 6,17 (1H, s, NH) ; 6,84 (3H, m, $H_{2,4,6}$) ; 7,15 (2H, d dédoublé, $H_{3,5}$, $J=7,5$) ; 7,45-7,62 (3H, m, $H_{3',4',5'}$) ; 7,97 (2H, m, $H_{2',6'}$).

Masse (IE) : m/z 262 (M^+ , 24) ; 121 ($M-C_6H_5SO_2$, 100).

Analyse : Calc. : C : 59,52 ; H : 5,38 ; N : 10,68 ; S : 12,22.

Tr. : C : 59,70 ; H : 5,37 ; N : 10,85 ; S : 11,95.

Acide 4-((N'-méthyl-N'-phényl)hydrazinosulfonyl)benzoïque : 6.

A une solution de N-méthyl-N-phénylhydrazine **16** (1,00 g ; 7,9 mmol) diluée dans 10 ml de pyridine (séchée sur potasse) et refroidie à 0°C, on ajoute lentement l'acide 4-chlorosulfonyl benzoïque (2,00 g ; 8,7 mmol) et on laisse revenir le mélange à température ambiante. Après agitation pendant 3 heures, le mélange est refroidi à 0°C puis acidifié jusqu'à pH 2-3 par addition d'une solution de HCl 3N. Le précipité formé est filtré, lavé à l'éther puis recristallisé dans l'éthanol. Le composé obtenu est ensuite décoloré sur charbon animal puis à nouveau recristallisé dans l'éthanol.

Rendement : 11 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 8/2) : 0,25.

F : 213-214°C.

IR : 3240 (NH) ; 1670 (COOH) ; 1335, 1160 (SO₂NH).

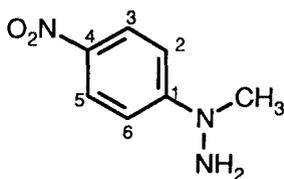
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 250) : 2,74 (3H, s, CH₃) ; 6,80 (1H, d dédoublé, H₄) ; 6,91 (2H, d, H_{2,6}, J=7,9) ; 7,15 (2H, d dédoublé, H_{3,5}, J=7,9) ; 7,97 (2H, d, H_{2',6'}, J=8,4) ; 8,14 (2H, d, H_{3',5'}, J=8,4) ; 9,82 (1H, s, COOH) ; 13,40 (1H, s, NH).

Masse (IE) : m/z 306 (M⁺, 6) ; 121 (C₆H₅N⁺(CH₃)=NH, 100).

HPLC (GRAD50.M, UCB) : λ=220 nm
t_R=4,98 min. (100 %).

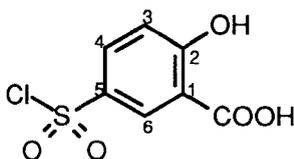
Analyse : Calc. : C : 54,89 ; H : 4,61 ; N : 9,14.

Tr. : C : 55,13 ; H : 4,62 ; N : 9,05.

N-méthyl-N-*para* nitrophénylhydrazine : 18.

Le *para* chloronitrobenzène **17** (2,001 g ; 12,6 mmol) dissous dans 50 ml d'éthanol est placé dans un autoclave avec la méthylhydrazine (1,773 g ; 37,7 mmol). Après avoir laissé réagir ce mélange pendant 24 heures à 110°C, le produit de la réaction est évaporé à sec. Le résidu d'évaporation est dissous dans un minimum de dichlorométhane et le composé **18** est précipité dans l'éther de pétrole. Après deux recristallisations dans le toluène, le composé **18** est obtenu sous la forme de fines aiguilles jaune orangé.

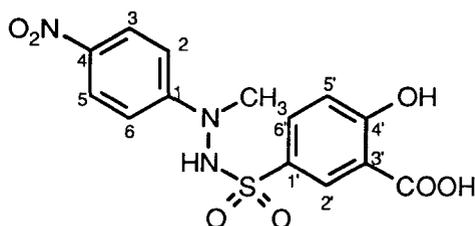
Rendement :	29,5 %.
R _f (CH ₂ Cl ₂) :	0,44.
F :	159-160°C.
IR :	3290 (NH ₂) ; 1315 (Ar-NO ₂).
RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300) :	3,23 (3H, s, CH ₃) ; 4,93 (2H, s, NH ₂) ; 6,97 (2H, d, H _{2,6} , J=9,5) ; 8,01 (2H, d, H _{3,5} , J=9,5).
Masse (IE) :	m/z 167 (M ⁺ , 100) ; 152 (M-CH ₃ , 58) ; 137 (M-NO, 13).

Acide 5-chlorosulfonyl salicylique : 20.

A l'acide chlorosulfonique (25 ml), sous agitation et refroidi à 0°C, on ajoute l'acide salicylique **19** (5,0 g ; 36,2 mmol) par petites portions. Ce mélange réactionnel est ensuite porté à 75°C pendant 1h20. On le laisse ensuite revenir à température ambiante puis on le verse sur de la glace pilée (150 g). Le solide blanc ainsi obtenu est filtré, séché puis recristallisé dans le dichlorométhane.

Rendement :	38 %.
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH) :	0,40.
F :	169-171°C.
IR :	3080 (OH) ; 1665 (C ₄ H ₆ (COOH)(OH)) ; 1375 et 1170 (SO ₂ Cl).
RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 250) :	6,88 (1H, d, H ₃ , J=8,6) ; 7,68 (1H, d, H ₄ , J=8,6) ; 8,04 (1H, s, H ₆) ; 12,0 (1H, s, COOH).
Masse (IE) :	m/z 236 (M ⁺ , 50) ; 201 (M-Cl, 84) ; 183 (M-Cl-H ₂ O, 100).

Acide 5-((N'-méthyl-N'-*para* nitrophényl)hydrazinosulfonyl)salicylique : 8.



A l'hydrazine **18** (0,20 g ; 1,2 mmol) dissoute dans le THF (10 ml) et la pyridine (0,1 ml ; 1,2 mmol), refroidies à -15°C, on ajoute goutte à goutte le chlorure de sulfonyle **20** (0,340 g ; 1,44 mmol) dissous dans le THF (10 ml) et la pyridine (0,3 ml ; 3,6 mmol). On laisse revenir ce mélange à température ambiante puis sous agitation pendant une nuit. Après évaporation à sec, le résidu est agité dans une solution saturée en NaHCO₃. Après extraction des impuretés non acides par l'acétate d'éthyle, la phase aqueuse est acidifiée par addition lente d'HCl 3N jusqu'à pH 4. Cette phase acide est ensuite extraite par l'acétate d'éthyle puis par l'éther. Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄ et évaporées à sec. Le résidu est repris à chaud dans l'acétate d'éthyle, ce qui permet d'éliminer encore quelques impuretés. Le composé **8** est précipité dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole, filtré, puis lavé par le dichlorométhane. On obtient ainsi 12 mg du composé **8** pur.

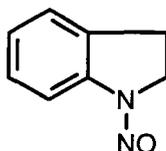
Rendement :	3 %.
R _f (AcOEt/EtOH : 8/2) :	0,45.

IR : 3210 (NH) ; 1660 (COOH) ; 1580 et 1305 (Ar-NO₂) ; 1320 et 1150 (NH-SO₂).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300) : 2,89 (3H, s, CH₃) ; 7,01 (2H, d, H_{2,6}, J=9,1) ; 7,16 (1H, d, H₅, J=8,6) ; 7,90 (1H, d, H₆, J=8,6) ; 8,06 (2H, d, H_{3,5}, J=9,1) ; 8,21 (1H, s, H_{2'}) ; 10,17 (1H, s, COOH).

II -2- Préparation des composés non substitués par une chaîne éthylénique 1, 2, 5, 7, 10, 11 et 12.

1-nitroso indoline : 22.



L'indoline **21** (20 g ; 166 mmol) diluée dans 150 ml d'HCl 0,6 N est préalablement lavée à l'éther : cela permet d'éliminer les impuretés contenues dans ce produit commercial. Le mélange est refroidi à 0°C et on lui additionne goutte à goutte le nitrite de sodium (13,8 g ; 199 mmol) en solution dans 60 ml d'eau. On maintient l'agitation pendant trois heures. Il y a formation d'un précipité de nitroso indoline **22** qui est lavé à l'éther de pétrole puis recristallisé deux fois dans le cyclohexane.

Rendement : 83 %.

R_f (CH₂Cl₂/Hexane) : 0,40.

F : 83-84°C.

IR : 1380 (N-NO).

RMN ¹H (CDCl₃, 300) : 3,2 (2H, t, H₃, J=7,8) ; 4,15 (2H, t, H₂, J=7,8) ; 7,24-7,36 (3H, m, H_{4,5,6}) ; 7,84 (1H, m, H₇).

Masse (IE) : m/z 148 (M⁺, 12) ; 118 (M-NO, 100).

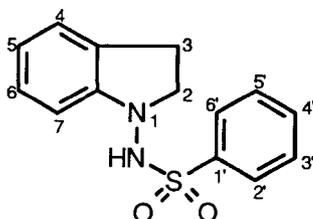
HPLC (GRAD50.M, UCB) : λ=220 nm
t_R=6,134 min. (100 %).

Masse (IE) : m/z 238 (M^+ , 29) ; 133 ($M-C_6H_5CO$, 100).

Analyse : Calc. : C : 75,60 ; H : 5,92 ; N : 11,75.

Tr. : C : 75,17 ; H : 5,98 ; N : 11,78.

1-benzènesulfonylamino indoline : 2.



A une suspension de nitroso indoline **22** (1,0 g ; 6,76 mmol) dans 30 ml d'éther anhydre refroidi à 0°C, on ajoute lentement $LiAlH_4$ (1,03 g ; 27 mmol) et le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 45 minutes. Le complexe formé est ensuite décomposé par additions successives de 10 ml d'eau, d'une solution de NaOH 1N jusqu'à pH 10 et de 5 ml d'eau. Le précipité minéral obtenu est filtré, lavé abondamment à l'eau puis à l'éther. La phase aqueuse est extraite par l'éther et l'ensemble des phases organiques est évaporé à sec. On obtient ainsi la 1-amino indoline **23** de pureté suffisante pour effectuer la réaction suivante.

Le résidu de l'évaporation est dissous dans 10 ml d'acétate d'éthyle et on ajoute de la triéthylamine (2,85 ml ; 20,2 mmol). A ce mélange refroidi à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de benzènesulfonyle (1,31 ml ; 10,1 mmol) dilué dans 10 ml d'acétate d'éthyle. On laisse revenir à température ambiante puis sous agitation pendant 16 heures. Le mélange est évaporé à sec et le résidu est trituré dans une solution saturée en bicarbonate de sodium, filtré puis séché. Le précipité correspondant à **2** est ensuite recristallisé dans l'acétate d'éthyle, filtré puis lavé à l'éther.

Rendement : 15 %.

R_f (CH_2Cl_2 /Hexane : 1/1) : 0,11.

F : 152-153°C.

IR : 3180 (NH) ; 1330 (SO_2-NH) ; 1160 (SO_2-NH).

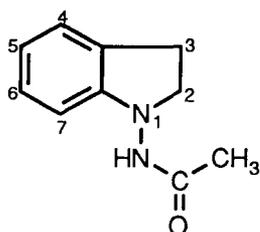
RMN 1H ($CDCl_3$) : 2,89 (2H, t, H_3 , $J=7,8$) ; 3,34 (2H, t, H_2 , $J=7,8$) ; 5,87 (1H, s, NH) ; 6,45 (1H, d, H_7 , $J=7,8$) ; 6,84 (1H, d dédoublé, H_5) ; 6,95-7,1 (2H, m, $H_{4,6}$) ; 7,5-7,65 (3H, m, $H_{3',4',5'}$) ; 8,02 (2 H, d, $H_{2',6'}$, $J=7,4$).

Masse (IE): m/z 274 (M^+ , 10) ; 133 ($M-C_6H_5SO_2$, 100).

Analyse : Calc. : C : 61,29 ; H : 5,14 ; N : 10,21.

Tr. : C : 61,28 ; H : 5,22 ; N : 9,98.

1-acétamido indoline : 11.



La 1-nitroso indoline **22** (2,0 g ; 13,5 mmol) est dissoute dans 30 ml d'éther anhydre et est refroidie à 0°C. On ajoute lentement $LiAlH_4$ (1,54 g ; 40,5 mmol) et le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 15 minutes. Le complexe formé est ensuite décomposé par additions successives de 20 ml d'eau, d'une solution de soude 1N jusqu'à pH 10 et de 5 ml d'eau. Le précipité minéral obtenu est filtré, lavé abondamment à l'eau puis à l'éther. La phase aqueuse est extraite par l'éther et l'ensemble des phases organiques est évaporé à sec pour donner la 1-amino indoline **23**.

Le résidu d'évaporation est dissous dans 20 ml d'acétate d'éthyle à 0°C. On lui additionne la triéthylamine (2,3 ml ; 16,2 mmol) puis, goutte à goutte, le chlorure d'acétyle (1,17 ml ; 16,2 mmol). Après deux heures, cette phase organique est lavée à l'eau puis évaporée à sec. Le résidu ainsi obtenu est recristallisé deux fois dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 31 %.

R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$: 9/1) : 0,66.

F : 129-131°C.

IR : 3180 (NH) ; 1630 (NH-CO).

RMN 1H ($DMSO-d_6$, 300, 100°C) : 1,88 (3H, s, CH_3) ; 2,92 (2H, t, H_3 , $J=7,8$) ; 3,50 (2H, t, H_2 , $J=7,8$) ; 6,51 (1H, d, H_7) ; 6,72 (1H, d dédoublé, H_5) ; 7,03 (2H, m, $H_{4,6}$) ; 9,01 (1H, pic large, NH).

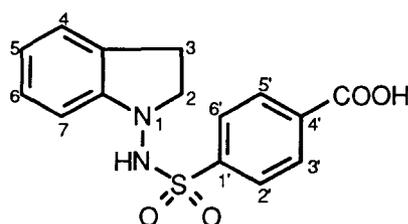
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300, 1^{er} conformère (72 %) : 1,87 (s, CH₃) ; 9,58 (s, NH).
20°C) : 2^{ème} conformère (28 %) : 2,00 (s, CH₃) ; 8,87 ((s, NH).

Masse (IE) : m/z 176 (M⁺, 37) ; 133 (M-COCH₃, 100).

Analyse : Calc. : C : 68,16 ; H : 6,86 ; N : 15,90.

Tr. : C : 68,04 ; H : 6,96 ; N : 15,82.

1-(4-carboxyphényl)sulfonylamino indoline : 7.



A la 1-nitroso indoline **22** (2,0 g ; 13,5 mmol) dissoute dans 60 ml d'éther anhydre et refroidie à 0°C, on ajoute lentement LiAlH₄ (0,77 g ; 20,3 mmol) et le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 45 minutes. Le produit de la réaction est décomposé par addition très lente d'eau (jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bouillonnement à l'ajout d'une goutte d'eau). Le précipité minéral est filtré puis lavé à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée à sec pour donner la 1-amino indoline **23** de pureté suffisante pour effectuer la réaction suivante.

Le résidu d'évaporation est dilué dans 5 ml de pyridine séchée sur potasse et refroidi à -15°C. On lui additionne goutte à goutte l'acide 4-chlorosulfonyl benzoïque (4,65 g ; 20,3 mmol) dissous dans 20 ml de THF et 10 ml de pyridine. Au bout de 3h30, ce mélange est versé dans une solution glacée d'HCl 3N. Il y a formation d'un précipité qui est abondamment lavé à l'eau, décoloré sur charbon animal puis recristallisé deux fois dans l'éthanol.

Rendement : 11,5 %.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 8/2) : 0,42.

F : Décomposition à 188°C.

IR : 3200 (NH) ; 1670 (COOH) ; 1325 et 1160 (NH-SO₂).

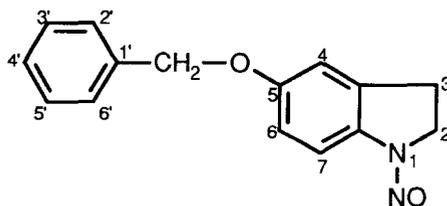
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300) : 2,8 (2H, t, H_3 , $J=7,8$) ; 3,1 (2H, t, H_2 , $J=7,8$) ; 6,5 (1H, d, H_7) ; 6,8 (1H, d dédoublé, H_5) ; 7,0 (2H, m, $\text{H}_{4,6}$) ; 8,0 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=8,3$) ; 8,2 (2H, d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=8,3$) ; 9,8 (1H, s, NH) ; 13,5 (1H, s, COOH).

Masse (IE) : m/z 318 (M^+ , 11) ; 186 ($(\text{HO}_2\text{S})\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$, 100).

Analyse : Calc. : C : 56,59 ; H : 4,43 ; N : 8,80.

Tr. : C : 56,48 ; H : 4,48 ; N : 8,95.

1-nitroso-5-benzyloxy indoline : 26.



Le 5-benzyloxy indole commercial **24** (2,0 g ; 8,97 mmol) est dissous dans 20 ml d'acide acétique glacial à température ambiante ; on ajoute progressivement le cyanoborohydrure de sodium (2,25 g ; 35,9 mmol). On laisse sous agitation pendant trois heures. On ajoute de la soude 2N jusqu'à pH 10 et la phase aqueuse est extraite par le chloroforme. La phase organique est évaporée à sec. On obtient la 5-benzyloxy indoline **25** non purifiée sur laquelle la réaction de nitrosation est directement effectuée.

Le résidu est dissous partiellement dans un mélange d'eau (10 ml) et de méthanol (5 ml). On ajoute de l'acide chlorhydrique 3N jusqu'à pH 2 puis, goutte à goutte, le nitrite de sodium (0,74 g ; 10,7 mmol) en solution dans 10 ml d'eau. Après agitation pendant 2 heures, le précipité de nitroso indoline **26** obtenu est filtré, lavé à l'eau puis séché.

Rendement : 85 %.

R_f (CH_2Cl_2) : 0,28.

F : 119-120°C.

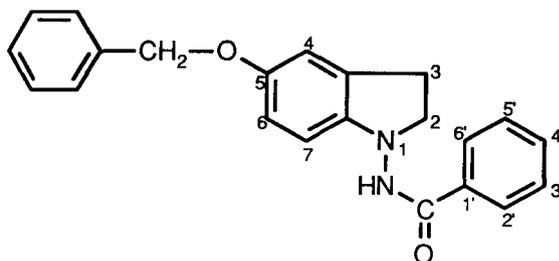
IR : 1490 (N-NO).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 250) : 3,16 (2H, t, H_3 , $J=7,6$) ; 4,08 (2H, t, H_2 , $J=7,6$) ; 5,14 (2H, s, CH_2) ; 7,01 (1H, d, H_6 , $J=8,6$) ; 7,12 (1H, s, H_4) ; 7,3-7,5 (5H, m, $\text{H}_{2',3',4',5',6'}$) ; 7,69 (1H, d, H_7).

Masse (IE) : m/z 254 (M⁺, non détecté) ; 224 (M-NO, 76) ; 91 (C₆H₅CH₂, 100).

Masse (FAB) : 255 (MH⁺).

1-benzamido-5-benzyloxy indoline : 28.



A 0°C, la 1-nitroso-5-benzyloxy indoline **26** (1,0 g ; 3,98 mmol) est dissoute dans 30 ml d'éther anhydre et on ajoute lentement LiAlH₄ (0,6 g ; 15,9 mmol). Ce mélange est laissé sous agitation pendant une heure. Le produit de la réaction est ensuite décomposé par additions successives de 10 ml d'eau, d'une solution de NaOH 1N jusqu'à pH 9 et de 5 ml d'eau. Le précipité minéral obtenu est filtré, lavé abondamment à l'eau puis à l'éther. La phase aqueuse est extraite par l'éther et les phases organiques rassemblées et évaporées à sec. On obtient ainsi l'hydrazine **27** non purifiée soumise à la réaction de benzoylation.

Le résidu de l'évaporation est dissous dans 10 ml d'acétate d'éthyle et on ajoute la triéthylamine (1,7 ml ; 12 mmol). A ce mélange refroidi à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de benzoyle (0,7 ml ; 6 mmol) dilué dans 10 ml d'acétate d'éthyle. On laisse revenir à température ambiante puis sous agitation pendant deux heures et on évapore à sec. Le résidu d'évaporation est trituré dans une solution saturée de bicarbonate de sodium. Le précipité obtenu est essoré puis lavé à l'éther. On obtient ainsi un solide blanc qui est recristallisé dans l'acétate d'éthyle, filtré puis lavé à l'éther.

Rendement : 37 %.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,84.

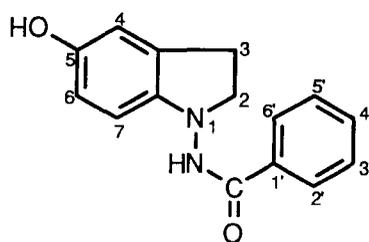
F : 136-137° C.

IR : 3180 (NH) ; 1630 (CO-NH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250) : 3,03 (2H, t large, H_3) ; 3,67 (2H, t large, H_2) ; 5,0 (2H, s, CH_2) ; 6,4-6,9 (3H, m, $\text{H}_{4,6,7}$) ; 7,25-7,55 (5H, m, C_6H_5) ; 7,4-7,5 (3H, m, $\text{H}_{3',4',5'}$) ; 7,60 (1H, s, NH) ; 7,81 (2H, m, $\text{H}_{2',6'}$).

Masse (IE) : m/z 344 (M^+ , 42) ; 253 ($\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$, 100) ; 105 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$, 90).

1-benzamido-5-hydroxy indoline : 5.



Le composé **28** (0,901 g ; 2,61 mmol) est mis en suspension dans 20 ml d'éthanol absolu. On ajoute à cette solution une pointe de spatule de nickel de Raney, on agite sous pression atmosphérique d'hydrogène et à température ambiante. Après sept heures, le mélange est filtré et le filtrat évaporé à sec. Le résidu est dissous dans le dichlorométhane et placé à 0°C pendant une nuit. Le précipité obtenu est ensuite filtré et séché.

Rendement : 32. %.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) : 0,55.

F : 166-168 $^\circ\text{C}$.

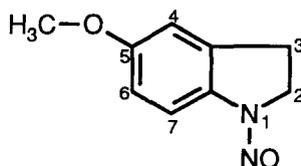
IR : 3200 (OH, NH) ; 1640 (CO-NH).

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300) : 2,90 (2H, t, H_3 , $J=8,0$) ; 3,56 (2H, t, H_2 , $J=8,0$) ; 6,39 (1H, d, H_7 , $J=8,3$) ; 6,47 (1H, d, H_6) ; 6,60 (1H, s, H_4) ; 7,4-7,6 (3H, m, $\text{H}_{3',4',5'}$) ; 7,86 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=7,0$) ; 8,85 (1H, s large, NH) ; 10,15 (1H, s, OH).

Masse (IE) : m/z 254 (M^+ , 54) ; 149 ($\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$, 100).

Analyse (5.1/3 H_2O) : Calc. : C : 69,22; H : 5,68; N : 10,76.

Tr. : C : 69,66; H : 5,64; N : 10,73.

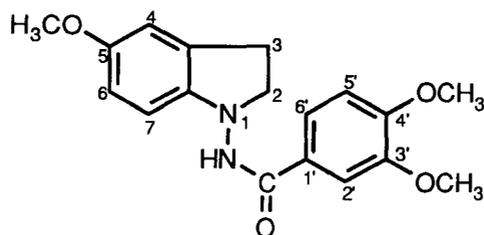
1-nitroso-5-méthoxy indoline : 31.

Le 5-méthoxy indole **29** commercial (2,01 g ; 13,5 mmol) est dissous dans 20 ml d'acide acétique glacial à température ambiante et on ajoute progressivement le cyanoborohydrure de sodium (2,12 g ; 33,8 mmol). On laisse sous agitation pendant deux heures. Le milieu est ensuite rendu basique par ajout de 100 ml d'une solution de soude 1N puis de soude en pastilles (à 0°C) jusqu'à pH 10. Cette phase aqueuse est extraite par le dichlorométhane. La phase organique est évaporée à sec. On obtient la 5-méthoxy indoline **30** non purifiée sur laquelle la réaction de nitrosation est directement effectuée.

Le résidu d'évaporation est dilué dans 150 ml d'une solution 3N d'acide chlorhydrique. Ce mélange est refroidi à 0°C puis on additionne goutte à goutte le nitrite de sodium (1,12 g ; 16,1 mmol) en solution dans 50 ml d'eau. Après agitation pendant une heure, le précipité formé est filtré, lavé abondamment à l'eau puis à l'éther de pétrole. La nitroso indoline **31** est obtenue pure après deux recristallisations dans le cyclohexane.

Rendement :	51 %.
R _f (AcOEt/cyclohexane) :	0,56.
F :	101-102°C.
IR :	1490 (N-NO).
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300) :	3,19 (2H, t, H ₃ , J=7,8) ; 3,84 (3H, s, CH ₃) ; 4,17 (2H, t, H ₂ , J=7,8) ; 6,88 (2H, m, H _{4,6}) ; 7,75 (1H, d, H ₇ , J=9,5).
Masse (IE) :	m/z 178 (M ⁺ , 2) ; 148 (M-NO, 100) ; 117 (M-OCH ₃ , 17).
HPLC (GRAD50.M, UCB) :	λ=220 nm t _R =6,141 min. (100 %).
Analyse :	Calc. : C : 60,66 ; H : 5,66 ; N : 15,72. Tr. : C : 60,49 ; H : 5,76 ; N : 15,34.

1-(3',4'-diméthoxybenzamido)-5-méthoxy indoline : 10.



La 1-nitroso-5-méthoxy indoline **31** (0,785 g ; 4,4 mmol), dissoute dans 70 ml d'éther anhydre, est refroidie à 0°C. On ajoute lentement LiAlH₄ (0,250 g ; 6,6 mmol) et ce mélange est laissé sous agitation pendant 2h15. Le produit de la réaction est ensuite décomposé par addition très lente d'eau jusqu'à ce qu'on n'observe plus de bouillonnement. Le précipité minéral obtenu est filtré puis lavé par l'éther. Le filtrat est séché sur MgSO₄ et évaporé à sec. On obtient ainsi l'hydrazine **32** non purifiée soumise à la réaction de benzoylation.

Le résidu de l'évaporation est dissous dans 30 ml d'acétate d'éthyle et on ajoute la triéthylamine (0,93 ml ; 6,6 mmol). A ce mélange refroidi à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de 3,4-diméthoxy benzoyle (1,351 g ; 6,6 mmol) dissous dans 10 ml d'acétate d'éthyle. On laisse revenir à température ambiante. Au bout de trois heures, le mélange réactionnel est lavé par une solution 0,5 N d'HCl, puis par une solution de soude 0,5 N et enfin par l'eau. Cette phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. Après une chromatographie sur silice, avec l'acétate d'éthyle pour éluant, le composé est précipité dans un mélange AcOEt/éther de pétrole puis est recristallisé dans un mélange AcOEt/cyclohexane (10/90), ce qui fournit la benzamido indoline **10** pure.

Rendement : 19,5 %.

R_f (AcOEt) : 0,60.

F : 129-130°C.

IR : 3200 (NH) ; 1630 (CO-NH).

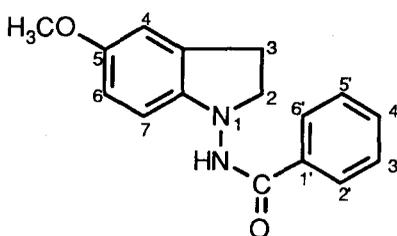
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300) : 2,96 (2H, t, H₃, J=8,0) ; 3,60 (2H, t, H₂, J=8,0) ; 3,67 (3H, s, OCH₃) ; 3,77 (6H, s, OCH₃) ; 6,45 (1H, d, H₇, J=8,4) ; 6,64 (1H, d, H₆, J=8,4) ; 6,80 (1H, s, H₄) ; 7,03 (1H, d, H_{5'}, J=8,4) ; 7,46 (1H, s, H_{2'}) ; 7,51 (1H, d, H_{6'}, J=8,4) ; 10,08 (1H, s, NH).

Masse (IE) : m/z 328 (M⁺, 58) ; 163 (M-C₆H₅(CO)(OCH₃)₂, 100).

HPLC (GRAD50.M, UCB) : $\lambda=220$ nm
 $t_R=6,124$ min. (100 %).

Analyse : Calc. : C : 65,84 ; H : 6,14 ; N : 8,53.
 Tr. : C : 65,63 ; H : 6,30 ; N : 8,15.

1-benzamido-5-méthoxy indoline : 12.



La 1-nitroso-5-méthoxy indoline **31** (1,010 g ; 5,7 mmol), dissoute dans 70 ml d'éther anhydre, est refroidie à 0°C. On ajoute lentement LiAlH₄ (0,432 g ; 11,3 mmol) et ce mélange est laissé sous agitation pendant une heure. Le produit de la réaction est ensuite décomposé par addition très lente d'eau jusqu'à ce qu'on n'observe plus de bouillonnement. Le précipité minéral obtenu est filtré puis lavé par l'éther. Le filtrat est séché sur MgSO₄ puis évaporé à sec. On obtient ainsi l'hydrazine **32** non purifiée soumise à la réaction de benzoylation.

Le résidu de l'évaporation est dissous dans 30 ml d'acétate d'éthyle et on ajoute la triéthylamine (1,2 ml ; 8,5 mmol). A ce mélange refroidi à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de benzoyle (0,98 ml ; 8,5 mmol) dilué dans 10 ml d'acétate d'éthyle. On laisse revenir à température ambiante. Au bout de cinq heures, le mélange réactionnel est lavé par une solution 0,5 N d'HCl, puis par une solution de soude 0,5 N et enfin par l'eau. Cette phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. Le produit est précipité dans l'éther de pétrole, puis recristallisé dans l'acétate d'éthyle et rincé à l'éther, ce qui permet d'obtenir **12** pur.

Rendement : 33 %.

R_f (AcOEt/cyclohexane) : 0,46.

F : 131-132°C.

IR : 3220 (NH) ; 1640 (CO-NH).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 250) : 2,96 (2H, t, H₃, J=8,0) ; 3,58 (2H, t, H₂, J=8,0) ; 3,68 (3H, s, OCH₃) ; 6,48 (1H, d, H₇, J=8,3) ; 6,64 (1H, d, H₆, J=8,3) ; 6,78 (1H, s, H₄) ; 7,50 (3H, m, H_{3',4',5'}) ; 7,87 (2H, d, H_{2',6'}, J=7,4) ; 10,10 (1H, s, NH).

Masse (IE) : m/z 268 (M⁺, 49) ; 163 (M-C₆H₅CO, 100).

HPLC (GRAD50.M, UCB) : $\lambda=220$ nm
t_R=6,576 min. (100 %).

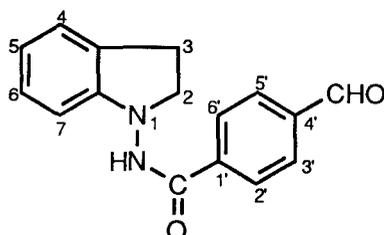
Analyse : Calc. : C : 71,62 ; H : 6,01 ; N : 10,44.
Tr. : C : 71,54 ; H : 6,11 ; N : 10,56.

II -3- Synthèse des dérivés fermés substitués par une chaîne éthylénique.

II -3-1- Préparation du composé 9.

II -3-1-1- Première voie de synthèse envisagée.

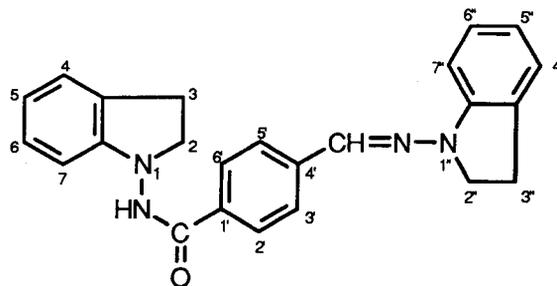
Essais de synthèse de la 1-(4-formylbenzamido)indoline : 33.



• *Passage par le chlorure d'acide :*

Le chlorure de thionyle (2,35 ml ; 32,2 mmol) est additionné goutte à goutte au 4-carboxybenzaldéhyde **34** (1,0 g ; 6,5 mmol) dans 15 ml de CH₂Cl₂ sec et à 0°C. Ce mélange est agité pendant une nuit à température ambiante puis est porté à reflux pendant 65 heures. Après évaporation à sec du dichlorométhane, le résidu, en suspension dans AcOEt, est ajouté lentement à une solution d'amino indoline **23** dans 20 ml d'acétate d'éthyle et 3 ml de NEt₃ à 0°C (**23** a été préparée à partir de 1,5 g de **22** (10,3 mmol) et de 0,78 g (20,7 mmol) de LiAlH₄). Le mélange est agité pendant une heure à température ambiante, puis lavé à l'eau et évaporé à sec. On obtient ainsi un solide qui est recristallisé dans AcOEt et qui correspond au produit de disubstitution **36** caractérisé en RMN (14 %).

Caractérisation de **36** :

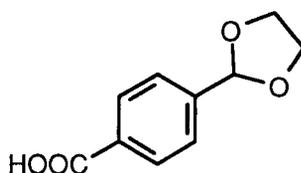


RMN ^1H (CDCl_3 , 300) : 3,10 (2H, t, H_3 , $J=7,8$) ; 3,27 (2H, t, $\text{H}_{3''}$, $J=8,2$) ; 3,72 (2H, t, H_2 , $J=7,8$) ; 3,90 (2H, t, $\text{H}_{2''}$, $J=8,2$) ; 6,76 (1H, d, H_7 , $J=7,4$) ; 6,87 (3H, m, $\text{H}_{4,5,6}$) ; 7,1-7,2 (4H, m, $\text{H}_{4'',5'',6'',7''}$) ; 7,31 (1H, s, CH) ; 7,51 (1H, s, NH) ; 7,73 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=8,0$) ; 7,82 (2H, d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=8,0$).

• *Passage par l'ester activé (EDCI) :*

Le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (1,0 g ; 6,5 mmol), dissous dans un mélange de DMF (4 ml) et de dichlorométhane (15 ml), est refroidi à -5°C . On ajoute la triéthylamine (1,8 ml ; 12,9 mmol) puis l'EDCI (2,53 g ; 12,9 mmol) par petites portions. Ce mélange est agité pendant une heure à -5°C , puis on ajoute l'amino indoline **23** (préparée à partir de **22** (1,43 g ; 9,7 mmol) et de LiAlH_4 (0,74 g ; 19,4 mmol)) diluée dans 5 ml de CH_2Cl_2 . Après agitation pendant une nuit à température ambiante, on effectue un lavage par une solution saturée en NaHCO_3 . La phase organique, séchée sur MgSO_4 , est évaporée à sec. Le résidu d'évaporation est précipité dans AcOEt , puis recristallisé dans ce solvant. Par cette méthode, on obtient à nouveau le produit de disubstitution **36**.

Essais de synthèse de l'acide 4-(2-dioxalanyl)benzoïque : **38**.



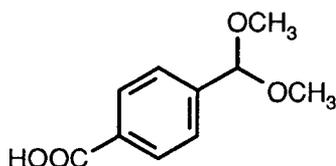
• *En présence de TsOH :*

Le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (1,0 g ; 6,5 mmol), l'éthylène glycol (1,44 ml ; 26 mmol), l'acide *para* toluènesulfonique monohydraté (0,1 g) et le cyclohexane sont placés dans un appareil de Dean-Stark, et l'ensemble est chauffé à reflux pendant 24 heures, mais nous n'observons pas d'évolution en CCM. Après élimination sous vide du solvant, le résidu d'évaporation est repris dans de la soude 1N. Cette phase est lavée par l'acétate d'éthyle, puis acidifiée jusqu'à pH 5 par une solution de HCl 3N. Après extraction par AcOEt , on retrouve le 4-carboxybenzaldéhyde de départ.

• *En présence d'alumine activée :*

L'alumine Wolm acide (1,6 g) est séchée sous vide à 180°C pendant 2 heures. On additionne ensuite l'éthylène glycol (1,8 ml ; 29,8 mmol), CCl₄ sec (30 ml) et le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (1,0 g ; 6,5 mmol), puis l'ensemble est porté à reflux. Après 70 heures, aucune évolution n'a été détectée en CCM et cet essai a été stoppé.

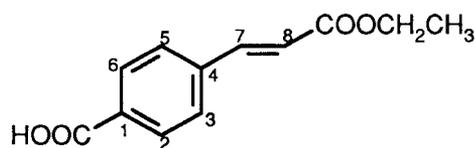
Essai de synthèse de l'acide 4-diméthoxyméthyl benzoïque : **39**.



Le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (1,0 g ; 6,5 mmol) est agité pendant 5 minutes dans du méthanol anhydre, puis on additionne l'acide *para* toluènesulfonique (0,042 g) et le 2,2-diméthoxypropane (1,0 g ; 8,0 mmol). Ce mélange est porté à reflux pendant une nuit. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute 20 ml d'eau au mélange réactionnel et le méthanol est évaporé sous vide. La phase aqueuse ainsi obtenue est extraite par AcOEt. La phase organique est évaporée à sec. Si les différents essais de précipitation n'ont pas abouti, la chromatographie sur silice permet de recouvrer l'aldéhyde de départ.

II -3-1-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.

4-carboxycinnamate d'éthyle : **40**.



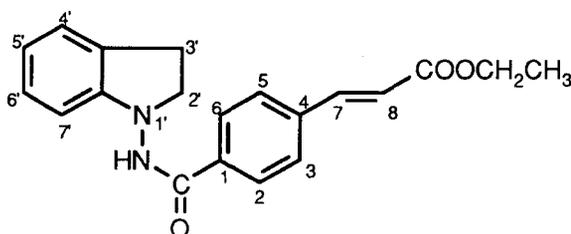
A une suspension de 4-carboxybenzaldéhyde **34** (1,0 g ; 6,5 mmol) dans du toluène anhydre (60 ml) sous atmosphère d'azote, on ajoute le triphénylcarbétoxyméthylène phosphorane (2,4 g ; 6,5 mmol). Ce mélange est porté à reflux pendant 5h30 puis évaporé à sec. Le résidu d'évaporation est ensuite recristallisé dans un mélange éthanol / cyclohexane (1/1).

Rendement : 22 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 8/2) : 0,67.

IR :	1710 (COOEt) ; 1670 (COOH).
RMN ^1H (CDCl ₃ , 80) :	1,35 (3H, t, CH ₃ , J=7,1) ; 4,26 (2H, q, CH ₂ , J=7,1) ; 6,55 (1H, d, H ₈ , J=16,5) ; 7,58 (2H, d, H _{3,5} , J=8,3) ; 7,76 (1H, d, H ₇ , J=16,5) ; 8,12 (2H, d, H _{2,6} , J=8,3).
Masse (IE) :	m/z 220 (M ⁺ , 64) ; 175 (M-OCH ₂ CH ₃ , 100).

(E)-1-(4-(éthoxyacryloyl))benzamido indoline : 41.



• *Utilisation de la DCC et de HOBT :*

A une suspension de 1-nitroso indoline **22** (1,0 g ; 6,8 mmol) dans 30 ml d'éther anhydre refroidi à 0°C, on ajoute lentement LiAlH₄ (0,96 g ; 25,3 mmol) ; le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 45 minutes. Le produit de la réaction est ensuite décomposé par addition de 30 ml d'eau et on vérifie la basicité de la solution. Le précipité minéral formé est filtré, lavé abondamment à l'eau puis à l'éther. La phase aqueuse est extraite par l'éther et la phase organique séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. On obtient ainsi la 1-amino indoline **23** de pureté suffisante pour effectuer un couplage de type peptidique.

Parallèlement, au composé **40** (0,335 g ; 1,52 mmol) en suspension à 0°C dans 30 ml de dichlorométhane anhydre, on ajoute la DCC (0,31 g ; 1,52 mmol) et HOBT (0,35 g ; 3,25 mmol). Après deux heures d'agitation, la réaction n'étant pas totale, on ajoute 0,5 mmol de DCC et 0,75 mmol de HOBT.

Après 5 heures de réaction, on additionne lentement à ce mélange la 1-amino indoline, préparée précédemment, diluée dans 5 ml de CH₂Cl₂ anhydre. On laisse sous agitation pendant 1 heure à 0°C puis pendant 21 heures à température ambiante. La réaction n'étant pas complète, le mélange est ensuite porté à reflux pendant 2h30. Après évaporation à sec, la DCU est éliminée par précipitation dans l'acétone. Le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est recristallisé dans l'éthanol et le précipité lavé à l'éther.

Rendement : 45 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 9/1) : 0,81.

IR : 3230 (CO-NH) ; 1710 (COOEt) ; 1650 (CO-NH).

RMN ¹H (CDCl₃, 300) : 1,35 (3H, t, CH₃, J=7,1) ; 3,09 (2H, t, H₃, J=7,8) ; 3,71 (2H, t, H₂', J=7,8) ; 4,28 (2H, q, CH₂, J=7,1) ; 6,51 (1H, d, H₈, J=16,0) ; 6,72 (1H, d, H₇', J=7,8) ; 6,90 (1H, d dédoublé, H₅') ; 7,15 (2H, m, H₄',₆') ; 7,60 (2H, d, H₃,₅, J=8,0) ; 7,69 (1H, d, H₇, J=16,0) ; 7,76 (1H, s, NH) ; 7,86 (2H, d, H₂,₆, J=8,0).

Masse (IE) : m/z 336 (M⁺, 31) ; 133 (M - CO-C₆H₄-CH=CH-COOEt, 100).

DSC : pic à 160,5°C.

• *Utilisation de l'EDCI et de HOBT.*

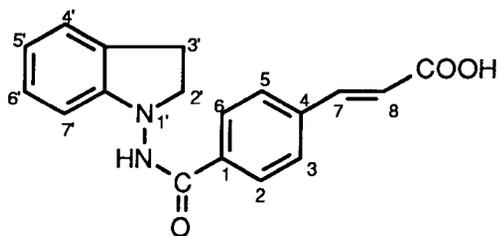
A une suspension de **22** (1,86 g ; 12,56 mmol) dans 30 ml d'éther anhydre refroidi à 0°C, on ajoute lentement LiAlH₄ (0,71 g ; 18,68 mmol) et le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 45 minutes. Le produit de la réaction est ensuite décomposé par addition de 30 ml d'eau et on vérifie la basicité du mélange. Le précipité minéral formé est filtré, lavé abondamment à l'eau puis à l'éther. La phase aqueuse est extraite par l'éther et la phase organique séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. On obtient ainsi la 1-amino indoline **23** de pureté suffisante pour effectuer un couplage de type peptidique.

Parallèlement, à l'acide benzoïque **40** (1,380 g ; 6,27 mmol) en suspension à 0°C dans 30 ml de dichlorométhane anhydre, on ajoute la triéthylamine (2,41 ml ; 12,54 mmol), l'EDCI (2,45 g ; 12,54 mmol) et HOBT (0,35 g ; 31,35 mmol). Ce mélange est agité pendant 3 heures à 0°C, puis on lui additionne goutte à goutte la 1-amino indoline **23**, préparée précédemment, diluée dans 5 ml de CH₂Cl₂ anhydre. On laisse sous agitation pendant 1 heure à 0°C puis pendant une nuit à température ambiante. La phase organique est lavée à l'eau, séchée puis évaporée à sec. Le résidu d'évaporation est ensuite recristallisé dans l'éthanol. Le précipité est filtré, lavé à l'éther puis séché.

Rendement : 60 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 9/1) : 0,81.

IR : 3230 (CO-NH) ; 1710 (COOEt) ; 1650 (CO-NH).

(E)-1-(4-carboxyvinylène)benzamido)indoline : 9.

L'ester **41** (1,241 g ; 3,69 mmol) est mis en suspension dans 35 ml d'une solution de soude 1,5 N préalablement dégazée. Ce mélange, placé sous atmosphère d'azote, est agité pendant 4 heures à 45°C. Cette phase aqueuse est ensuite extraite par l'acétate d'éthyle, acidifiée par addition lente d'HCl 3N jusqu'à pH 2. Le précipité formé est filtré, lavé abondamment à l'eau, essoré, lavé à l'éther puis séché. Il est ensuite recristallisé dans l'acétone puis dans l'acétonitrile.

Rendement : 49 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 8/2) : 0,45.

F : 242-245°C.

IR : 3170 (CO-NH) ; 1670 (COOH) ; 1640 (CO-NH).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300) : 3,01 (2H, t, H₃, J=8,0) ; 3,65 (2H, t, H₂, J=8,0) ; 6,57 (1H, d, H₇, J=7,8) ; 6,66 (1H, d, H₈, J=16) ; 6,77 (1H, d dédoublé, H₅) ; 7,05 (1H, d dédoublé, H₆) ; 7,14 (1H, d, H₄, J=7,1) ; 7,64 (1H, d, H₇, J=16) ; 7,92 (2H, d, H_{3,5}, J=8,2) ; 8,05 (2H, d, H_{2,6}, J=8,2) ; 10,41 (1H, s, NH) ; 12,54 (1H, s, COOH).

L'existence de pics de faible intensité échangeables à l'eau à 9,5 et 11,9 ppm montre la présence d'un composé de structure voisine.

Masse (IE) : m/z 308 (M⁺, 31) ; 133 (M-(CO)C₆H₄(CH=CH-COOH), 100).

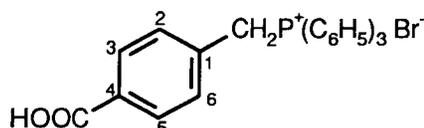
HPLC (GRAD50.M, UCB) : λ=220 nm
 Isomère *E* : t_R=6,153 min. (92,6 %).
 Isomère *Z* : t_R=6,500 min. (7,4 %).

Analyse : Calc. : C : 70,12 ; H : 5,23 ; N : 9,09.
 Tr. : C : 70,15 ; H : 5,21 ; N : 8,74.

II -3-2- Synthèse du dérivé hexénoïque 13.

II -3-2-1- Première voie de synthèse envisagée.

Bromure de (4-carboxybenzyl)triphénylphosphonium 45.



L'acide *para* bromométhyl benzoïque **44** (4,0 g ; 18,6 mmol) et la triphénylphosphine (7,3 g ; 27,8 mmol) dans 100 ml de toluène préalablement séché sur CaCl₂ sont portés à reflux pendant 15 heures. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante ; le précipité formé est filtré, recristallisé dans l'éthanol puis rincé à l'éther.

Rendement : 82 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 9/1) : 0,39.

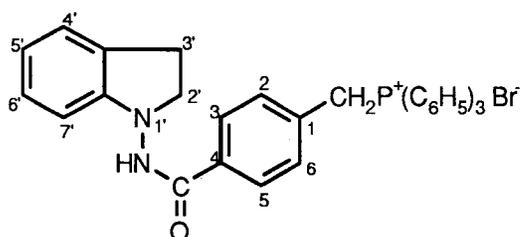
F : > 250°C.

IR : 1695 (COOH) ; 1430, 1105, 990 et 715 (CH₂P⁺(C₆H₅)₃).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 250) : 5,23 (1H, s, H du CH₂) ; 5,30 (1H, s, H du CH₂) ; 7,10 (2H, d, H_{2,6}, J=8,3) ; 7,65-7,94 (17H, m, H_{arom.} et H_{3,5}).

Masse (FAB) : m/z 397,1 (M⁺).

Bromure de (4- (N-carboxamido indoliny)benzyl)triphénylphosphonium : 46.



Le composé bifonctionnel **45** (2,40 g ; 5,0 mmol), en suspension dans 25 ml de CH₂Cl₂ séché sur CaCl₂, est refroidi à 0°C. On ajoute la triéthylamine (1,4 ml ; 10,1 mmol), puis l'EDCI (1,97 g ;

10,1 mmol) et HOBT (1,92 g ; 12,6 mmol). Ce mélange est agité pendant une nuit à 0°C, puis on lui additionne l'ainoindoline **23** (préparée avec 1,51 g (10,1 mmol) de **22** et 0,58 g (15,2 mmol) de LiAlH₄) diluée dans 10 ml de CH₂Cl₂ sec. Après agitation pendant 20 heures à température ambiante, le précipité formé est filtré puis recristallisé dans l'éthanol et rincé à l'éther.

Rendement : 56 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 8/2) : 0,72.

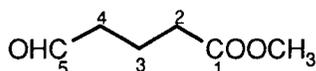
F : > 250°C.

IR : 3120 (NH) ; 1660 (NH-CO) ; 1430, 1105, 990 et 720 (CH₂P⁺(C₆H₅)₃).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 250) : 2,98 (2H, t, H_{3'}, J=8,0) ; 3,61 (2H, t, H_{2'}, J=8,0) ; 5,23 (H, s, H du CH₂) ; 5,30 (1H, s, H du CH₂) ; 6,52 (1H, d, H_{7'}, J=7,6) ; 6,75 (1H, d dédoublé, H_{5'}) ; 7,01 (1H, d, H_{4'}, J=7,7) ; 7,11 (3H, m, H_{2,6,6'}) ; 7,66-7,94 (17 H, m, H_{arom.} et H_{3,5}).

Masse (FAB) : m/z 513 (M⁺).

4-formylbutyrate de méthyle : 49.



La δ-valérolactone **47** (10,0 g ; 98,8 mmol) est placée dans une solution de méthoxyde de sodium préparée à partir de 25 ml de méthanol anhydre et de 0,5 g de sodium. Ce mélange est chauffé à reflux pendant 4 heures. Après addition de 5 ml d'eau, le méthanol est évaporé sous vide, et on effectue des extractions par l'éther puis par le chloroforme. Les phases organiques séchées sur MgSO₄ sont combinées et évaporées à sec. On accède ainsi à l'alcool intermédiaire **48**.

Le résidu d'évaporation, dilué dans 5 ml de CH₂Cl₂ sec, est additionné à une suspension de chlorochromate de pyridinium (20,1 g ; 148,2 mmol) dans 100 ml de CH₂Cl₂ sec. Ce mélange est agité pendant 4 heures à température ambiante, puis on verse 300 ml d'éther anhydre. Cette phase étherée est récupérée par décantation, et le résidu est lavé trois fois à l'éther. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO₄ puis évaporées à sec pour donner une huile brune qui est purifiée par distillation (P=20 mm Hg ; t°=90°C).

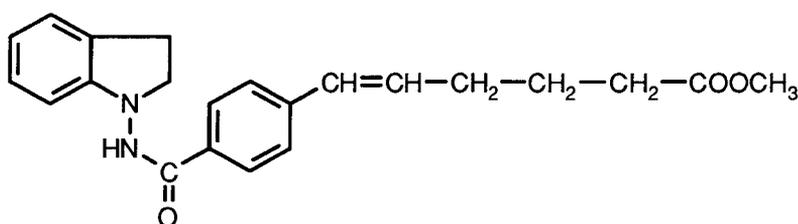
Rendement : 13 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 9,5/0,5) : 0,49.

IR : 1735 (CHO et CO₂CH₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 80) : 1,85-2,13 (2H, m, H₃) ; 2,30-2,69 (4H, m, H_{2,4}) ; 3,69 (3H, s, CH₃) ; 9,80 (1H, s, CHO).

Essai de synthèse du 1-((4-(5-méthoxycarbonylpent-1-ényl))benzamido)indoline : 50.



• *Utilisation du bis (triméthylsilyl)amidure de lithium : LiN(TMS)₂.*

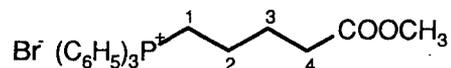
Au bromure de phosphonium **46** (0,750 g ; 1,27 mmol), dans 5 ml de THF anhydre à 0°C et sous atmosphère d'azote, on additionne 2,5 ml d'une solution 1M de LiN(TMS)₂ dans le THF (2,5 mmol). Ce mélange est agité pendant 30 minutes à 0°C et il y a apparition d'une coloration rouge. On additionne alors goutte à goutte l'aldéhyde **49** (0,099 g ; 0,84 mmol) ; l'ensemble est agité une nuit à température ambiante. Le mélange est traité par une solution saturée en NH₄Cl. Le précipité formé est filtré et le filtrat est évaporé à sec. Le sel de phosphonium en excès est éliminé par précipitation dans un minimum d'éthanol, puis on effectue une chromatographie sur silice avec de l'acétate d'éthyle pour éluant. Le liquide jaune pâle obtenu n'est pas monotache en CCM.

• *Utilisation de l'hydrure de sodium : NaH.*

Au bromure de triphénylphosphonium **46** (0,500 g ; 0,84 mmol) dans 10 ml de THF anhydre sous atmosphère d'azote et à 0°C, on ajoute NaH (en suspension à 60 % dans une huile minérale) (0,037 g ; 0,92 mmol). Ce mélange est agité pendant trois heures à température ambiante puis est à nouveau refroidi à 0°C pour l'addition de l'aldéhyde **49** (0,099 g ; 0,84 mmol) dilué dans 2 ml de THF anhydre. L'ensemble est agité pendant une heure à température ambiante, puis est versé dans une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. On effectue ensuite une extraction par l'acétate d'éthyle. La phase organique, séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec, est chromatographiée sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (9/1)). Le produit, monotache en CCM, ne possède pas, en RMN, les caractéristiques de la double liaison conjuguée avec le noyau aromatique.

II -3-2-2- Deuxième voie de synthèse envisagée.

Bromure de 4-(méthoxycarbonyl)butyl triphénylphosphonium : 56.



Le 5-bromoaléate de méthyle **55** (2,0 g ; 9,9 mmol) et la triphénylphosphine (2,0 g ; 7,5 mmol), dans 30 ml de toluène distillé et conservé sur CaCl₂, sont chauffés à reflux pendant 48 heures. Après évaporation à sec du toluène, le résidu est chromatographié sur silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH(9/1)). On obtient ainsi le sel de phosphonium **56** sous forme d'huile.

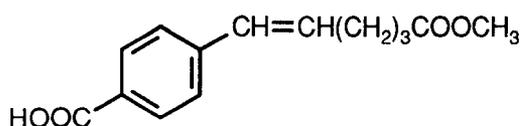
Rendement : 28 %.

R_f (CH₂Cl₂ / MeOH : 9/1) : 0,45.

IR : 1720 (COOCH₃) ; 1430, 1105, 990 et 730 (CH₂P⁺(C₆H₅)₃).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 250) : 1,21 (4H, m, H_{2,3}) ; 2,42 (2H, t large, H₄) ; 3,58 (3H, s, CH₃) ; 3,88 (2H, t large, H₁) ; 7,73 (15 H, m, H_{arom.}).

Essai de synthèse du 6-(4-carboxyphényl)-hex-5-énoate de méthyle : 57.



• *Utilisation du bis (triméthylsilyl)amidure de lithium : LiN(TMS)₂.*

Au sel de phosphonium **56** (0,911 g ; 2,0 mmol) dissous dans 10 ml de THF anhydre et refroidi à -5°C sous atmosphère d'azote, on additionne LiN(TMS)₂ 1M dans le THF (4,0 ml ; 4,0 mmol) et on laisse sous agitation pendant une heure. On additionne ensuite le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (0,308 g ; 2,0 mmol). Après agitation pendant 30 minutes à 0°C puis pendant une nuit à température ambiante, le mélange est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 10 ml d'une solution de soude 1N. Les impuretés non acides sont extraites par l'acétate d'éthyle, puis la phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH 3 et extraite par AcOEt. On récupère en majorité le 4-carboxybenzaldéhyde.

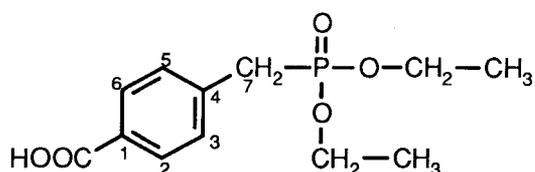
• *Utilisation de l'hydruure de sodium : NaH.*

NaH (en suspension à 60 % dans une huile minérale) (0,074 g ; 1,86 mmol) est placé dans du toluène anhydre sous atmosphère d'azote. On ajoute goutte à goutte le sel de phosphonium **56** (0,850 g ; 1,86 mmol) dissous dans 5 ml de CH₂Cl₂ sec. Ce mélange est agité pendant cinq minutes à température ambiante, puis à 90°C pendant une nuit. A cette solution refroidie à température ambiante, on additionne le 4-carboxybenzaldéhyde **34** (0,144 g ; 0,93 mmol). L'ensemble est agité pendant 15 minutes à température ambiante puis pendant 21 heures à 90°C. Le mélange est extrait par 150 ml d'eau ; cette phase est acidifiée jusqu'à pH 2 par addition de HCl 1N, puis extraite par AcOEt. Après évaporation à sec, on isole par chromatographie sur silice l'acide téréphtalique ainsi que PO(C₆H₅)₃, identifiés en spectrographie de masse.

Masse (IE) : 166 (HOOC-C₆H₄-COOH, 70 ; 279 (P(C₆H₅)₃OH⁺, traces).

II -3-2-3- Troisième voie de synthèse envisagée.

4-carboxybenzyl phosphonate d'éthyle : 58.



Un mélange d'acide *para* bromométhyl benzoïque **44** (1,0 g ; 4,0 mmol) et de triéthylphosphite (3 ml ; 17,0 mmol) est porté à 110°C, sous agitation et sous atmosphère d'azote, pendant 20 heures. Après évaporation à sec il y a apparition d'un précipité qui est agité dans l'éther de pétrole, filtré, lavé à l'éther de pétrole puis à l'éther. Ce solide est enfin recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 88 %.

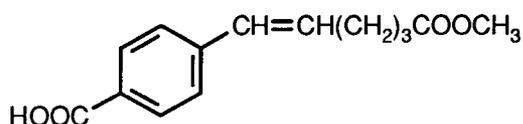
R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) : 0,47.

F : 124-126°C.

IR : 1695 (COOH) ; 1250 (P=O) ; 1170 et 1020 (P-OEt).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 80) : 1,13 (6H, t, CH₃) ; 3,19 (1H, s, H₇) ; 3,43 (1H, s, H₇) ; 3,89 (2H, t, CH₂) ; 7,38 (2H, d, H_{2,6}) ; 7,86 (2H, d, H_{3,5}).

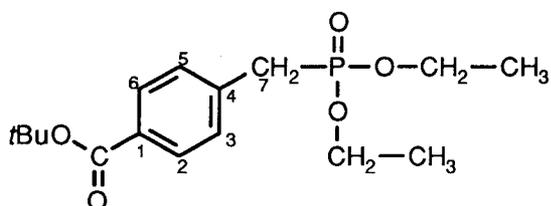
Essai d'obtention du 6-(4-carboxyphényl)-hex-5-énoate de méthyle : 57.



L'hydrure de sodium en suspension à 60 % dans une huile minérale (0,149 g ; 3,7 mmol), dans 30 ml de THF anhydre et sous courant d'azote, est refroidi à 0°C. On ajoute lentement le phosphonate **58** (0,505 g ; 1,85 mmol). On laisse sous agitation pendant une nuit à température ambiante, puis on verse l'aldéhyde **49** (0,330 g ; 2,77 mmol) dilué dans 2 ml de THF anhydre. Après agitation pendant 4 heures à température ambiante puis pendant quatre heures à reflux, on verse 10 ml d'eau dans le mélange puis une solution de HCl 1N jusqu'à pH 4. Après extraction par l'acétate d'éthyle, la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. Un précipité se forme : il correspond à un mélange des phosphonates partiellement hydrolysés **59** et **60** identifiés en spectrographie de masse.

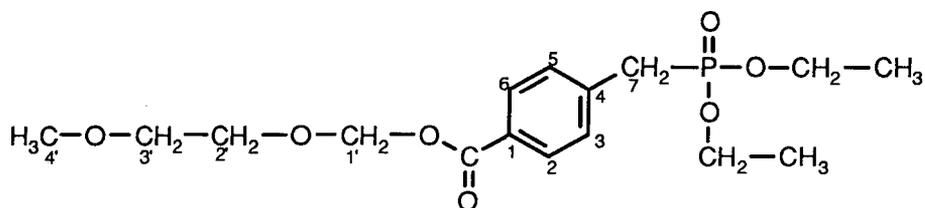
Masse (FAB) : m/z 245 (M₅₉H⁺) ; 231 (M₆₀H⁺).

Essai de synthèse du 4-(*tert*io butyloxycarbonyl)benzyl phosphonate d'éthyle : 61.



Au phosphonate **58** (1,001 g ; 3,68 mmol), dans 20 ml de chloroforme anhydre refroidi à 0°C, on additionne goutte à goutte le chlorure de thionyle (1,34 ml ; 18,4 mmol). On laisse revenir le mélange à température ambiante, puis on porte à reflux pendant trois heures. Après évaporation à sec, le résidu est dissous dans du THF refroidi à 0°C et le *tert* butoxyde de potassium (0,50 g ; 4,4 mmol) est ajouté par petites fractions. L'ensemble est agité pendant deux heures à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans une solution saturée en Na₂CO₃. Après extraction, l'analyse en CCM montre la présence de sept composés différents dans la phase organique. Aucun essai de purification n'a été effectué.

4-(méthoxyéthoxyméthoxycarbonyl)benzyl phosphonate d'éthyle : 62.



Au phosphonate **58** (0,708 g ; 2,6 mmol) dans 20 ml de dichlorométhane séché sur CaCl₂ et à 0°C, on ajoute la diisopropyléthylamine (1,1 ml ; 6,5 mmol) puis, goutte à goutte, le chlorure de méthoxyéthoxyméthyle (0,74 ml ; 6,5 mmol). La réaction est arrêtée après une heure. Le mélange est lavé à l'eau saturée en NaHCO₃, puis à l'eau. Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur silice (CH₂Cl₂/MeOH : 9,5/0,5). L'ester **62** est obtenu sous forme d'une huile épaisse.

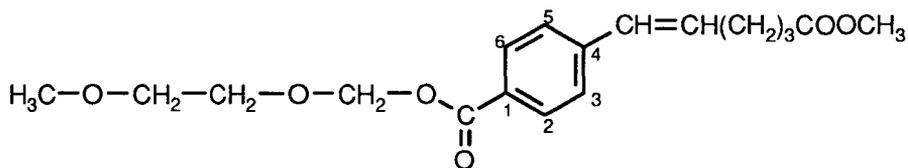
Rendement : 82 %.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH : 9,5/0,5) : 0,48.

IR : 2810 (CH₃-O-CH₂) ; 1720 (COOMEM) ; 1240 (P=O) ; 1165 et 1020 (P-OEt).

RMN ¹H (CDCl₃, 80) : 1,27 (6H, t, CH₃) ; 3,07 (1H, s, H₇) ; 3,32 (1H, s, H₇) ; 3,42 (3H, s, H₄) ; 3,55-3,87 (4H, m, H_{2',3'}) ; 4,0 (4H, q, CH₂) ; 5,57 (2H, s, H₁) ; 7,38 (2H, d, H_{3,5}) ; 8,02 (2H, d, H_{2,6}).

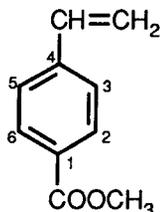
Essai de synthèse du 6-((4-(méthoxyéthoxyméthoxycarbonyl)phényl)-hex-5-énoate de méthyle : 63.



Au phosphonate **62** (0,665 g ; 1,91 mmol), dans 15 ml de THF anhydre et à 0°C sous atmosphère d'azote, on ajoute lentement l'hydrure de sodium (0,116 g ; 2,88 mmol). Après 30 minutes, on additionne goutte à goutte l'aldéhyde **49** (0,225 g ; 1,91 mmol) et l'ensemble est agité pendant trois heures. L'eau (10 ml) est versée dans le mélange pour détruire le reste de NaH ; le THF est évaporé sous vide et la phase aqueuse résultante est extraite par AcOEt. La phase organique est séchée sur MgSO₄, puis évaporée à sec. Par purification par chromatographie sur silice, on obtient le

dérivé vinylique **64**, caractérisé en RMN et en spectrographie de masse.

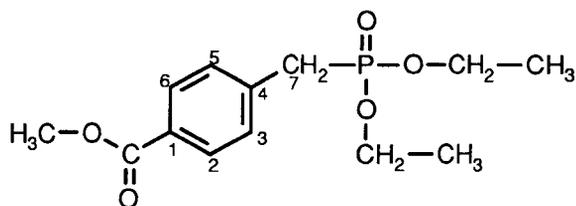
Caractérisation de **64** :



RMN ^1H (CDCl_3 , 80) : 3,88 (3H, s, CH_3) ; 5,3-6,0 (2H, m, CH_2) ; 6,5-7,0 (1H, m, CH) ; 7,50 (2H, d, $\text{H}_{3,5}$, $J=7,6$) ; 8,0 (2H, d, $\text{H}_{2,6}$, $J=7,6$).

Masse (IE) : m/z 162 (M^+ , 43) ; 131 ($\text{M}-\text{OCH}_3$, 100).

4-(méthoxycarbonyl)benzyl phosphonate d'éthyle : 65.



Au phosphonate **58** (1,002 g ; 3,68 mmol) dissous dans 20 ml de chloroforme séché sur CaCl_2 et refroidi à 0°C , on additionne lentement le chlorure de thionyle (1,34 ml ; 18,4 mmol). Ce mélange est agité pendant 30 min. à température ambiante, puis est porté à reflux pendant trois heures. Après évaporation à sec, on ajoute au résidu obtenu 20 ml de méthanol. Le mélange est agité pendant 30 min. à température ambiante et le méthanol est éliminé sous vide. Le résidu d'évaporation est trituré dans une solution saturée en Na_2CO_3 . Le mélange ainsi obtenu est extrait par l'acétate d'éthyle. Après séchage de la phase organique sur MgSO_4 et évaporation à sec, on obtient le composé **65** sous forme d'huile.

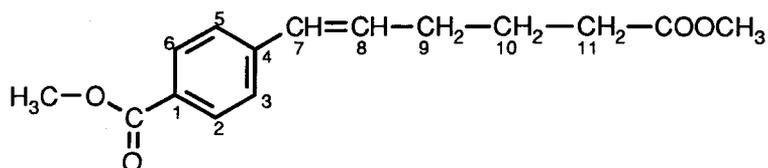
Rendement : 87 %.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9,5/0,5) : 0,68.

IR : 1720 (COOCH_3) ; 1245 ($\text{P}=\text{O}$) ; 1180 et 1020 ($\text{P}-\text{OEt}$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300) : 1,24 (6H, t, CH_3 , $J=7,0$) ; 3,17 (H, s, H_7) ; 3,24 (H, s, H_7) ; 3,91 (3H, s, CH_3) ; 4,02 (4H, m, CH_2) ; 7,38 (2H, d, $\text{H}_{3,5}$, $J=7,9$) ; 7,99 (2H, d, $\text{H}_{2,6}$, $J=7,9$).

6-((4-méthoxycarbonyl)phényl)-hex-5-énoate de méthyle : 66.



Au phosphonate **65** (1,007 g ; 3,52 mol) dans 30 ml de THF anhydre refroidi à 0°C et sous atmosphère d'azote, on ajoute l'hydrure de sodium (0,21 g ; 5,28 mmol). Ce mélange est agité pendant 30 min. puis on additionne, sous azote et goutte à goutte, l'aldéhyde **49** (0,813 g ; 5,28 mmol) dilué dans 10 ml de THF anhydre. On laisse revenir ce mélange lentement à température ambiante puis sous agitation pendant 18 heures. On ajoute alors 5 ml d'eau au mélange réactionnel afin de décomposer le NaH restant, puis le THF est évaporé. Après acidification par une solution chlorhydrique 1N jusqu'à pH 5-6, la phase aqueuse est extraite par l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur CaCl₂ puis évaporée à sec. Après une chromatographie sur silice avec l'acétate d'éthyle pour éluant, on obtient l'éthylénique **66** sous forme d'huile.

Rendement : 22 %.

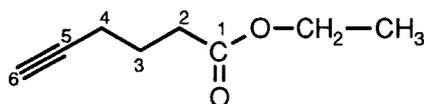
R_f (AcOEt) : 0,94.

IR : 1720 (COOCH₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 300) : 1,91 (2H, m, H₁₀) ; 2,39 (4H, m, H_{9,11}) ; 3,68 (3H, s, CH₃ ester aliphatique) ; 3,92 (3H, s, CH₃ ester aromatique) ; 6,42 (2H, m, H_{7,8}) ; 7,40 (2H, d, H_{3,5}, J=8,3) ; 7,97 (2H, d, H_{2,6}, J=8,3).

II -3-2-4- Quatrième voie de synthèse envisagée.

Hex-5-ynoate d'éthyle : 75.



Le chlorure d'oxalyle (5,66 g ; 44,6 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution d'acide hex-5-ynoïque **73** (2,0 g ; 17,8 mmol) dans 20 ml de dichlorométhane séché sur CaCl₂ et refroidi à 0°C. La solution est ramenée à température ambiante et laissée sous agitation jusqu'à ce que le dégagement gazeux cesse (3 heures). Après évaporation à sec, on ajoute au résidu obtenu 40 ml d'éthanol. La solution est agitée pendant une heure, puis évaporée à sec. Le résidu d'évaporation est trituré dans

une solution de K_2CO_3 . Après extraction par l'acétate d'éthyle, séchage sur $MgSO_4$ et évaporation à sec, on obtient une huile chromatographiquement pure.

Rendement : 72 %.

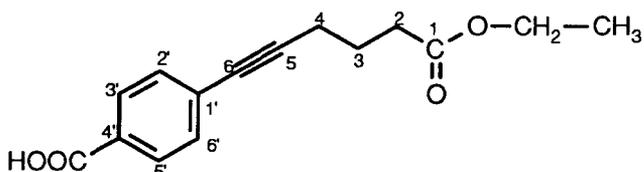
R_f (AcOEt/MeOH : 6/4) : 0,90.

IR : 3280 (C≡C) ; 1725 (COOEt).

RMN 1H ($CDCl_3$, 300) : 1,24 (3H, t, CH_3 , $J=7,15$) ; 1,81 (2H, t dédoublé, H_3 , $J=7,1$) ; 1,99 (1H, t, H_6 , $J=2,6$) ; 2,23 (2H, t dédoublé, H_4 , $J=7,1$, $J=2,6$) ; 2,42 (2H, t, H_2) ; 4,11 (2H, q, CH_2 , $J=7,15$).

Masse (IE) : m/z 140 (M^+ , non détecté) ; 112 ($M-C_2H_4$; 70) ; 95,1 ($M-OEt$; 100) ; 67,2 ($M-COOEt$; 87,8).

6-(4-carboxyphényl)-hex-5-ynoate d'éthyle : 77.



L'acide *para* iodobenzoïque **76** (4,36 g ; 17,5 mmol) est mis en suspension dans 60 ml de triéthylamine sous azote. Lorsque le milieu est homogène, on ajoute CuI (0,26 g ; 1,4 mmol), $PdP(C_6H_5)_2Cl_2$ (0,26 g ; 0,38 mmol) puis l'hex-5-ynoate d'éthyle **75** (3,7 g ; 26,4 mmol). Le mélange est laissé sous agitation pendant cinq heures à $50^\circ C$. Après évaporation à sec, le résidu est dissous dans le dichlorométhane, lavé par une solution d' HCl 0,5 N puis par l'eau. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée à sec. Le composé **77** est obtenu pur après une recristallisation dans le cyclohexane.

Rendement : 76 %.

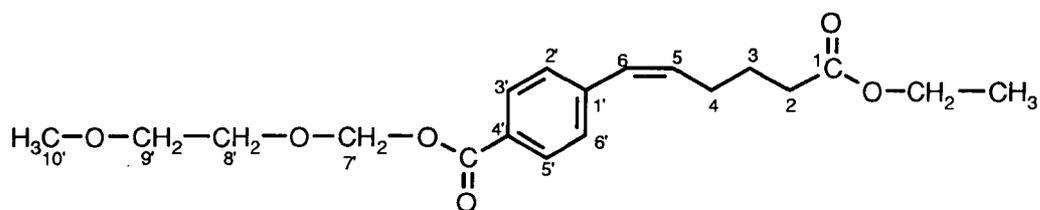
R_f (AcOEt/MeOH : 8/2) : 0,58.

IR : 1720 (COOEt) ; 1670 (COOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300) : 1,25 (3H, t, CH_3 , $J=7,1$) ; 1,95 (2H, m, H_3) ; 2,51 (4H, m, $\text{H}_{2,4}$) ; 4,15 (2H, q, CH_2 , $J=7,1$) ; 7,48 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=8,2$) ; 8,03 (2H, d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=8,2$).

Masse (IE) : m/z 260 (M^+ , 94) ; 172 ($\text{M}-\text{COOH}-\text{OEt}$, 100).

(Z)-6-(4-(méthoxyéthoxyméthoxycarbonyl)phényl)-hex-5-énoate d'éthyle : 84.



L'acétylénique **77** (3,35 g ; 12,9 mmol), dissous dans 110 ml d'éthanol auquel on a additionné 3,5 ml de pyridine et 60 mg de catalyseur de Lindlar (Pd/BaSO_4 , 5%), est agité sous pression normale d'hydrogène. Après 1h30, le volume théorique d'hydrogène (288 ml) a été totalement absorbé et on vérifie en CCM que le composé **77** a entièrement réagi. Le catalyseur est filtré et le solvant évaporé à sec. Le résidu est versé lentement dans 50 ml d'HCl 3N glacé. Cette phase aqueuse est extraite par l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée à sec. Une analyse en HPLC analytique (GRAD50.M) montre qu'il y a trois produits différents ; d'après la spectrographie de masse, on obtient d'un mélange des acides **78**, **80** et **81**.

Le résidu d'évaporation (2,916 g ; 11,1 mmol) est dilué dans 50 ml de dichlorométhane séché sur CaCl_2 et refroidi à 0°C . On additionne la diisopropyléthylamine (5,7 ml ; 33,4 mmol) puis le chlorure de méthoxyéthoxyméthyle dilué dans 50 ml de CH_2Cl_2 sec. Après quatre heures, le mélange est lavé par une solution de HCl 0,1N, puis par la soude et enfin par l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée à sec. On obtient ainsi 3,273 g d'un mélange des esters **84**, **85** et **86** (identifiés en spectrographie de masse).

La purification de **84** par chromatographie chirale a été effectuée sur plusieurs lots de synthèse réunis. Pour 3,7 g de mélange dilué dans 20 ml d'éluant, deux injections de 10 ml chacune ont été effectuées. Cette purification a été réalisée sur colonne AD avec pour éluant un mélange hexane/éthanol/diisopropylamine (90/10/1). Dans ces conditions, sur une colonne analytique chirale, les temps de rétention sont les suivants ($\lambda=225$ nm) :

- oléfine **84** (Z) : $t_R = 11,264$ min.
- alcane **86** : $t_R = 12,774$ min.
- oléfine **85** (E) : $t_R = 20,483$ min.

Par cette méthode, on obtient le dérivé éthylénique **84** de configuration Z.

Rendement de la purification : 70 %.

R_f (CH₂Cl₂/AcOEt : 9,5/0,5) : 0,50.

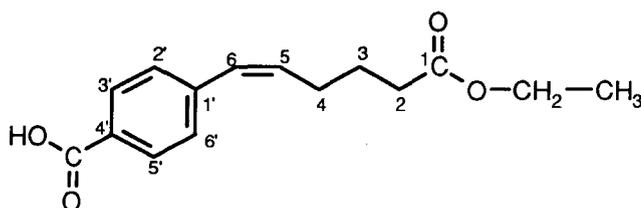
IR : 3240 (O-CH₂-O) ; 1700-1730 (esters).

RMN ¹H (CDCl₃, 300) : 1,22 (3H, t, CH₃, J=7,1) ; 1,79 (2H, m, H₃) ; 2,28-2,39 (4H, m, H_{2,4}) ; 3,38 (3H, s, H_{10'}) ; 3,56-3,90 (4H, m, H_{8',9'}) ; 4,10 (2H, q, CH₂, J=7,1) ; 5,57 (2H, s, H_{7'}) ; 5,69-5,82 (1H, t dédoublé, H₅, J=11,7) ; 6,48 (1H, d, H₆, J=11,7) ; 7,32 (2H, d, H_{2',6'}, J=8,5) ; 8,02 (2H, d, H_{3',5'}, J=8,5).

Masse (IE) : m/z 350 (M⁺, 20) ; 305 (M-OEt, 11) ; 244 (M-OMEM, 100).

HPLC(A/B : 10/90, ICPL) : λ=225 nm
t_R = 7,02 min. (100 %).

(Z)-6-(4-carboxyphényl)-hex-5-énoate d'éthyle : 78.



L'ester de MEM **84** (0,503 g ; 1,43 mmol) est dilué dans 20 ml de dichlorométhane sec et on ajoute 4 ml de TFA. Ce mélange est agité pendant 30 minutes à l'abri de la lumière, puis on lui additionne 10 ml d'eau. Le TFA est neutralisé par NaHCO₃ en poudre. La phase organique est ensuite lavée à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. Le composé **78** est une huile.

Rdt : 98 %.

R_f (AcOEt) : 0,68.

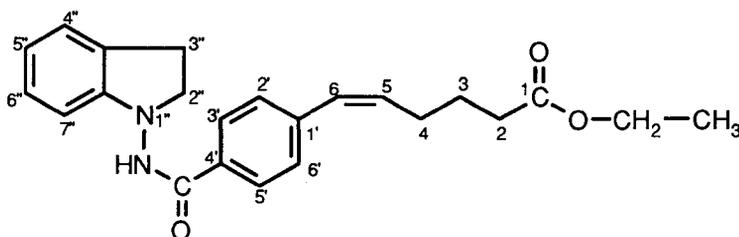
IR : 1720 (COOEt) ; 1680 (COOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300) : 1,23 (3H, t, CH_3 , $J=7,2$) ; 1,80 (2H, m, H_3) ; 2,30-2,42 (4H, m, $\text{H}_{2,4}$) ; 4,10 (2H, q, CH_2 , $J=7,2$) ; 5,77 (1H, t dédoublé, H_5 , $J=11,7$) ; 6,50 (1H, d, H_6 , $J=11,7$) ; 7,36 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=8,1$) ; 8,07 (2H, d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=8,1$).

Masse (IE) : m/z 262 (M^+ , 19) ; 217 (M-OEt , 15) ; 174 ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2)$, 100).

HPLC(GRAD50.M, UCB) : $\lambda=220$ nm
 $t_R = 9,836$ min. (100 %).

(Z)-1-((4-(5-éthoxycarbonylpent-1-ényl))benzamido)indoline: 79.



La 1-nitroso indoline **22** (0,585 g ; 3,95 mmol), dans 70 ml d'éther anhydre à 0°C, est traitée par LiAlH_4 (0,225g ; 5,92 mmol). Après une heure, le complexe formé est décomposé par addition très lente d'eau jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bouillonnement. Le précipité minéral est filtré, le filtrat est séché sur MgSO_4 , puis évaporé à sec pour donner l'amino indoline **23**.

Parallèlement, l'acide **78** (0,690 g ; 2,63 mmol) est dissous, à l'abri de la lumière, dans 40 ml de dichlorométhane sec refroidi à 0°C. On ajoute la triéthylamine (0,56 ml ; 3,95 mmol), puis l'EDCI (0,773 g ; 3,95 mmol) et HOBT (0,773 g ; 3,95 mmol). L'analyse en CCM après une heure montre que l'acide **78** a totalement disparu.

On additionne alors à ce mélange à 0°C l'amino indoline **23** dissoute dans 10 ml de CH_2Cl_2 sec. Après agitation pendant 15 heures à température ambiante, cette phase organique est lavée par une solution de HCl 0,5 N, par une solution de soude 0,5 N puis par l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 et évaporée à sec. Le résidu est précipité dans un mélange éther/éther de pétrole, filtré, puis rincé à l'éther de pétrole.

Rdt : 35 %.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 8/2) : 0,69.

F : 115-116°C.

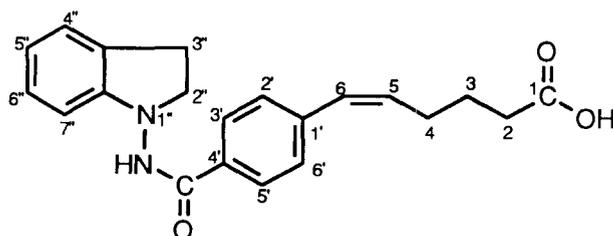
IR : 3240 (NH) ; 1720 (COOEt) ; 1640 (CO-NH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300) : 1,23 (3H, t, CH_3 , $J=7,1$) ; 1,79 (2H, m, H_3) ; 2,29-2,40 (4H, m, $\text{H}_{2,4}$) ; 3,10 (2H, t, $\text{H}_{3''}$, $J=7,7$) ; 3,71 (2H, t, $\text{H}_{2''}$, $J=7,7$) ; 4,10 (2H, q, CH_2 , $J=7,1$) ; 5,75 (1H, t dédoublé, H_5 , $J=11,7$) ; 6,48 (1H, t, H_6 , $J=11,7$) ; 6,75 (1H, d, $\text{H}_{7''}$, $J=7,9$) ; 6,89 (1H, d dédoublé, $\text{H}_{5''}$) ; 7,16 (2H, m, $\text{H}_{4'',6''}$) ; 7,35 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=8,1$) ; 7,47 (1H, s, NH) ; 7,81 (1H, d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=8,1$).

Masse (IE) : m/z 378 (M^+ , 47) ; 245 (C_6H_4 (CO)(CH=CH(CH $_2$) $_3$ COOEt), 72) ; 133 (M-245, 100).

HPLC(GRAD50.M, UCB) : $\lambda=220$ nm
 $t_R=10,958$ min. (100 %).

(Z)-1-((4-carboxy-pent-1-ényl)benzamido)indoline : 13.



NaOH (1,0 g) est dissoute dans 20 ml d'eau et 10 ml de dioxanne. Cette solution est dégazée sous vide, puis est placée sous courant d'azote. On ajoute l'ester **79** (0,315 g ; 0,83 mmol), et l'ensemble est agité pendant 1h30 à l'abri de la lumière. Ce mélange est ensuite acidifié, à 0°C, par une solution de HCl 3N jusqu'à pH 5, puis extraite par l'éther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO_4 puis évaporée à sec. L'acide **13** est ensuite précipité dans un mélange acétone/eau.

Rdt : 95 %.

R_f (AcOEt) : 0,30.

F : 65-67°C.

IR : 3250 (NH) ; 1690 (COOH) ; 1620 (CO-NH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300) : 1,79 (2H, m, H_3) ; 2,36 (4H, m, $\text{H}_{2,4}$) ; 3,08 (2H, t, $\text{H}_{3''}$, $J=7,7$) ; 3,69 (2H, t, $\text{H}_{2''}$, $J=7,7$) ; 5,76 (1H, t dédoublé, H_5 , $J=11,5$) ; 6,49 (1H, d, H_6 , $J=11,5$) ; 6,73 (1H, d, $\text{H}_{7''}$, $J=7,6$) ; 6,88 (1H, d dédoublé, $\text{H}_{5''}$) ; 7,10-7,18 (2H, m, $\text{H}_{4'',6''}$) ; 7,34 (2H, d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=8,2$) ; 7,57 (1H, s, NH) ; 7,79 (2H, d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=8,2$).

NOESY (CDCl_3 , 300) : Interactions dans l'espace entre les signaux de H_5 et de H_6 , ce qui correspond à une conformation Z.

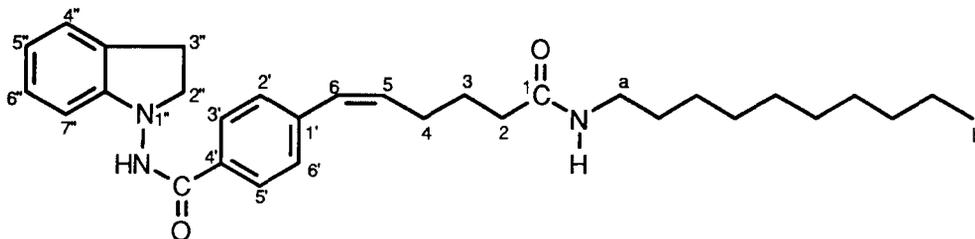
Masse (IE) : m/z 350 (M^+ , 61) ; 217 ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO})(\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH})$, 67) ; 133 ($\text{M}-217$, 100).

HPLC (GRAD50.M, ICPL) : $\lambda=220$ nm
 $t_{\text{R}}=14,76$ min. (100 %).

Analyse ($13 \cdot \text{H}_2\text{O}$) : Calc. : C : 68,46 ; H : 6,57 ; N : 7,60.
 Tr. : C : 68,70 ; H : 6,45 ; N : 7,50.

II -3-3- Synthèse, à partir de l'acide 13, du composé 15.

(Z)-1-(4-(5-(ω -décylaminocarbonyl)pent-1-ényl)benzamido)indoline : 15.



A l'acide **13** (0,256 g ; 0,67 mmol) dissous dans 15 ml de dichlorométhane sec à 0°C, on ajoute NEt_3 (0,3 ml ; 2,02 mmol), puis l'EDCI (0,198 g ; 1,01 mmol) et HOBT (0,174 g ; 1,14 mmol). Ce mélange est agité pendant 1h30, puis on additionne la décylamine (0,21 ml ; 1,01 mmol). On laisse sous agitation une nuit à température ambiante. Après évaporation à sec, le résidu est dissous dans AcOEt. Cette phase organique est lavée par une solution chlorhydrique 0,5N, par la soude 0,5N puis par l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 puis évaporée à sec. L'amide est précipité dans un mélange éther/éther de pétrole, puis est reprécipité dans un mélange CH_2Cl_2 /éther, filtré et lavé abondamment à l'éther.

Rdt : 38 %.

R _f (AcOEt) :	0,72.
F :	88-89°C.
IR :	3260 (NH) ; 3180 (NH) ; 1630 (NHCO).
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300) :	0,87 (3H, t, H _b , J=6,7) ; 1,25 (16H, pic large, CH ₂) ; 1,81 (2H, t large, H ₃) ; 2,17-2,37 (4H, m, H _{2,4}) ; 3,10 (2H, t, H _{3''}) ; 3,18 (2H, m, H _a) ; 3,71 (2H, t large, H _{2''}) ; 5,63 (1H, s large, NH amide) ; 5,77 (1H, t dédoublé, H ₅ , J=11,5) ; 6,48 (1H, d, H ₆ , J=11,5) ; 6,74 (1H, d, H _{7''} , J=7,4) ; 6,90 (1H, d dédoublé, H _{5''}) ; 7,15 (2H, m, H _{4'',6''}) ; 7,34 (2H, d, H _{2',6'} , J=7,9) ; 7,58 (1H, s, NH) ; 7,80 (2H, d, H _{3',5'} , J=7,9).
Masse (IE) :	m/z 489 (M ⁺ , 86) ; 356 (C ₆ H ₄ (CO)(CH=CH(CH ₂) ₃ CONHC ₁₀ H ₂₁), 82) ; 133 (M-356, 100).
HPLC(100 % B, ICPL) :	λ=220 nm t _R =9,35 min. (100 %).
Analyse :	Calc. : C : 76,03 ; H : 8,85 ; N : 8,58. Tr. : C : 75,49 ; H : 9,15 ; N : 8,67.

III - Activité biologique.

III -1- Test d'irwin.

Les produits à l'étude sont injectés par voie intrapéritonéale à des groupes de trois souris NMRI mâles, pesant de 18 à 20 grammes.

Chaque groupe reçoit une dose différente de telle façon que l'échelle de doses administrées ait une croissance logarithmique jusqu'à environ 1g / kg.

Les différents groupes de souris sont observés 5, 15, 30, 60 et 120 minutes après injection et les modifications du comportement sont notées suivant les critères usuels de la méthode d'irwin (Irwin, 1968).

III -2- Mesure de l'inhibition de l'oxydation des LDL.

III -2-1- Préparation du sérum humain.

On prélève 50 ml de sang à un volontaire sain et on les laisse coaguler pendant une heure à 37°C. Le sang coagulé est ensuite incubé pendant quatre heures à 0°C, ce qui permet aux caillots de se contracter. Le sérum est récupéré et centrifugé à 3000 t/mn pendant 10 minutes pour éliminer tous les débris.

III -2-2- Isolement des LDL.

Le sérum ainsi préparé est dilué avec une solution de NaCl 0,9 % (poids/volume) et le sérum dilué est centrifugé pendant 16 heures à 40 000 t/min.. Le tiers supérieur du contenu des tubes de centrifugation est éliminé. La densité des deux tiers inférieurs est ajustée à 1,064 avec du KBr solide et la solution résultante est centrifugée à 40 000 t/min. pendant 24 heures. Après centrifugation, le tiers supérieur du contenu des tubes de centrifugation, contenant les LDL, est dialysé deux fois contre 250 volumes de NaCl 0,9 %, stérilisé par filtration et stocké à 4°C.

III -2-3- Oxydation des LDL.

III -2-3-1- Suivi par électrophorèse.

Les LDL oxydées sont préparées par incubation avec CuSO_4 4 μM pendant 20 heures à 37° C. Les produits à tester sont ajoutés au milieu d'incubation.

Les lipoprotéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. On ajoute aux LDL un égal volume de Noir de Soudan 0,1 % (poids/volume) et on laisse incubé pendant 30 minutes à température ambiante. 5 ml du mélange sont alors déposés en ligne et le gel est mis sous une tension de 170 V. Au bout de deux heures, le gel est lavé avec de l'acide acétique 5 % et photographié immédiatement.

III -2-3-2- Suivi par UV.

La sensibilité de la préparation de LDL à la peroxydation lipidique induite par le cuivre est déterminée comme l'ont décrit Erstauber et coll. (1989) : la préparation de LDL est diluée à 0,025 mg/ml avec une solution de NaCl 0,9 % en milieu tampon phosphaté. L'augmentation de l'absorbance à 234 nm est mesurée en fonction du temps en présence de CuSO₄. Chaque produit à tester est ajouté au milieu d'incubation.

III -3- Evaluation de l'effet de substances sur l'activation, la prolifération et la survie de cellules musculaires lisses d'aorte de rat en culture.

III -3-1- Préparation des cultures primaires de cellules musculaires lisses.

Un rat adulte âgé de 6 à 8 semaines est sacrifié par décapitation et l'aorte thoracique est prélevée immédiatement. La graisse et l'adventice sont enlevées et l'aorte est lavée extensivement avec du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal additionné de glutamine (1 mM), de pénicilline (100 IU/ml), de streptomycine (100 µg/ml) et de gentamycine (50 µg/ml). L'aorte est ouverte longitudinalement et la surface intérieure est débarrassée de l'endothélium au moyen d'une lame de scalpel. L'aorte est lavée de nouveau avec le même milieu et coupée en fragments de 0,5 mm². Ceux-ci sont transférés dans un flacon de culture (25 cm³) contenant 2,5 ml de milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal additionné de glutamine (1 mM), de pénicilline (100 IU/ml), de streptomycine (100 µg/ml) et de gentamycine (50 µg/ml) ; ils sont incubés à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. La croissance cellulaire sera observée entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour, et la confluence sera atteinte normalement entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour.

III -3-2- Culture des cellules musculaires lisses.

Une fois à confluence, les cellules sont lavées avec du milieu RPMI sans sérum et détachées au moyen d'une solution de trypsine 0,25 % / EDTA 0,2 % ajoutée à raison de 20µl/cm². Les cellules sont incubées pendant quelques minutes à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % CO₂ et la réaction est stoppée par addition de 10 ml de RPMI 1640 supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal contenant 1 mM de glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 50 µg/ml de gentamycine. Les cellules sont collectées par centrifugation (700 tours/min., 7 minutes) et resuspendues dans le milieu de culture (RPMI 1640 + suppléments) à une densité de 50 000 cellules/ml. Les comptages se font soit manuellement au moyen d'une cellule de Thoma, soit automatiquement au moyen d'un Coulter Counter. Les cellules subissent alors un passage par semaine. Pour les expériences décrites ci-dessous, les cellules seront utilisées entre le 2^{ème} et le 11^{ème} passage (ou moins si la réponse aux mitogènes s'avérait trop faible).

III -3-3- Arrêt de la croissance des cellules musculaires lisses.

Les cellules musculaires lisses d'aorte thoracique de rat (TA-SM) sont resuspendues dans du milieu RPMI 1640 complet (10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, 1 mM de glutamine, 100 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 50 µg/ml de gentamycine) à une concentration finale de 50000 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est distribuée dans les plaques Microtiter à 96 puits à raison de 100 µl par puits. Les cellules sont incubées 3 à 4 jours à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % CO₂ jusqu'à ±80 % de confluence. Le milieu est alors éliminé et remplacé, après 2 lavages de la monocouche cellulaire avec du milieu RPMI 1640, par le même volume de milieu RPMI 1640 supplémenté avec 0,2 % (v/v) de sérum de veau fœtal (sans glutamine ni antibiotiques). Les cellules sont à nouveau incubées 24 heures à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

III -3-4- Activation des cellules musculaires lisses quiescentes.

Le milieu est alors remplacé par 100 µl de milieu RPMI 1640 supplémenté avec 0,2 % (v/v) de sérum de veau fœtal et contenant diverses concentrations des substances à tester ainsi que du PDGF (3,2 ng/ml). Les plaques sont de nouveau incubées pendant 24 heures à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. Ensuite, 2 µCi de [³H]thymidine sont ajoutés dans chaque puits, et les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. La réaction est alors stoppée en enlevant le surnageant, et les cellules sont lavées 3 fois avec 200 µl de milieu RPMI sans sérum. Les cellules sont alors détachées en les incubant 20 minutes avec 100 µl d'une solution de trypsine 0,25 % / EDTA 0,2 % ; elles sont transférées quantitativement dans des fioles à scintillation contenant 5 ml de liquide scintillant Ultima Gold (Packard) afin de déterminer la radioactivité intracellulaire. Les concentrations (IC₅₀) des substances testées inhibant 50 % de l'activation induite par le PDGF sont alors déterminées.

III -3-5- Détermination de la cytotoxicité.

Les cellules TA-SM sont resuspendues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal et 1 mM de glutamine à une densité de 50000 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est distribuée dans des plaques Microtiter à 96 puits à raison de 100 µl par puits. Les cellules sont incubées 3 à 4 jours jusqu'à 80 % de confluence. Le milieu est alors remplacé par 100 µl de milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal et 1 mM de glutamine, et contenant les différentes concentrations de substances à tester. Après une nouvelle incubation de 24 heures à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂, 10 µl d'une solution à 5 mg/ml de MTT dans du PBS sont ajoutés dans chaque puits. Après une dernière incubation de 2 heures dans les mêmes conditions, la réaction est arrêtée en enlevant le surnageant, et le précipité de formazan est dissous par addition de 100 µl de DMSO. L'absorbance à 540 nm est déterminée et utilisée comme mesure de cellules viables présentes dans les puits. La survie relative des cellules en présence des substances à tester est exprimée en pour-cent des contrôles non traités. La concentration toxique 50 % des substances à tester est alors déterminée.

III -3-6- Inhibition de la prolifération.

Les cellules TA-SM sont resuspendues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal et 1 mM de glutamine à une densité de 50000 cellules/ml en présence de différentes concentrations de substances à tester. Cette suspension cellulaire est distribuée dans des plaques Microtiter à 96 puits à raison de 100 µl par puits. Les cellules sont incubées 5 jours à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂, et 10 µl d'une solution à 5 mg/ml de MTT dans du PBS sont ensuite ajoutés dans chaque puits. Après une dernière incubation de 2 heures dans les mêmes conditions, la réaction est arrêtée en enlevant le surnageant et le précipité de formazan est dissous par addition de 100 µl de DMSO. L'absorbance à 540 nm est déterminée et utilisée comme mesure de cellules viables présentes dans les puits. La prolifération relative des cellules en présence des substances à tester est exprimée en pour-cent des contrôles non traités. La concentration inhibitrice à 50 % des substances testées est alors déterminée.

III -4- Evaluation de l'effet de substances sur la prolifération des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.

III -4-1- Isolement des cellules musculaires lisses de la trachée de cobaye.

Les cellules musculaires sont obtenues à partir d'explants du muscle lisse de la trachée de cobaye de la manière suivante.

Un cobaye mâle albinos pesant 200 à 250 g est anesthésié par injection de pentobarbital (50 mg/kg). La trachée est prélevée aseptiquement et rincée dans une solution saline équilibrée de Hanks refroidie à 4°C et additionnée d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 mg/l de streptomycine) et d'un antifongique (1 µg/ml d'amphotéricine B) afin de limiter les risques de contamination. La trachée est soigneusement nettoyée puis ouverte longitudinalement, à travers les anneaux cartilagineux. Après avoir retiré l'épithélium par un léger grattage de la face interne de la trachée à l'aide d'un coton tige, le muscle lisse est isolé en coupant longitudinalement, le long de ses bords. Le fin filament obtenu est alors découpé en fragments de quelques millimètres de côté. Ces morceaux sont ensuite incubés 30 minutes à 37°C, sous une atmosphère humide enrichie de 5% en CO₂, dans du milieu de culture DMEM-F12 contenant 1 mg/ml de collagénase (type IV) et 4 µl/ml d'élastase (type I). Cette opération permet de séparer les cellules non musculaires résiduelles au cours des rinçages qui suivent, et facilite la migration ultérieure des cellules musculaires hors des explants.

Ceux-ci sont déposés sur la surface traitée d'un flacon de 25 cm² maintenu verticalement et contenant 2 ml de DMEM-F12 enrichi de 20% de sérum de veau fœtal (SVF), de 1% de glutamine et du cocktail d'antibiotiques et d'antifongiques. Après 3 heures dans l'étuve à 37°C, les explants se sont suffisamment attachés sur le fond de la boîte pour qu'il soit possible de les faire baigner dans le milieu de culture en couchant délicatement le flacon. Les jours suivants, le niveau du milieu de culture est

ajusté afin que les explants ne se dessèchent pas.

Après 24 à 48 heures, quelques cellules commencent à apparaître autour des explants. Il faut attendre 2 à 3 semaines pour que le diamètre de cette couronne soit 3 à 4 fois supérieur à celui de l'explant à l'origine. Il est alors possible d'envisager une culture secondaire.

III -4-2- Sous-cultures de cellules musculaires lisses.

Les cellules sont détachées du fond de la boîte en quelques minutes à 37°C par 1 ml d'un mélange versène-trypsine et dispersées dans deux flacons de 25 cm² où elles sont maintenues jusqu'à confluence dans un milieu DMEM-F12 contenant 10% de SVF, 10% de glutamine, les antibiotiques et les antifongiques. Les explants sont séparés au cours de cette manipulation.

Les sous-cultures suivantes se font au rythme d'une trypsination par semaine avec une dilution des cellules au vingtième. Le temps de doublement de la population est alors de 1,5 jour entre J+2 et J+6. Après deux ou trois passages sans contaminations, l'antifongique n'est plus introduit dans le milieu de culture. Les cellules sont utilisées jusqu'à leur neuvième passage. Leur identité est contrôlée à l'aide d'un anticorps anti- α smooth muscle actine.

III -4-2- Inhibition de la prolifération

Les cellules sontensemencées à 10⁴ cellules par cm² dans des puits et cultivées trois jours dans un milieu de culture DMEM-F12 contenant 10% de sérum de veau fœtal. La culture subconfluente est alors rendue quiescente par une incubation de 24 heures dans le milieu de culture sans sérum de veau, mais additionné de 5 mg/l d'insuline, de 5 mg/l de transferrine et de 5 µg/l de sélénate de sodium. Les cellules sont ensuite mises en contact avec les différents agents, 20 minutes avant de réactiver la prolifération par l'addition de 3% de sérum de veau ou de 2 ng/ml d'EGF. Après 48 heures de traitement, la prolifération des cellules est appréciée soit :

- en comptant les cellules (ensemencées dans des plaques 12 puits) à l'aide d'un hémocytomètre. La viabilité est appréciée en comptant les cellules détachées, en suspension dans le milieu de culture.
- en mesurant l'activité succinyl deshydrogénase mitochondriale qui clive un sel de tétrazolium jaune, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-di-phényl tétrazolium (MTT) soluble dans l'eau, en un dérivé formazan coloré en bleu. La formation de ces cristaux bleus insolubles dans l'eau peut être suivie par spectrophotométrie (technique adaptée de Hirst et coll., 1992). Pour cela, les cellules (ensemencées dans des plaques 24 puits) sont incubées 4 heures avec 400 µl de DMEM-F12 et 100 µl d'une solution de MTT à 4 mg/ml dans le PBS (filtrée avant usage sur un filtre 0,2 mm). Le métabolite formé est solubilisé pendant 18 heures à 37°C par l'addition de 500 µl de dodécyl sulfate de sodium (à 10% dans 0,01 M HCl). La lecture se fait ensuite à 570 nm avec une correction à 630 nm.

Lorsque l'agent testé est susceptible de modifier les activités enzymatiques mitochondriales, il est préférable de suivre son activité directement par un comptage cellulaire.

III -5- Inhibition de la 5-lipoxygénase.

III -5-1- Préparation des cellules.

Les cellules en suspension sont mises en culture à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂ dans un milieu EMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % d'acides aminés non essentiels, 2 mM de glutamine 100 Unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Elles sont ensuite centrifugées à 100 g durant 5 min., le culot est remis en suspension dans un tampon PBS et soumis à une seconde centrifugation de 100 g durant 5 minutes. Le culot de cellules ainsi obtenu est remis en suspension dans du PBS à la densité cellulaire désirée (approximativement 5 millions de cellules / ml de milieu réactionnel).

III -5-2- Procédure d'incubation.

Afin de tester les produits, une préincubation de 10 min à 37°C s'avère nécessaire avant de déclencher la réaction.

Les cellules sont stimulées par l'ajout d'acide arachidonique 10 µM (concentration finale) suivi rapidement de l'ionophore calcique A23187 à une concentration finale de 5 µM. Ceci est suivi par une incubation de 2 minutes à 37°C.

La réaction est arrêtée par addition de 5 ml d'acétate d'éthyle. Le tube est soumis à une forte agitation (Vortex, 15 secondes) et plongée immédiatement dans la glace. Après une centrifugation de 5 min. à 1000 g à 4°C, le surnageant est récupéré, évaporé et congelé à -80°C.

Une référence est ajoutée lors de chaque expérience en tant que contrôle interne : le NDGA à une concentration de 0,5 µM (le pourcentage d'inhibition étant de l'ordre de 70 % à cette concentration).

III -5-3- Mesure de l'activité.

L'activité 5-lipoxygénase au temps 2 min. est déterminée en mesurant par HPLC la quantité de 5-HETE formé.

III -6- Pourcentages d'inhibition de liaison spécifique sur les récepteurs LTB₄ et LTD₄.

Les mesures de binding sont effectuées selon les méthodes suivantes :

<u>récepteur</u>	<u>membranes</u>	<u>molécule de référence</u>	référence
LTB ₄	cellules U937	LTB ₄	Winkler et coll., 1988
LTD ₄	cellules U937	LTD ₄	Frey et coll., 1993

Les conditions expérimentales sont résumées ci-dessous :

<u>récepteur</u>	<u>ligand</u>	<u>concentration</u>	<u>non spécifique</u>	<u>incubation</u>
LTB ₄	[³ H]LTB ₄	0,2 nM	LTB ₄ (0,2 μM)	40 min. / 22 °C
LTD ₄	[³ H]LTD ₄	0,5 nM	LTD ₄ (1 μM)	60 min. / 22 °C

Après l'incubation, les membranes sont rapidement filtrées (filtres GF/B ou GF/C) puis lavées par du tampon froid à l'aide d'un système de filtration "Cell Harvester". Les filtres sont ensuite transférés dans des fioles contenant du liquide scintillant et la radioactivité est déterminée par un compteur à scintillation liquide.

III -7- Inhibition de la PDE IV.

III -7-1- Préparation des cellules.

Les cellules utilisées sont des cellules non différenciées U937. L'activité phosphodiesterase est induite avec le salbutamol (1 μM) et le Rolipram (30 μM) (méthode décrite par Torphy et coll. (1992)). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois par centrifugation (500 g, 5 min., 4°C) dans du tampon HBSS, resuspendues à la concentration finale de 10⁷ cellules/ml dans un milieu DPBS-Tris contenant 1 g/l de dextrose, 1 vol. de PBS et 0,5 vol. de tampon Tris. Cette suspension est ultracentrifugée à 15000 g pendant 20 min. à 4°C. Le surnageant est utilisé pour mesurer l'activité phosphodiesterase ; il congelé et conservé à -70°C.

III -7-2- Mesure de l'activité phosphodiesterase.

L'activité PDE est mesurée selon les méthodes légèrement modifiées de Kono (1988) et de Ong et Rennie (1976). Après incubation pendant 20 min. à 37°C avec la substance à tester, la réaction est arrêtée par addition d'HCl. Après dénaturation de l'enzyme et neutralisation par la soude, la totalité du [³H]5'-cAMP produit est convertie en [³H]adénosine par incubation avec le 5'-nucléotidase du venin de serpent. La [³H]adénosine et le [³H]cAMP n'ayant pas réagi sont séparés par chromatographie sur une colonne AG 1-X2 (résine d'échange d'ions) avec l'eau pour éluant. La radioactivité est quantifiée dans un compteur à liquide de scintillation après addition d'une solution scintillante. Les essais sont effectués deux ou trois fois.

Les composés à tester sont dilués dans un milieu tampon contenant 0,1 % v/v de DMSO.

III -7-3- Critères de validité.

Le pourcentage de cAMP hydrolysé doit être compris entre 6 et 25 %. L'inhibition par le Rolipram à 0,1 mM testé simultanément doit être supérieure à 35 %. La radioactivité mesurée sans l'enzyme doit être inférieure à 8000 DPM.

REFERENCES

Alexander A.G., Wilson J.W., Holgate S.T., Kay A.B., "The contribution of inflammatory cells to the pathogenesis of asthma", 1991, *dans* : Pharmacology of Asthma, Page C.P., Barnes P.J., Editions Springer-Verlag, 27-51.

Arm J.P., "Lipoxygenase derivatives in asthma", 1993, *dans* : New Concepts in Asthma, Tarayre J.P., Vargaftig B., Carilla E., Editions MacMillan, 114-136.

Armstrong D.W., DeMond W., Alak A., Hinze W.L., Riehl T., Bui K.H., "Liquid chromatographic separation of diastereoisomers and structural isomers of cyclodextrin-bonded phase", *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 234-237.

Badimon J.J., Fuster V., Chesebro J.H., Badimon L., "Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease", *Circulation*, 1993, **87** (Suppl. II), II3-II16.

Baginski I., Commerçon A., Tocqué B., Colson G., Zerial A., "Selective inhibition of tyrosine protein kinase by a synthetic multisubstrate analog", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **165**, 1324-1330.

Barnes P.J., Chung K.F., Page C.P., "Inflammatory mediators", 1991, *dans* : Pharmacology of Asthma, Page C.P., Barnes P.J., Editions Springer-Verlag, 53-106.

Barnes P.J., "New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma", *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1989, **83**, 1013-1026.

Barnes P.J., "Overview of current asthma therapy", 1992, *dans* : New Drugs for Asthma (volume 2), Barnes P.J., Editions IBC Technical Services Ltd., 1-17.

Bauriedel G., Kandolf R., Welsch U., Höfling B., "Mechanismen der Re-Stenosierung nach Angioplastie", *Z. Kardiol.*, 1994, **83** (Suppl.4), 31-41.

Bays H.E., Dujovne C.A., "Drugs for the treatment of patients with high cholesterol blood levels and other dyslipidemias", 1994, *dans* ; Progress in Drug Research (Volume 43), Jucker E., Editions Birkhäuser Verlag, 9-41.

Becker A.E., "The urge to prevent atherosclerosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty", *Circulation*, 1992, **85**, 1632-1633.

Bennett C.F., Chiang M.-Y., Monia B.P., Crooke S.T., "Regulation of 5-lipoxygenase-activating protein expression in HL-60 cells", *Biochem. J.*, 1993, **289**, 33-39.

Bjornsdottir U.S., Bush R.K., "Leukotriene antagonists and inhibitors", *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 1993, **13**, 861-890.

Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A., "Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol", *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 6188-6194.

Boyington J.C., Gaffney B.J., Mario Amzel L., "The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase", *Science*, 1993, **260**, 1482-1486.

Brooks D.W., Bell R.L., Carter G.W., Dube L.M., Rubin P.D., "Zileuton", *Drugs of the Future*, 1993 a, **18**, 616-618.

Brooks D.W., Summers J.B., Stewart A.O., Bell R.L., Bouska J., Lanni C., Young P.R., Rubin P., Carter G.W., "Novel inhibitors of leukotriene biosynthesis", 1993 b, *dans : Perspectives in Medicinal Chemistry*, Testa B., Kyburz E., Fuhrer W., Giger R., Editions Verlag Helvetica Chimica Acta, 119-134.

Brown M., Goldstein J., "Les récepteurs des LDL, le cholestérol et l'athérosclérose", *Pour la Science*, 1985, 62-71.

Brown M.S., Goldstein J.L., "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis", *Science*, 1986, **232**, 34-47.

Brugge J.S., "New intracellular targets for therapeutic drug design", *Science*, 1993, **260**, 918-919.

Brugge J.S., "Protein:protein interactions involved in intercellular signal transduction", *Chemistry & Biology*, 1994, xii-xiii.

Burke T.R., "Protein-tyrosine kinase inhibitors", *Drugs of the Future*, 1992, **17**, 119-131.

Burney P., "Epidemiology of asthma", *Allergy*, 1993, **48**, 17-21.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M., "Allergy and immune defence : common IgE-dependent mechanisms or divergent pathways", 1993, *dans : New Concepts in Asthma*, Tarayre J.P., Vargaftig B., Carilla E., Editions MacMillan, 1-16.

Carini D.J., Duncia J.V., Johnson A.L., Chiu A.T., Price W.A., Wong P.C., Timmermans P.B.M.W., "Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : N-[(benzyloxy)benzyl]imidazoles and related compounds as potent antihypertensives", *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 1330-1336.

Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B., "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing", *Cancer Research*, 1987, **47**, 936-942.

Carroll N., Elliot J., Morton A., James A., "The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993, **147**, 405-410.

Carter G.W., Young P.R., Albert D.H., Bouska J., Dyer R., Bell R.L., Summers J.B., Brooks D.W. "5-lipoxygenase activity of Zileuton", *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1991, **256**, 929-937.

Chanarin N., Johnston S.L., "Leukotrienes as a target in asthma therapy", *Drugs*, 1994, **47**, 12-24.

Christensen S.B., Torphy T.J., "Isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors as antiasthmatic agents", *Annu. Rep. Med. Chem.*, 1994, **29**, 185-194.

Clark M.T., Coburn R.A., Evans R.T., Genco R.J., "5-(alkylsulfonyl)salicylanilides as potential dental antiplaque agents", *J. Med. Chem.*, 1986, **29**, 25-29.

Clavey V., "Structure des apolipoprotéines et leur rôle dans le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme", *Méd. et Nut.*, 1990, **XXVI**, 132-140.

Corrigan C.J., Bentley A., Robinson D.S., Hamid Q., Ying S., Azzawi M., Bradley B., Durham S.R., Kay A.B., "The role of T-lymphocytes in asthma", 1993, *dans : New Concepts in Asthma*, Tarayre J.P., Vargaftig B., Carilla E., Editions MacMillan, 153-161.

Crowley S.T., Dempsey E.C., Horwitz K.B., Horwitz L.D., "Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate", *Circulation*, 1994, **90**, 1908-1918.

David Nicholson C., Shahid M., "Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes", 1992, *dans : New Drugs for Asthma (volume 2)*, Barnes P.J., Editions IBC Technical Services Ltd., 51-67.

Davies R.J., Devalia J.L., "Epithelial Cells", *Br. Med. Bull.*, 1992, **48**, 85-96.

Dawson M.I., Hobbs P.D., Chan R.L., Chao W.-R., Fung V.A., "Aromatic retinoic acid analogues. Synthesis and pharmacological activity", J. Med. Chem., 1981, **24**, 583-592.

Dawson M.I., Hobbs P.D., Derdzinski K., Chan R. L.-S., Gruber J., Chao W.-R., Smith S., Thies R.W., Schiff L.J., "Conformationally restricted retinoids", J. Med. Chem., 1984, **27**, 1516-1531.

DeShong P., Kell D.A., Sidler D.R., "Intermolecular and intramolecular azomethine ylide [3+2] dipolar cycloadditions for the synthesis of highly functionalized pyrroles and pyrrolidines", J. Org. Chem., 1985, **50**, 2309-2315.

Dunn C.D.R., "Chapter one : Introduction", 1991, *dans* : A Review of the Pathology and Management of Asthma, Dunn C.D.R., Editions PJB Publications Ltd., 1-15.

Duplantier A.J., Cheng J.B., "Emerging opportunities in the treatment of asthma and allergy", Annu. Rep. Med. Chem., 1994, **29**, 73-81.

Durand A., Boitard M., Carraz G., "Synthèses et activité antianoxique de vinylsulfones et de l'éthylbutylacétamide", Eur. J. Med. Chem., 1980, **15**, 67-70.

Dusserre E., Bourdillon M.C., Pulcini T., Berthezene F., "Decrease in high density lipoprotein binding sites is associated with decrease in intracellular cholesterol efflux in dedifferentiated aortic smooth muscle cells", Biochim. Biophys. Acta, 1994, **1212**, 235-244.

Eitel M., Pindur U., "Selective Wittig reactions for the synthesis of variously substituted 2-vinylindoles", Synthesis, 1989, 364-367.

Ellingboe J.W., Lombardo L.J., Alessi T.R., Nguyen T.T., Guzzo F., Guinosso C.J., Bullington J., Browne E.N.C., Bagli J.F., Wrenn J., Steiner K., McCaleb M.L., "Antihyperglycemic activity of novel naphthalenyl-(3H)-1,2,3,5-oxathiadiazole-2-oxides", J. Med. Chem., 1993, **36**, 2485-2493.

Epstein S.E., Speir E., Unger E.F., Guzman R.J., Finkel T., "The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty", J. Am. Coll. Cardiol., 1994, **23**, 1278-1288.

Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G., Striegl G., Jürgens G., "Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein", Chem. Res. Toxicol., 1990, **3**, 77-92.

Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M., "Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein", Free Rad. Res. Comms, 1989, **6**, 67-75.

Fontecave M., Pierre J.-L., "Activation et toxicité de l'oxygène. Principes des thérapeutiques antioxydantes", Bull. Soc. Chim. Fr., 1991, **128**, 505-520.

Ford-Hutchinson A.W., "FLAP : a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes", Trends Pharmacol. Sci., 1991, **12**, 68-70.

Ford-Hutchinson A.W., Gresser M., Young R.N., "5-lipoxygenase", Annu. Rev. Biochem., 1994, **63**, 383-417.

Ford-Hutchinson A.W., Rodger I.W., Jones T.R., "Novel therapeutic strategies for the treatment of human bronchial asthma", DN&P, 1992, **5**, 542-549.

Forrester J.S., Fishbein M., Helfant R., Fagin J., "A paradigm for restenosis based on cell biology : clues for the development of new preventive therapies", J. Am. Coll. Cardiol., 1991, **17**, 758-769.

Frey E.A., Nicholson D.W., Metters K.M., "Characterization of the leukotriene D₄ receptor in dimethylsulphoxyde-differentiated U937 cells : comparison with the leukotriene D₄ receptor in human lung and guinea-pig lung", Eur. J. Pharmacol., 1993, **244**, 239-250.

Fruchart J.-C., Broutin-Hanaire H., "Les interactions lipoprotéines-cellules : les récepteurs des lipoprotéines", Les Entretiens du Carla, 1987, **VI**, 139-157.

Ginsberg H.N., "Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis", Med. Clin. N. Amer., 1994, **78**, 1-20.

Glamkowski E.J., Reitano P.A., "Synthesis and evaluation for diuretic activity of 1-substituted 6-chloro-5-sulfamylindolines", J. Med. Chem., 1979, **22**, 106-109.

Glassberg M.K., Ergul A., Wanner A., Puett D. "Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells", Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1994, **10**, 316-321.

Goldie R.G., Paterson J.W., Lulich K.M., "Pharmacology and therapeutics of β -adrenoreceptor agonists", 1991, dans : Pharmacology of Asthma, Page C.P., Barnes P.J., Editions Springer-Verlag, 167-205.

Goldstein J.L., Brown M.S., "The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis", Ann. Rev. Biochem., 1977, **46**, 897-930.

Gotto A.M., "A symposium : antioxidants and lipid metabolism. Overview of current issues in management of dyslipidemia", *Am. J. Cardiol.*, 1993, **71**, 3B-8B.

Grant M.B., Wargovich T.J., Ellis E.A., Caballero S., Mansour M., Pepine C.J., "Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells", *Circulation*, 1994, **89**, 1511-1517.

Gribble G.W., Lord P.D., Skotnicki J., Dietz S.E., Eaton J.T., Johnson J.L., "Reactions of sodium borohydride in acidic media. I. Reduction of indoles and alkylation of aromatic amines with carboxylic acids", *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 7812-7814.

Grüntzig A., "Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis", *Lancet*, 1978, 263.

Grüntzig A.R., Senning Ä., Siegenthaler W.E., "Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis", *N. Engl. J. Med.*, 1979, **301**, 61-68.

Gutteridge J.M.C., Halliwell B., "The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems", *Trends Biochem. Sci.*, 1990, **15**, 129-135.

Herrman J.-P.R., Hermans W.R.M., Vos J., Serruys P.W., "Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. Part I.", *Drugs*, 1993, **46**, 18-52.

Hirst S.J., Barnes P.J., Twort C.H.C., "Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum ant platelet-derived growth factor", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1992, **7**, 574-581.

Holgate S.T., "Asthma : past, present and future", *Eur. Respir. J.*, 1993, **6**, 1507-1520.

Holmes H.L., Lee C.C., Mooradian A., "A possible route to the location of the nitrogen atom in morphine. II. The synthesis of 3,4-dimethoxy-9-methylphenanthrene", *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 1998-1999.

Huang F.-C., Scott Shoupe T., Lin C.J., Lee T.D.Y., Chan W.-K., Tan J., Schnapper M., Suh J.T., Gordon R.J., Sonnino P.A., Sutherland C.A., Van Inwegen R.G., Coutts S.M., "Differential effects of a series of hydroxamic acid derivatives on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase from neutrophils and 12-lipoxygenase from platelets and their *in vivo* effects on inflammation and anaphylaxis", *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 1836-1842.

Ip J.H., Fuster V., Badimon L., Badimon J., Taubman M.B., Chesebro J.H., "Syndromes of accelerated atherosclerosis : role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation", *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1990, **15**, 1667-1687.

Ireland R.E., Thompson W.J., "The facile reduction of methoxyethoxymethyl esters with lithium triethylborohydride", *Tetrahedron Lett.*, 1979, **42**, 4705-4708.

Irwin S., "Comprehensive observational assessment : Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse", *Psychopharmacologia*, 1968, **13**, 222-257.

Jeffery P.K., "Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, **143**, 1152-1158.

Jeffery P.K., "Pathology of asthma", *Br. Med. Bull.*, 1992, **48**, 23-39.

Kadin S.B., "Carboxamide compounds as SRS-A antagonists", *Eur. Pat. Appl. EP 50,977 (Cl. C07C103/30)*, 1982, 65 pp.

Kahn A., "La transmission du signal en amont et en aval de Ras", *Médecine / Sciences*, 1992, **8**, 1097-1099.

Kamitori Y., Hojo M., Masuda R., Yoshida T., "Alumina as an versatile catalyst for the selective acetalization of aldehydes", *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 4767-4770.

Knox A.J., "Airway re-modelling in asthma : role of airway smooth muscle", *Clinical Science*, 1994, **86**, 647-652.

Kono T., "Insulin-sensitive cAMP phosphodiesterase in rat adipose tissue", *Methods in Enzymology*, 1968, **159**, 745-751.

Kreuzer J., von Hodenberg E., "The role of apolipoproteins in lipid metabolism and atherogenesis : aspects in man and mice", *J. Hypertension*, 1994, **12**, 113-118.

Kuitert L., Barnes N.C., "Leukotriene antagonists", 1992, *dans : New drugs for asthma (volume 2)*, Barnes P.J., Editions IBC Technical Services Ltd., 78-91.

Kuzuya M., Naito M., Funaki C., Hayashi T., Asai K., Kusuya F., "Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells", *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **1096**, 155-161.

Laitinen L.A., Laitinen A., "The pathology of asthma : an overview", 1991, *dans : Pharmacology of Asthma*, Page C.P., Barnes P.J., Editions Springer-Verlag, 1-25.

Landry Y., Bronner C., "Le mastocyte est-il encore d'actualité dans l'asthme et l'hyperréactivité bronchique?", 1991, *dans : Asthme et Hyperréactivité Bronchique*, Advenier C., Elghozi J.-L., Meyer P., Editions Masson, 57-70.

Levitzki A., Gilon C., "Tyrosinases as molecular tools and potential antiproliferative drugs", *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, **12**, 171-174.

Löffler A., Himbert G., "A new pathway to (4-aryl-1,3-butadiynyl)amines", *Synthesis*, 1990, 125-126.

MacLeod D.C., Strauss B.H., de Jong M., Escaned J., Umans V.A., van Suylen R.-J., Verkerk A., de Feyter P.J., Serruys P.W., "Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions", *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **23**, 59-65.

Marples B.A., Saint C.G., Traynor J.R., "Regiochemistry of nucleophilic opening of β -substituted styrene oxides with thiolate anions : model experiments in the synthesis of leukotriene analogues", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1986, 567-574.

Maximilian Buja L., Willerson J.T., "Role of inflammation in coronary plaque disruption", *Circulation*, 1994, **89**, 503-505.

McColl S.R., Betts W.H., Murphy G.A., Cleland L.G., "Determination of 5-lipoxygenase activity in human polymorphonuclear using high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 1986, **378**, 444-449.

McMillan R.M., Walker E.R.H., "Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors", *Trends Pharmacol. Sci.*, 1992, **13**, 323-330.

Meskens F.A.J., "Methods for the preparation of acetals from alcohols or oxiranes and carbonyl compounds", *Synthesis*, 1981, 501-522.

Montefort S., Baker J., Roche W.R., Holgate S.T., "The distribution of adhesive mechanisms in the normal bronchial epithelium", *Eur. Respir. J.*, 1993, **6**, 1257-1263.

Mordasini R., Walther A., Riesen W., "Hypolipémiants", 1989, *dans* : Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Schorderet M., Editions Frison-Roche et Slatkine, 509-519.

Musser J.H., Kreft A.F., "5-lipoxygenase : properties, pharmacology, and the quinolinyl(bridge)aryl class of inhibitors", *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 2501-2524.

Musser J.H., "Leukotriene D₄ receptor antagonists : a new approach to antiasthma drug therapy", *DN&P*, 1989, **2**, 202-213.

Nagasawa J., Ichimura K., "Water-soluble photosensitive vinyl alcohol polymer derivatives and their manufacture", *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 04 08,706 [92 08,706] (Cl. C08F8/30)* : *Chem. Abstr.*, 1992, **116**, 215606b.

Noveral J.P., Rosenberg S.M., Anbar R.A., Pawlowski N.A., Grunstein M.M., "Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells", *Am. J. Physiol.*, 1992, **263**, L317-L324.

Nsouli T.M., Nsouli S.M., Bellanti J.A., "Neuroimmunoallergic inflammation : new pathogenetic concepts and future perspectives of immediate and late allergic reactions : part I", *Annals of allergy*, 1988 a, **60**, 379-390.

Nsouli T.M., Nsouli S.M., Bellanti J.A., "Neuroimmunoallergic inflammation : new pathogenetic concepts and future perspectives of immediate and late allergic reactions : part II", *Ann. Allergy*, 1988 b, **60**, 483-494.

Ong K.K., Rennie P.I.C., "Assay errors of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase activity based on the recovery of adenosine alone using an anionic-exchange resin column", *Anal. Biochem.*, 1976, **76**, 53-62.

Organic Syntheses, 1967, Collective Volume **IV**, Rabjohn, Editions Wiley, 657.

Panettieri R.A., Yadvish P.A., Kelly A.M., Rubinstein N.A., Kotlikoff M.I., "Histamine stimulates proliferation of airway smooth muscle and induces *c-fos* expression", *Am. J. Physiol.*, 1990, **259**, L365-L371.

Parthasarathy S., Wieland E., Steinberg D., "A role for endothelial cell lipoygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, **86**, 1046-1050.

Pearce F.L., "Properties of human lung mast cells", 1993, dans : New Concepts in Asthma, Tarayre J.P., Vargaftig B., Carilla E., Editions MacMillan, 72-81.

Peterli S., Hubmann D., Séquin U., "7. Nitrostyrene derivatives of adenosine 5'-glutarates modified with an alkyl spacer and their inhibitory activity on epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase", Helv. Chim. Acta, 1994, **77**, 59-69.

Powis G., "Signalling targets for anticancer drug development", Trends Pharmacol. Sci., 1991, **12**, 188-194.

Practical Organic Chemistry, 1989, Vogel's, Editions Longman Scientific & Technical, 496-497.

Prieto J., Beatty P.G., Clark E.A., Patarroyo M., "Molecules mediating adhesion of T and B cells, monocytes and granulocytes to vascular endothelial cells", Immunology, 1988, **63**, 631-637.

Rama Rao A.V., Pulla Reddy S., Rajarathnam Reddy E., "Short and efficient syntheses of coriolic acid", J. Org. Chem., 1986, **51**, 4158-4159.

Rappoport Z., Sheradsky T., "The ultraviolet spectra of nitrophenylhydrazones in neutral solution ; substituent and solvent effects", J. Chem. Soc. (B), 1968, 277-291.

Robins M.J., Barr P.J., "Nucleic acid related compounds. 39. Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleosides", J. Org. Chem., 1983, **48**, 1854-1862.

Ross R., "The pathogenesis of atherosclerosis : perspective for the 1990s", Nature, 1993 a, **362**, 801-809.

Ross R., "Atherosclerosis : a defense mechanism gone awry", Am. J. Pathol., 1993 b, **143**, 987-1002.

Santrucek M., Krepelka J., "Antioxidants- Potential chemotherapeutic agents", Drugs of the Future, 1988, **13**, 973-996.

Savoy J.A., Junod A.F., "Anti-asthmatiques", 1989, 255-266, dans : Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Shorderet M., Editions Frison-Roche et Slatkine, 255-266.

Schwartz C.J., Valente A.J., Sprague E.A., Kelley J.L., Nerem R.M., "The pathogenesis of atherosclerosis : an overview", Clin. Cardiol., 1991 a, **14**, I1-I16.

Schwartz R.S., Huber K.C., Edwards W.D., Camrud A.R., Jorgensen M., Holmes D.R., "Coronary restenosis and the importance of mural thrombus : results in a porcine coronary model. Abstract.", Circulation, 1991 b, **84**, II71.

Sigel H., Flierl C., Griesser R., "On the kinetics and mechanism of the decomposition of hydrogen peroxide, catalyzed by the Cu^{2+} -2,2'-bipyridyl complex", J. Am. Chem. Soc., 1969, **91**, 1061-1064.

Smith S.F., Page C.P., Barnes P.J., Flower R.J., "Glucocorticosteroids in asthma", 1991, *dans* : Pharmacology of Asthma, Page C.P., Barnes P.J., Editions Springer-Verlag, 227-260.

Solladié G., Urbano A., Stone G.B., "Application of sodium amalgam reductive elimination of allylic dibenzoates to the total synthesis of 5(S)-12(R) leukotriene B₄", Tetrahedron Lett., 1993, **34**, 6489-6492.

Stary H.C., "Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults", Arteriosclerosis Suppl. I, 1989, **9**, I.19-I.32.

Steinberg D., "Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis", Atherosclerosis Rev., 1988, **18**, 1-23.

Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L., "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity", N. Engl. J. Med., 1989, **320**, 915-924.

Steinbrecher U.P., Zhang H., Lougheed M., "Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis", Free Rad. Biol. Med., 1990, **9**, 155-168.

Szelenyi I., Bölskei P., "Future trends in asthma therapy", DN&P, 1989, **2**, 270-277.

Takagi T., Suzuki T., "Effect of temperature on chiral and achiral separations of diacylglycerol derivatives by high-performance liquid chromatography on a chiral stationary phase", J. Chromatogr., 1992, **625**, 163-168.

Tamura A., Sato T., Fujii T., "Antioxidant activity of indapamide and its metabolite", Chem. Pharm. Bull., 1990, **38**, 255-257.

Tewari R.S., Chaturvedi S.C., "A facile synthesis of substituted 4-acetylstilbenes", *Synthesis*, 1978, 616-617.

Thakkar K., Geahlen R.L., Cushman M., "Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of polyhydroxylated stilbene analogues of piceatannol", *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2950-2955.

Thomas C. E., Jackson R. L., "Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent and independent oxidation of low density lipoproteins", *J. Pharm. Exp. Therapeutics*, 1990, **256**, 1182-1188.

Tomlinson P.R., Wilson J.W., Stewart A.G., "Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture", *Br. J. Pharmacol.*, 1994, **111**, 641-647.

Tonnel A.B., Capron M., Gosset Ph., Joseph M., "Rôle des cellules inflammatoires dans l'asthme", 1991, *dans : Asthme et Hyperréactivité Bronchique*, Advenier C., Elghozi J.-L., Meyer P., Editions Masson, 44-56.

Torphy J.T., Zhou H.-L., Cieslinski L.B., "Stimulation of *beta* adrenoreceptors in a human monocyte cell line (U937) up-regulates cyclic AMC-specific phosphodiesterase activity", *J. Pharm. Ther.*, 1992, **2633**, 1195-1205.

Traxler P.M., Wacker O., Bach H.L., Geissler J.F., Kump W., Meyer T., Regenass U., Roesel J.L., Lydon N., "Sulfonylbenzoyl-nitrostyrenes : potential bisubstrate type inhibitors of the EGF-receptor tyrosine protein kinase", *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 2328-2337.

Turpin G., "Hyperlipidémie et artères", *Encyclopédie de l'artère*, 1989, **1**, 34-41.

Ulan J.G., Kuo E., Maier W.F., "Effect of lead acetate in the preparation of the Lindlar catalyst", *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 3126-3132.

van der Wal A.C., Becker A.E., van der Loos C.M., Das P.K., "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology", *Circulation*, 1994, **89**, 36-44.

Vasiljeva L.L., Manukina T.A., Demin P.M., Lapitskaja M.A., Pivnitsky K.K., "Synthesis, properties, and identification of epimeric hepoxilins (-)-(10R)-B₃ and (+)-(10S)-B₃", *Tetrahedron*, 1993, **49**, 4099-4106.

Viehe H.G., Merényi R., Stella L., Janousek Z., "Capto-dative substituent effects in syntheses with radicals and radicophiles", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1979, **18**, 917-932.

Wadsworth W.S., Emmons W.D., "The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis", *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 1733-1738.

Walldius G., Regnström J., Nilsson J., Johansson J., Schäfer-Elinder L., Moelgaard J., Hådel K., Olsson A.G., Carlson L.A., "A symposium : antioxidants and lipid metabolism. The role of lipids and antioxydative factors for development of atherosclerosis. The Probocol Quantitative Regression Swedish Trial (PQRST)", *Am. J. Cardiol.*, 1993, **71**, 15B-19B.

Windridge G.C., Jorgensen E.C., "1-hydroxybenzotriazole as a racemization-suppressing reagent for the incorporation of *im*-benzyl-*L*-histidine into peptides", *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 6318-6319.

Winkler J.D., Sarau H.M., Foley J.J., Mong S., Crooke S.T., "Leukotriene B₄-induced homologous desensibilization of calcium mobilization and phosphoinositide metabolism in U-937 cells", *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1988, **246**, 204-210.

Witkowski S., Koteswar Rao Y., Premchandran R.H., Halushka P.V., Fried J., "Total synthesis of (+)-10,10-difluorothromboxane A₂ and its 9, 11 and 15 stereoisomers", *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8464-8472.

Witztum J.L., "Current approaches to drug therapy for the hypercholesterolemic patient", *Circulation*, 1989, **80**, 1101-1114.

Wright J.B., Willette R.E., "Antidiabetic agents. N⁴-arylsulfonylsemicarbazides", *J. Med. Pharm. Chem.*, 1962, **5**, 815-822.

Wülfert E., "Les perspectives de l'industrie pharmaceutique européenne", *Chimie Nouvelle*, 1991, **9**, 1013-1020.

Yi Zhang Y., Rådmark O., Samuelsson B., "Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase : effects on enzyme activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 485-489.

ABSTRACT.

Atherosclerosis, restenosis and asthma are three multifactorial diseases in which oxidative processes occur (LDL oxidation in the case of atherosclerosis, and to a lower extent in the case of restenosis ; oxidation-reduction involved in the mechanism of action of the 5-lipoxygenase which generates production of peptidoleukotrienes - products which induce bronchoconstriction -). On the other hand, we notice an increased proliferation of vascular smooth muscle cells (atherosclerosis, restenosis) or of bronchial smooth muscle cells (asthma).

The start of our work has been indapamide, a drug used for hypertension treatment, but like vitamin E, also capable of catching free radicals. During the first stage, we tried to modify the original structure of the indapamide in order to reinforce its free radical scavenger properties and to obtain compounds acting in LDL oxidation inhibition. After having checked that these molecules were effectively antioxidants, we then made pharmacomodulations in order to produce compounds able to link with the 5-lipoxygenase which may inhibit this enzyme. On the other hand, having compared structure of some of these compounds with tyrosine kinase inhibitors, we made some modifications to obtain molecules capable of inhibiting smooth muscle cell proliferation induced by growth factors.

Several different pharmacological studies were made on the synthesised compounds. In general these tests reported that the molecules containing a -CO- group are more active in the inhibition of oxidative mechanism. These tests also revealed that the compounds containing a -SO₂- group are more active in the inhibition of smooth muscle cell proliferation.