



HAL
open science

Optimisation du concept d'inhibition de Cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate

Nicolas Beziere

► **To cite this version:**

Nicolas Beziere. Optimisation du concept d'inhibition de Cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate. Médicaments. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT : . tel-00519646

HAL Id: tel-00519646

<https://theses.hal.science/tel-00519646>

Submitted on 21 Sep 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse
en vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique
Spécialité : Sciences du Médicament

Soutenue publiquement le 26 Septembre 2008 par

Nicolas BEZIERE

Optimisation du concept
d'inhibition de Cyclooxygénase
dans le traitement du cancer de la prostate

Membres du Jury :

Directeur de Thèse : • Nicole Pommery, Maître de Conférences de l'Université de Lille 2

Rapporteurs : • Françoise Guéritte, Directeur de Recherche de l'INSERM - ICSN
• Jean Martinez, Professeur de l'Université de Montpellier 1, 2 - IBMM

Examineurs : • Jean - Pierre Hénichart, Professeur de l'Université de Lille 2
• Oleg Melnyk, Directeur de Recherche du CNRS - IBL
• Grégoire Prévost, Directeur de la Recherche en Oncologie - IPSEN

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Hénichart ; Professeur de l'Université de Lille 2

Je voudrais vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir permis de profiter de la qualité de vos enseignements et de la confiance que vous m'avez accordée en me laissant poursuivre une thèse dans votre équipe. Vos conseils, aussi bien professionnels que relationnels, m'ont été très utiles.

Madame Nicole Pommery ; Maître de Conférences de l'Université de Lille 2

Je tiens à vous remercier de m'avoir fait l'honneur d'être mon directeur de thèse pendant ces trois années. Nos fréquentes discussions ont été sources d'inspiration, de motivation et même de divertissement, ce qui a souvent été le bienvenu.

Madame Françoise Guéritte ; Directeur de recherche de l'INSERM au pôle Substances Naturelles - Plantes à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – Rapporteur

Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Vos multiples domaines d'expertises permettront d'apporter les commentaires et remarques nécessaires à l'évaluation et à l'avancement du travail.

Monsieur le Professeur Jean Martinez ; Professeur des Universités de Montpellier 1, 2, Directeur de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron - Rapporteur

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je suis persuadé que vos compétences pourront apporter les critiques et éclaircissements indispensables à l'appréciation du travail.

Monsieur Oleg Melnyk ; Directeur de Recherche du CNRS, responsable du groupe Biomolécules et Micro-Nanotechnologies à l'Institut de Biologie de Lille (IBL)

Merci d'avoir accepté de siéger dans le Jury lors de ma soutenance de thèse, et un grand merci pour m'avoir accepté dans votre laboratoire et pour m'avoir encadré pendant une partie de ma thèse. Nos échanges ont toujours été enrichissants et ont permis d'orienter le travail dans la bonne direction, et ce toujours dans la bonne humeur.

Monsieur Grégoire Prévost, Directeur de la Recherche en Oncologie - IPSEN

Vous voir siéger dans mon Jury de thèse est pour moi un honneur, et je vous remercie par avance de tous les commentaires que vous pourrez formuler.

Je tiens à prolonger mes remerciements à l'ensemble des personnes suivantes, qui ont participé de près (ou de loin !) au bon déroulement de ma thèse dans les divers laboratoires que j'ai pu fréquenter au cours de ces trois années :

Jean Pommery et Amélie Lemoine : merci encore d'avoir réalisé respectivement les évaluations sur sang total et les tests de prolifération cellulaire. Sans vous, mes tableaux auraient été bien vides...

Laurence Goossens, merci pour toutes les discussions qui ont facilité mon intégration et mon travail dans le laboratoire.

Raymond Houssin, je vous suis reconnaissant pour toutes vos interventions chimiques, et je le répète : la fréquence de vos irruptions dans le laboratoire n'avait d'égale que leur qualité.

Hervé Vezin, je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté au travail et pour la manipulation de l'impressionnant appareil de mesure de RPE.

Régis Bordet, Elodie Descamps et Thavarak Ouk, merci à vous (et au reste du laboratoire de pharmaco bien sûr) de m'avoir initié à la manipulation d'animaux et à la vasorelaxation. Et toujours dans la bonne humeur !

Je tiens bien entendu à remercier tous les membres, permanents ou non, passés et présents, de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol. Votre gentillesse et les discussions (parfois) constructives m'ont bien aidé. Je pense notamment à Antonio, Aurélie, Céline, Christophe, Delphine, Fred K. et L., Isabelle, Jamal, Nicolas W., Pauline, Régis, Sébastien et Sylvia.

J'étends ces remerciements à toute l'équipe des laboratoires de l'IBL, qui ont su me faire profiter de leur compétences (chimiques, culinaires ou autres ...) pendant les quelques mois passés là bas. Alex, Annick, Clément, Déborah, Hervé, Manu, Marion, Nabil, Nathalie, Reda, Rémi, Sozic, Stéphane, et tous ceux qui sont passés trop vite pour que je puisse retenir leur prénom.

Un remerciement spécial à Madame Leroy, ma prof de physique-chimie préférée, capable de faire naître une vocation de chimiste chez n'importe qui. Sans vous, je n'en serais pas là.

Bien évidemment, un grand merci à mes parents et à mon frère. Leur soutien et leurs conseils tout au long de mes études ont été précieux.

Emir, Ben, Pierre, Rom et les deux Nico : merci !

Et enfin, merci Marion d'être toujours là pour rendre notre vie tellement plus agréable.

ABREVIATIONS

AA	Acide Arachidonique
AC	Anhydrase Carbonique
Ach	Acétylcholine
AcOEt	Acétate d'Ethyle
ACT	Anti-Chymotrypsine α -1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Facteur Inducteur d'Apoptose
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BOC	tert-ButylOxyCarbonyl
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i> , Kinase dépendante des cyclines
CINOD	<i>Cyclooxygenase-Inhibiting Nitric Oxide Donor</i> - Inhibiteur de cyclooxygénase donneur de NO
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COX	Cyclooxygénase
Cyclo	Cyclohexane
DCM	DiChloroMéthane
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i> - Facteur relaxant dérivé de l'endothelium
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> - Facteur de Croissance des Fibroblastes
FMOC	fonction FluoroMéthylméthOxyCarbonyle
GMP	Guanosine MonoPhosphate
GST	<i>Glutathion-S-Transférase</i>
GTP	Guanosine TriPhosphate
Hept	Heptane
hK	<i>Human Kallikrein</i> - Kallikréine humaine
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> - Facteur de croissance similaire à l'insuline
IR	Infra Rouge
LC/MS	<i>Liquid Chromatography / Mass Spectrometry</i> - Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse
LH-RH	<i>Luteinizing Hormone - Releasing Hormone</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> - Kinase activé par un mitogène
MeOH	Méthanol
MMP	<i>Matrix MetalloProtease</i> - Métalloprotéase matricielle
NF- κ B	<i>Necrosis Factor κB</i> - Facteur nécrosant κ B
NO	<i>Nitric Oxide</i> - Monoxyde d'azote

NOS	NO-Synthétase
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAF	Polyposes Adénomateuses Familiales
PDK	<i>3-Phosphoinositide-Dependent Kinase</i> - Kinase dépendant du 3-phosphoinositide
PE	PhénylEphrine
PG	ProstaGlandine
PGHS	Prostaglandine Endoperoxyde G/H Synthétase
PL	PhosphoLipase
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> - Antigène spécifique prostatique
Rf	Rapport Frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
Sg	Séménogeline
SNP	<i>Sodium NitroPrusside</i> - Nitroprussiate de sodium
SOD	SuperOxyde Dismutase
TFA	<i>TriFluoroAcetic Acid</i> - Acide trifluoroacétique
TGI	Tractus Gastro-Intestinal
THF	TétraHydroFurane
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Facteur nécrosant de tumeur
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptose Inducing Ligand</i> - Ligand inducteur d'apoptose lié au TNF
TX	ThromboXane
UV	UltraViolet
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i> - Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

SOMMAIRE

Abréviations	4
Sommaire	6
INTRODUCTION	9
PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU CANCER ET IMPLICATIONS POUR LE TRAITEMENT DE CETTE PATHOLOGIE.....	11
A - La pathologie.....	12
1. Incidence et causes du cancer.....	12
2. Le cancer : progression de la maladie	15
3. Les spécificités du cancer de la prostate	22
B - Approches thérapeutiques du cancer de la prostate	23
1. Dépistage par la PSA.....	23
2. Prostatectomie totale	23
3. Radiothérapie	23
4. Hormonothérapie.....	24
5. Chimiothérapie	26
6. Voies de recherche	28
LA CYCLOOXYGENASE ET SON INHIBITION.....	31
A - La cyclooxygénase : deux sites catalytiques, plusieurs isoformes.....	32
1. Fonction principale : formation des prostanoïdes impliqués dans l'inflammation ..	32
2. COX : plusieurs isoformes	34
B - Inhibiteurs de la cyclooxygénase	41
1. Inhibiteurs non sélectifs	41
2. Inhibiteurs sélectifs (Singh P. et Mittal A., 2008).....	43
3. Inhibition de COX-2 : les autres applications	47
C - Implication de COX-2 dans la pathologie cancéreuse	50
1. Rôle de la cyclooxygénase dans les différents aspects de la pathologie (Fig. 16)...	50
2. Les inhibiteurs de cyclooxygénase comme anticancéreux.....	54
D - Conception de nouveaux inhibiteurs de cyclooxygénase.....	57
1. Profènes	57
2. Diarylpyrazoles	59
3. γ -Carbolines.....	66
E - Evaluation des dérivés diarylpyrazoles comme inhibiteurs de cyclooxygénase.....	69
F - Inhibition de la cyclooxygénase : conclusion	71
LA CONCEPTION D'UNE PRODRUG VECTORISABLE PAR ACTIVATION PAR L'ANTIGENE SPECIFIQUE PROSTATIQUE.....	72
A - Structure, expression et fonction de la PSA.....	73
1. Les protéases à sérine	73
2. Les kallikréines	73
3. Expression de la PSA et activation	74
4. Structure de la PSA et activité.....	76
B - La PSA dans le cancer de la prostate	80
1. Expression et métabolisation de la PSA dans le cancer de la prostate.....	80
2. Rôle de la PSA dans la pathologie	81
3. La mesure du taux circulant des différentes formes de PSA : le dépistage	82
C - Utilisation de la PSA pour la vectorisation d'un principe actif.....	84
1. L'émergence des vecteurs ciblant la PSA : étude bibliographique résumée.....	84
2. Notre conception de <i>prodrug</i>	88

D -	Stratégie de synthèse	93
1.	Voies de synthèse possibles	93
2.	Synthèse des peptides.....	94
3.	Activation de l'inhibiteur de cyclooxygénase.....	96
4.	Synthèse d'aminothioacides.....	98
5.	Couplage des thioacides et des azidoformates : synthèse de l'espaceur	99
E -	Evaluations pharmaco-chimiques	101
1.	Réarrangement après déprotection dans le cas des acides aminés simples.....	101
2.	Etude de la vectorisation de l'inhibiteur de cyclooxygénase par un peptide	103
F -	Conclusion du travail de vectorisation	107
LA CONCEPTION DE COMPOSES MIXTES.....		108
INHIBITEURS COX / DONNEURS DE NO.....		108
A -	NO : Découverte, origine endogène et rôle physiologique	109
1.	Biosynthèse de NO.....	109
2.	Principaux effets physiologiques	111
B -	Rôle du monoxyde d'azote dans le cancer	119
1.	NO et cancérogenèse (Fig. 45).....	119
2.	NO et angiogenèse	121
3.	NO et apoptose (Fig. 47).....	121
4.	NO et invasion (Xie K., Huang S., 2003)	125
C -	Intégration dans un contexte d'inhibiteur enzymatique : NO et COX.....	126
1.	Intérêt pharmacologique.....	126
2.	Les inhibiteurs de cyclooxygénase / donneurs de NO ou CINOD (<i>COX-Inhibiting Nitric Oxide Donor</i>)	128
D -	Conception de composés originaux inhibiteurs de cyclooxygénase donneurs de NO 135	
1.	Les différents donneurs de NO.....	135
2.	Choix des espaceurs	141
E -	Stratégie de synthèse : Inhibiteurs de COX / donneurs de NO	146
1.	Synthèse des espaceurs et de l'ester nitrique	146
2.	Synthèse des profènes donneurs de NO	148
3.	Synthèse des diarylpyrazoles (DAP) donneurs de NO (Fig. 58).....	150
4.	Synthèse des γ -carbolines donneurs de NO à espaceur aliphatique (Fig. 59).....	152
5.	Synthèse des γ -carbolines donneurs de NO à espaceur aromatique (Fig. 60).....	155
F -	Evaluations chimiques et pharmacologiques des composés mixtes.....	160
1.	Les Profènes	160
2.	Diarylpyrazoles	164
3.	Cinétiques de libération de NO	166
G -	Conclusion sur les composés mixtes inhibiteurs de cyclooxygénase donneurs de NO 181	
VECTORISATION PAR ACTION DE LA PSA ET AJOUT D'UN GROUPEMENT DONNEUR DE NO		182
A -	Travaux existants.....	183
1.	S-nitroso-peptide	183
2.	Vectorisation du NO par un substrat de la PSA	184
B -	Conception de la molécule	185
1.	Modification de la séquence peptidique.....	185
2.	Incorporation du groupement donneur de NO	185
C -	Synthèse et étude de la stabilité du peptide donneur de NO	187
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		189
BIBLIOGRAPHIE		193

ANNEXES	223
APPAREILLAGES ET TECHNIQUES	223
MATERIELS ET METHODES	223
MODES OPERATOIRES.....	223
APPAREILLAGES ET TECHNIQUES D'ANALYSE	224
1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	224
2. Chromatographie sur colonne	224
3. Points de fusion	224
4. Spectrométrie infrarouge.....	224
5. Résonance magnétique nucléaire	224
6. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	224
7. Synthèse peptidique automatisée	225
8. Chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse pour les peptides et composés 10 à 15	225
9. Détection de masse MALDI / TOF	225
10. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	225
MATERIEL ET METHODES :	226
1. Mesure des activités COX-1 et COX-2.....	226
2. Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire.....	227
3. Manipulations de Vasorelaxation.....	228
MODES OPERATOIRES.....	229

INTRODUCTION

Fréquent et grave, le cancer représente la première cause de mortalité prématurée et la seconde cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Son incidence est en augmentation permanente, même si le taux de mortalité moyen est en légère baisse. Le cancer de la prostate est, chez l'homme, la seconde cause de décès par cancer.

Une meilleure connaissance de la pathologie, de nouveaux outils de diagnostic (IRM...) et de traitement (radiothérapie, chimiothérapie...) contribuent à l'amélioration de la lutte contre cette maladie, même si, dans leur grande majorité, les traitements disponibles manquent encore fortement de sélectivité envers les cellules tumorales. De plus, le taux de mutations extrêmement élevé des cellules cancéreuses fait fréquemment apparaître de nouvelles résistances, augmentant le besoin de découverte de nouvelles molécules et de voies de traitement.

Dans le cas précis du cancer de la prostate, de nombreuses mutations et surexpressions, notamment enzymatiques, ont été mises en évidence ces dernières années, et c'est en particulier le cas de la cyclooxygénase. Cette enzyme impliquée dans la métabolisation de l'acide arachidonique semblerait, d'après un nombre croissant d'études épidémiologiques, précliniques et cliniques, constituer une cible intéressante dans le traitement de cette pathologie. Toutefois, d'une part le mécanisme d'action antitumoral des inhibiteurs de cyclooxygénase est loin d'être déterminé de manière exhaustive et, d'autre part, une toxicité inhérente à ces composés anti-inflammatoires non stéroïdiens fait actuellement débat dans le monde de la santé (toxicités gastrique, cardiovasculaire...). Comme toutes les autres formes de cancer, le ciblage des cellules cancéreuses reste donc un objectif majeur de recherche, les effets secondaires dus à l'action des thérapeutiques sur les cellules saines étant la source majeure de la déficience des chimiothérapies en termes d'activité et de toxicité. Une des caractéristiques de la prostate est la production d'une protéase appelée « antigène spécifique prostatique », enzyme libérée de façon non spécifique dans l'organisme mais présentant la particularité de n'être active qu'au niveau de la prostate. A l'heure actuelle, cet « outil » de vectorisation n'a encore été envisagé que par peu d'équipes et uniquement pour réaliser des *prodrugs* d'agents cytotoxiques tels que les taxanes. Nous avons choisi de nous intéresser à cette possibilité de vectorisation d'un inhibiteur de cyclooxygénase par un peptide, en nous focalisant surtout sur la conception d'un espaceur novateur permettant de coupler ces deux entités chimiques et donc éventuellement adaptable à un grand nombre de structures actives originales.

Par ailleurs, afin d'envisager une optimisation de nouvelles structures « anti-COX » c'est à dire d'en augmenter l'activité tout en essayant d'en diminuer les effets indésirables, nous avons décidé de leur adjoindre un groupement donneur de NO. En effet, il a été montré qu'en régulant un grand nombre d'éléments cellulaires impliqués plus ou moins directement dans le cancer, le monoxyde d'azote (NO) joue lui-aussi un rôle dans la progression de la maladie (en plus de ses propriétés vasodilatatrices bien connues). Pour vérifier la bonne prise en charge, par les systèmes enzymatiques, de ces *prodrugs* et afin de mieux comprendre le devenir métabolique de ce type de composés, plusieurs protocoles expérimentaux ont été mis en place, allant de l'*in vitro* par résonance paramagnétique électronique à l'*ex vivo* par la mesure de la relaxation d'aorte de rats.

Le travail rapporté dans ce mémoire a donc été entrepris non seulement pour aboutir à la synthèse de nouvelles molécules à visée anticancéreuse mais surtout pour fournir de nouveaux outils pharmacochimiques utilisables pour améliorer le concept de l'utilisation des inhibiteurs de cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate.

Chapitre I :

Principales caractéristiques du cancer et implications pour le traitement de cette pathologie

A - LA PATHOLOGIE

Depuis le début du XXème siècle, les pays industrialisés ont vu la fréquence d'apparition des cancers augmenter de manière extrêmement importante. L'allongement de la durée de la vie et les changements dans les habitudes de vie en sont les principaux responsables, ce qui s'est traduit par une explosion du taux de mortalité lié à cette maladie durant ces cinquante dernières années.

1. Incidence et causes du cancer

a) Quelques chiffres

En 2004, 2,9 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et 1,7 million de patients atteints d'un cancer sont décédés en Europe (Boyle P. et Ferlay J., 2005). D'après un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) portant sur l'année 2000 dans le monde, 5,3 millions d'hommes et 4,7 millions de femmes ont développé une tumeur maligne (Fig. 1). Pour cette même année, 6,2 millions de personnes en sont mortes, soit 12% des quelques 56 millions de décès survenus dans le monde toutes causes confondues. Selon ce même rapport, d'ici à 2020, la fréquence d'apparition des cancers pourrait augmenter de 50% en vingt ans pour atteindre 15 millions de nouveaux cas par an, pour les raisons abordées dans la suite. La modification de la pyramide des âges reste la raison principale de cette augmentation.

Si, malgré les quatre années de différence, on compare les chiffres au niveau mondial (Fig. 1) et ceux limités au territoire français (Fig. 2), on peut constater une énorme disparité. En effet, si en France, les cancers de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme sont prédominants en fréquence d'apparition (le cancer du côlon est aussi extrêmement important), le cancer du poumon reste en première position en terme de nouveaux cas au niveau mondial. Il existe donc probablement des prédispositions génétiques en fonction de l'origine des individus et surtout certains facteurs environnementaux et culturels jouent un rôle très important dans la formation du cancer.

b) Les principales causes du cancer

Un rapport extrêmement détaillé intitulé « *Attributable causes for Cancer in France in the year 2000* » a été rendu public en septembre 2007 par l'OMS (conjointement avec d'autres organismes nationaux) et insiste sur le fait qu'en France, on ne trouve une cause spécifique que pour la moitié des cancers. Il est basé sur la compilation d'un grand nombre d'études épidémiologiques ayant été réalisées entre 1980 (date du précédent rapport) et 2000. Il est fait état du nombre croissant de nouveaux cas, mais aussi des taux de mortalité en baisse significative : le cancer est donc plus présent (bien qu'on puisse constater un ralentissement de cette progression) mais mieux pris en charge. Ceci peut également être dû à un « glissement » vers des types de cancers dont la rémission est plus fréquente contrairement aux cancers des voies aérodigestives qui représentent encore la plus grande part de mortalité.

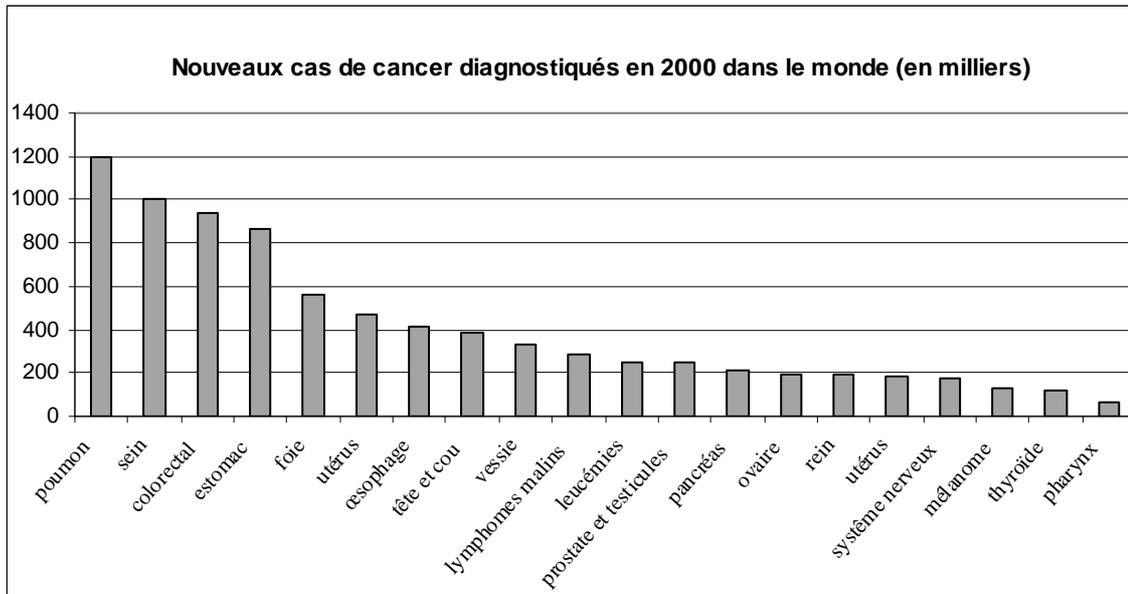


Fig. 1 : Nouveaux cas de cancers diagnostiqués dans le monde en fonction de l'organe touché (Source : rapport de l'OMS)

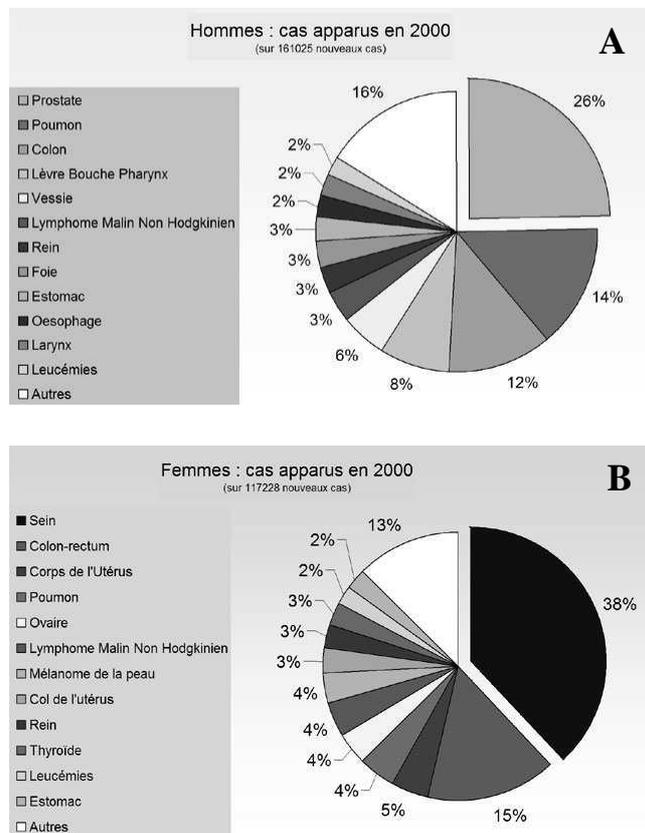


Fig. 2 : Répartition des nouveaux cas de cancers apparus en France, chez l'homme (A) et chez la femme (B) au cours de l'année 2000

Néanmoins, et vu l'incidence de certains cancers sur le territoire, ce rapport a pu aboutir à quelques conclusions, en particulier sur l'alimentation et l'hygiène de vie. Il faut ici bien séparer les causes avérées, qui peuvent être justifiées par un nombre important de données et les causes hypothétiques. L'intérêt d'un tel classement est fondé sur l'importance actuellement donnée à la prévention et au dépistage précoce des premiers signes de tumeurs.

Il existe deux origines de modification du patrimoine génétique d'une cellule pouvant conduire à un cancer. Bien que les mutations spontanées ou provoquées entre autres par des espèces réactives de l'oxygène soient courantes (mais assez bien réprimées), les origines exogènes de la maladie sont très importantes comme nous l'a indiqué le rapport de l'OMS. On constate donc que les causes de la maladie peuvent être variées mais aboutissent au même résultat : une prolifération dérégulée de cellules entraînant la formation d'une tumeur.

i. Les causes avérées

Le tabac arrive en tête, causant 30% des cancers chez l'homme (poumon, gorge, langue, vessie...). Suivent l'alcool (9%), mais également l'excès de poids et le manque d'activité physique. Il est également fréquent que des expositions prolongées et/ou non protégées aux rayons solaires et autres rayonnements (X, γ ...) soient la cause de différents cancers (peau, ganglions...). En parallèle, l'exposition à des produits cancérigènes de façon répétée pendant la vie professionnelle (chose qui tend actuellement à être réglementée de façon très stricte) est fréquemment la cause du développement de la pathologie.

Quant aux facteurs environnementaux, leur importance est facilement démontrable. Les études portant sur les populations migrantes le montrent bien : par exemple, en moins de deux générations, le risque de cancers colo-rectaux de la population migrante devient identique à celui du pays d'accueil. De plus, une cause fréquente de cancer, principalement dans le Tiers-Monde est la mutation provoquée par contamination par un germe infectieux ou par un virus, ce qui est également lié à l'environnement.

ii. Les causes hypothétiques

L'alimentation et ses dérivés (apport trop important en graisse notamment) est mentionnée dans ce rapport comme étant une cause hypothétique de cancers. Cependant, il faut noter que le parti-pris épidémiologique de l'enquête ne peut que difficilement prouver l'influence de tel ou tel changement de comportement alimentaire à cause du nombre très important de variables (aussi bien au niveau de la composition de la nourriture qu'au niveau des capacités digestives des individus). De plus, la pollution semble être un facteur de risque difficile à quantifier. Même si son impact est certain, c'est la conjonction avec d'autres risques qui souligne son importance.

En parallèle à ces considérations exogènes, et de par la nature du cancer, il est primordial de s'intéresser également à la prédisposition génétique à la maladie (déficience enzymatique, etc.) même si le champ d'étude du rapport de l'OMS ne comporte pas ces objectifs.

2. Le cancer : progression de la maladie

Le cancer est une maladie génétique acquise qui se traduit par la prolifération anormale et « anormale » de certaines cellules d'un tissu normalement sain de l'organisme. Ceci entraîne la concentration d'une grande quantité de cellules mutées appelée tumeur, qui peut évoluer vers un stade malin devenant ainsi une menace pour la survie de l'organisme. La rapidité de la prolifération de ces cellules, leur grand « appétit » en oxygène entraînant la formation de néovaisseaux en réseaux très denses autour de cette tumeur, et le manque de rétrocontrôle par la mort cellulaire programmée des cellules non différenciées justifient cette menace. Dans un stade plus avancé encore, certaines de ces cellules sont capables d'utiliser la circulation sanguine comme un vecteur pour coloniser d'autres organes et former des métastases, tumeurs secondaires mettant également en danger l'organisme.

Le risque de cette maladie est réel, et si elle n'est pas traitée au plus tôt entraîne fréquemment la mort par les conséquences de cette surabondance de cellules et la fragilité du réseau sanguin nouvellement formé : accumulation de toxines, dénutrition ou hémorragie. Les personnes âgées sont les premières touchées, les systèmes vérifiant la viabilité des cellules semblant se détériorer avec l'âge et les facteurs de risque se cumulant.

En résumé, R. Weinberg et D. Hanahan (2000) ont suggéré que la transformation cellulaire initiée au niveau génique passe par l'acquisition de plusieurs propriétés que l'on peut regrouper comme suit :

- prolifération illimitée, favorisée par l'indépendance vis à vis des signaux stimulant la prolifération et l'insensibilité aux signaux inhibiteurs
- abolition de la mort cellulaire programmée (apoptose)
- stimulation de l'angiogenèse
- acquisition d'un pouvoir invasif.

La perte de pouvoir de réparation de la cellule permet à ces anomalies de perdurer et de déboucher sur une tumeur. Nous allons donc voir brièvement l'impact de ces transformations sur la progression de la pathologie et les éventuelles cibles qu'elles peuvent constituer pour le traitement du cancer.

a) Le rôle des gènes

Il existe deux types de gènes influant sur la prolifération cellulaire : les proto-oncogènes, qui, une fois activés en oncogènes, favorisent la répllication ; et les anti-oncogènes ou « suppresseurs de tumeurs », dont le rôle est de contrôler le renouvellement cellulaire. Des mutations spontanées ou provoquées peuvent venir en altérer le bon fonctionnement. Une surméthylation de ces gènes peut également en bloquer la transcription. Généralement, une seule altération ne suffit pas et plusieurs éléments sont nécessaires pour parvenir à une réelle et dangereuse dérégulation du cycle de renouvellement. C'est une des principales sources d'hétérogénéité de la pathologie : les différents cancers présentent des caractéristiques géniques différentes et ceci rend une approche thérapeutique globale difficile. En principe, toutes les modifications fonctionnelles résultant de ces mutations devraient entraîner l'apoptose de la cellule et donc éviter qu'une colonie de mutants ne se forme, mais il arrive que certaines cellules échappent à ce contrôle. Lorsqu'une cellule mutante échappe à ce mécanisme, et si elle possède un caractère dominant sur les cellules normales, alors un processus de croissance tumorale peut commencer.

b) La prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est un processus complexe, associé à un nombre important de facteurs limitant et déclenchant. Les principaux sont les facteurs de croissance, véritables signaux de départ de la division cellulaire, capables d'initier les voies de transduction du signal mitogène, en particulier la voie Ras-Raf-MAPKinase. Dans le cas des cellules cancéreuses, ces facteurs peuvent être produits par la cellule elle-même, qui entre alors dans une phase d'auto-entretien générant des foyers tumoraux. Parmi les facteurs importants, on note aussi les kinases cycline-dépendantes (CDKs) et les microtubules qui régulent la division cellulaire et constituent ainsi des éléments essentiels au bon déroulement du cycle cellulaire.

Il est également important de signaler à ce stade que ce phénomène d'emballement est entretenu par l'allongement de l'extrémité des chromosomes, appelés télomères, censés servir de contrôle de la réplication. En effet, dans une cellule normale, le cycle de réplication comporte une phase de délétion d'une partie du télomère. Après un certain nombre de multiplications, s'il n'est pas régénéré, le télomère devient trop court et la cellule rentre en sénescence car elle interprète cette absence comme une corruption de l'ADN, ce qui va entraîner l'apoptose. Dans une cellule normale, la télomérase, enzyme transcriptase inverse spécialisée (associée à un fragment d'ARN) permettant la reconstitution des télomères, a une activité qui dépend des besoins du tissu en nouvelles cellules. Dans le cas d'un cancer relativement avancé, la télomérase peut être surexprimée et donc permettre aux cellules d'échapper à cette voie de signalisation de l'apoptose.

c) L'apoptose ou mort cellulaire programmée (Fig. 3)

La plupart des tissus sont capables de se renouveler de façon régulière. Cette création de cellules doit être contrebalancée par la mort de plus « vieilles » cellules, ce qu'on appelle l'apoptose. Cet équilibre, appelé homéostasie, est fondamental et assure le bon fonctionnement des organes. Entre autres, les cellules présentant des dysfonctionnements au niveau de l'ADN ou de son expression doivent être amenées à l'apoptose, et ainsi éliminées sans dégâts pour les cellules viables voisines.

Il existe principalement deux voies conduisant à la mort cellulaire programmée :

- une voie extrinsèque, impliquant principalement des récepteurs membranaires portant une structure caractéristique dite « à domaine de mort » qui couple ces récepteurs à une cascade d'activation d'enzymes spécifiques à l'apoptose. Les systèmes de ligands et récepteurs les plus connus sont Fas, TNF (tumor necrosis factor), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand).
- une voie intrinsèque, dont l'origine est mitochondriale, mettant en jeu des protéines de la famille Bcl-2 (protéines antiapoptotiques Bcl-2, BclX₂, ou proapoptotiques Bax, Bad, Bak).

Dans les deux cas, on observe le déclenchement d'une cascade de signalisation conduisant à l'activation des caspases, protéases à cystéine entraînant une protéolyse. L'AIF (Apoptose Inducing Factor) constitue une autre voie indépendante des caspases et aboutissant à la condensation de la chromatine.

Ces voies peuvent être activées par différents signaux extracellulaires : hormones, monoxyde d'azote, facteurs de croissance, cytokines ; ou intracellulaires (atteinte ADN, réponse à un stress). Il faut ici bien différencier l'apoptose de la nécrose, qui est une mort cellulaire traumatique accompagnée d'une inflammation et débouchant sur la rupture de la membrane plasmique et donc l'exocytose.

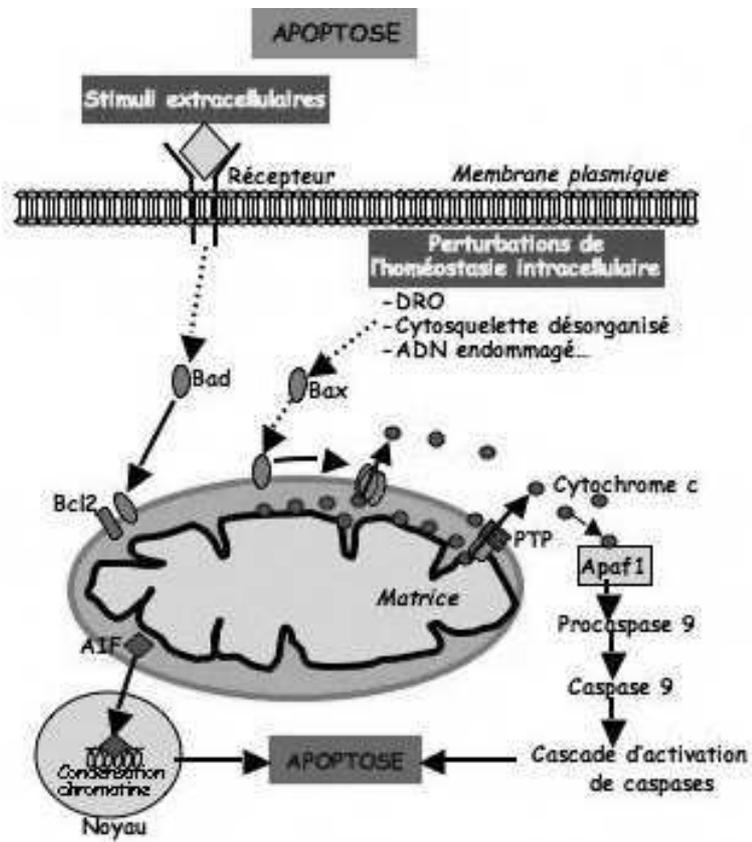


Fig. 3 : Mécanismes de l'apoptose
(adapté de FacBio - Biocell, 2005)

Dans un cancer, ce mécanisme d'apoptose est diminué. Les voies de signalisation de l'apoptose présentent des dérégulations importantes au niveau des tumeurs et c'est en particulier la protéine suppresseur de tumeur p53, dont les altérations interviennent dans plus de la moitié des cancers qui est responsable de cette situation. En effet, 50% des cellules cancéreuses humaines ont une p53 mutée qui a perdu les capacités antiprolifératives et apoptotiques qui dans une cellule normale permettent à cette protéine « gardienne du génome » de maintenir l'intégrité de la cellule en cas de stress, par induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose (via l'activation de l'expression des gènes Bax). Il est de plus à noter que la p53 est indispensable à la réponse vis-à-vis de certaines molécules anti-cancéreuses.

En parallèle, l'attention de la recherche se porte actuellement sur la compréhension et l'exploitation thérapeutique de l'intégralité de la voie PI-3 Kinase / Akt (Fig. 4) qui influe sur un nombre important de paramètres de l'apoptose, en particulier par répression transcriptionnelle de gènes proapoptotiques de la famille Bcl-2. Dans certains cas de mutation de la protéine Ras, cette voie peut même être activée en permanence et sans l'aide de signaux extracellulaires.

d) L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus physiologique de croissance de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins déjà existant afin d'alimenter un tissu en sang. C'est un phénomène normal dans le cadre de la croissance et la réparation de tissus abîmés, mais il devient rapidement problématique dans le cas d'une tumeur. Cet afflux massif en sang et donc en oxygène est primordial dans le développement des tumeurs malignes. Au delà d'une taille d'environ 2 mm³, une tumeur a un tel besoin en oxygène qu'elle doit impérativement construire une dérivation dans le réseau sanguin pour subvenir à ses besoins. De plus, de par son activité prolifération importante, il est nécessaire que ce réseau nouvellement formé puisse évacuer la grande quantité de déchets produits par ces cellules.

Parmi les nombreux inducteurs et inhibiteurs, produits aussi bien par les cellules normales que les cellules tumorales, le « facteur de croissance des fibroblastes-2 » (*Fibroblast Growth Factor*, FGF-2) et le « facteur de croissance de l'endothélium vasculaire » (*Vascular Endothelium Growth Factor*, VEGF) représentent les régulateurs clés de l'angiogenèse, en particulier :

- le FGF intervenant dans la prolifération des cellules endothéliales et leur organisation ;
- le VEGF (Goto, F. et al., 1993) favorisant la multiplication et le déplacement des cellules endothéliales, et activant la NO Synthase produisant le NO.

L'angiogenèse est également favorisée par l'activité des enzymes MMP (MétalloProtéases Matricielles) favorisant la pénétration des capillaires dans les matrices extracellulaires.

La formation de ces vaisseaux provoque, en plus de la facilité d'alimentation pour la tumeur, un terrain favorable à l'invasion d'autres organes par des métastases car ces capillaires sont extrêmement fragiles.

Dans le cas d'un cancer, l'inhibition de l'angiogenèse est intéressante, car elle pourrait conduire à l'asphyxie de la tumeur de manière relativement ciblée. Ce type de traitement fait partie des voies de recherche en phase clinique (Aragon-Ching J. B., Dahut W. L., 2008) et en cours de mise sur le marché.

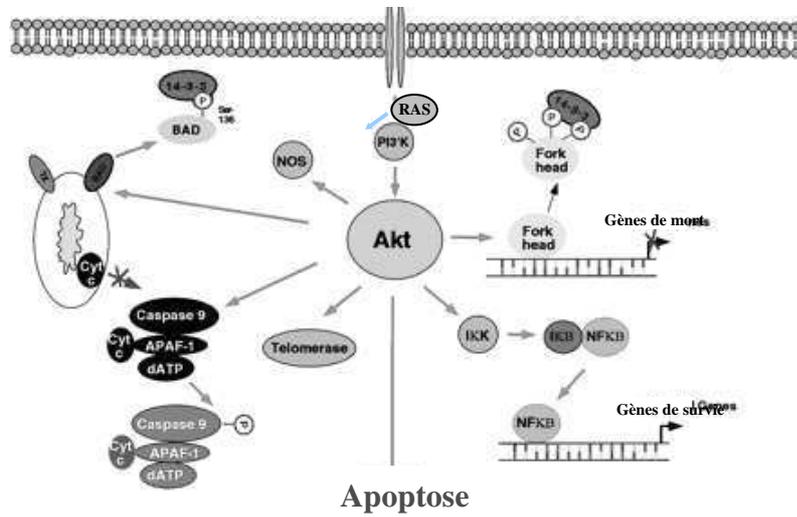


Fig. 4 : Voie PI-3K/Akt et son implication dans le mécanisme d'apoptose
 (adapté de Datta S. R. et al., 1999)

e) L'invasivité

Une étape importante dans la progression cancéreuse est l'invasion d'autres organes avec formation de métastases, qui sont des foyers de cellules cancéreuses en provenance d'autres tissus. Selon le site de la tumeur primaire, il y a une sélectivité de localisation de ces métastases et il est fréquent que les cellules métastatiques soient légèrement différentes des cellules de la tumeur primaire.

Pour que cette invasion soit possible, il est nécessaire que les cellules de la tumeur initiale se détachent, qu'elles migrent à distance, et enfin qu'elles adhèrent à un nouveau tissu. Ceci implique notamment des modifications au niveau des activités des cadhérines (qui effectuent la transduction membranaire cellule-cellule) et des intégrines (impliquées dans les interactions cellule-matrice).

L'ensemble des mécanismes d'invasion sont sans doute imparfaitement connus, mais on sait que les MMP sont indispensables à la digestion des matrices et des parois vasculaires, permettant ainsi la progression de la cellule cancéreuse vers son site d'invasion. Leur inhibition peut limiter la formation de métastases. Une fois libérées, les cellules cancéreuses peuvent facilement passer dans la circulation sanguine principalement, même si les disséminations lymphatiques et intra-cavitaires ne sont pas à négliger (Fig. 5). Certains tissus (dépendants du type de cancer, mais fréquemment le foie, les os, le cerveau, et le poumon qui sont des organes très fortement et finement irrigués, constituant « des lits vasculaires ») sont alors des terrains favorables pour une adhésion des cellules et la création d'un nouveau foyer tumoral. Dans les différents cancers, certaines isoformes d'intégrines sont surexprimées, ce qui explique les disparités de capacités invasives en fonction de l'organe touché par la tumeur primaire, et « l'agressivité » de certains cancers comme celui de la prostate à un stade avancé.

En parallèle de ces voies existantes dans un organisme sain mais déséquilibrées dans le cas du cancer, il existe plusieurs médiateurs sécrétés par les cellules cancéreuses favorisant la formation de métastases. Il faut ici noter qu'il existe au moins une douzaine de protéines censées empêcher ou au moins ralentir la formation de métastases, en limitant l'adhésion des cellules présentant une différence marquée avec les cellules de l'organe touché.

f) Cancer, inflammation et système immunitaire

Il est évident que la prolifération anarchique des cellules se fait avec le déclenchement d'une réaction inflammatoire et donc une réponse immunitaire sur le lieu de la tumeur. Le clonage et le séquençage des antigènes tumoraux a confirmé leur présence dans ces tissus. En revanche, l'importance de cette prolifération montre que le système immunitaire est pris en défaut et ne peut répondre de manière efficace, ce qui est d'une grande importance en particulier dans la perspective des cellules métastatiques, qui ne seront pas efficacement prises en charge lors de leur séjour dans la circulation. Il est vraisemblable que cela soit dû à l'absence de complexes majeurs d'histocompatibilité I à la surface de ces cellules, ce qui empêche leur reconnaissance par les lymphocytes T (Naoe M. et al., 2002 ; Zhang H. et al., 2003).

D'autre part, l'augmentation du risque d'apparition de cancer dans les états inflammatoires chroniques est bien caractérisée. Il a en particulier été montré, par l'intermédiaire du modèle animal, l'importance de la voie de NFκB (Nuclear Factor κB) (activé par des cytokines inflammatoires et à l'origine de signaux anti-apoptotiques) dans la pathologie. Ceci confirme la capacité de l'inflammation à protéger de l'apoptose et justifie le traitement de la rectocolite hémorragique, associée à l'apparition d'adénocarcinomes coliques, par des anti-inflammatoires non stéroïdiens

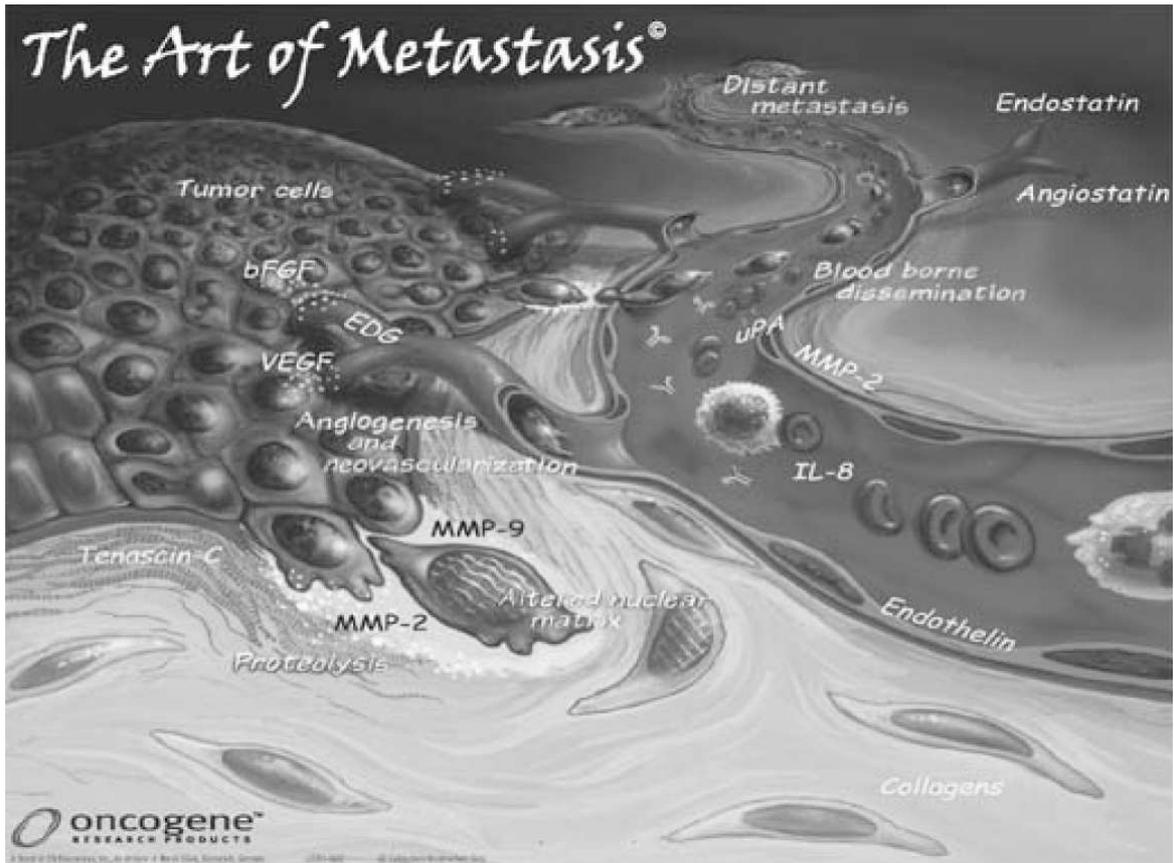


Fig. 5 : Formation de métastases
(adapté de Merck Biosciences)

3. Les spécificités du cancer de la prostate

La prostate est une glande de l'appareil urogénital masculin, située sous la vessie, traversée par l'urètre et partiellement entourée de sphincters striés. Son fonctionnement normal (synthèse et stockage du liquide séminal) est dépendant de la testostérone. Elle est principalement le siège de trois affections :

- la prostatite, qui est une inflammation de la prostate, traitable par antibiotiques
- l'adénome ou hypertrophie bénigne de la prostate, touchant 80% des hommes de plus de 50 ans, correspondant au vieillissement du tissu prostatique et dont la chirurgie vient aisément à bout quand les symptômes le justifient
- le cancer de la prostate, qui est un adénocarcinome.

Comme tout cancer, le cancer de la prostate est une prolifération anarchique de cellules, mais le cancer de cette glande est particulier de par sa progression lente et le taux important d'hormone circulant dans sa périphérie.

a) Incidence et mortalité

Le cancer de la prostate se développe le plus souvent chez les hommes de plus de cinquante ans et est le plus commun avec celui du côlon : l'âge est ici le premier facteur de risque. Parmi les facteurs prédisposants, on peut citer : les facteurs environnementaux (professionnels et alimentaires), l'origine ethnique (cancer fréquent chez les populations noires-américaines) et les facteurs génétiques (formes familiales dans 20% des cas). Son dépistage est aujourd'hui systématique (même si encore non organisé) dans la tranche d'âge la plus sujette à ce cancer. Le plus souvent, ce cancer reste asymptomatique, mais en cas d'échappement hormonal résultant de résistance acquise suite à une thérapie, il peut devenir extrêmement virulent.

Une étude assez récente portant sur l'évolution de l'incidence du cancer de la prostate en France (Bauvin E. et al., 2003) conclut, après analyse de 9 registres hospitaliers, que l'incidence de ce cancer ne cesse d'augmenter en France (environ 40000 nouveaux cas en 2000). En revanche, le taux de mortalité est stable voire en légère baisse depuis les années 90. Il est difficile d'attribuer cette baisse à l'unique intensification du dépistage.

b) Evolution du cancer de la prostate

Généralement, l'apparition de la tumeur se fait en périphérie de l'organe. C'est pour cette raison que le contrôle médical de la glande par toucher rectal reste la principale méthode de dépistage de la maladie. Il est fréquent que la tumeur ne se développe que très peu et soit asymptomatique pendant une longue période, d'où l'intérêt d'un dépistage basique par le dosage du taux de PSA (*Prostate Specific Antigen*, antigène spécifique prostatique) sanguin.

Durant les premiers stades, la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques est stimulée par les hormones circulantes comme la dihydrotestostérone : en effet, au départ ce cancer est très sensible à son environnement hormonal (ce qui a conduit à développer dans un premier temps les thérapies hormonales).

En fait, l'évolution de ce cancer est caractérisé par deux stades bien distincts : le premier stade hormono-dépendant qui, en particulier suite à une thérapie hormonale, va évoluer vers un stade hormono-indépendant, les cellules développant une résistance à la thérapie (typiquement 18 mois après le début de cette hormonothérapie). Au stade d'échappement hormonal, le diagnostic vital est mis en danger à court terme car le cancer va rapidement évoluer et former des métastases, particulièrement dans les ganglions lymphatiques, les os et le cerveau.

B - APPROCHES THERAPEUTIQUES DU CANCER DE LA PROSTATE

1. Dépistage par la PSA

La prostate sécrète une glycoprotéine bien spécifique, appelée PSA dont le rôle normal est de fluidifier le liquide séminal. Normalement, on ne la retrouve pas ou très peu circulant dans le sang. Dans le cas d'un cancer, la production de cette protéine par l'ensemble des cellules cancéreuses prostatiques est environ dix fois supérieure à celle d'une cellule normale. Le taux de PSA dans le sang devient donc généralement bien plus élevé : c'est une méthode de dépistage basique souvent employée lors d'analyses sanguines chez les hommes de plus de 50 ans. Il faut ici noter l'existence aussi bien de faux positifs (un échappement anormalement haut de PSA dans le sang avec une prostate normale) que de faux négatifs (échappement bas avec une présence de tumeur localisée). C'est une raison pour laquelle certains auteurs préconisent de suivre le rapport PSA libre / PSA liée aux protéines du sérum : dans un organisme présentant une tumeur de la prostate, ce rapport diminue fortement. Il est ici important de noter que la PSA liée voit son rôle de protéase complètement désactivé et cet aspect sera développé et explicité dans le chapitre III consacré à la vectorisation des molécules nouvellement synthétisées.

2. Prostatectomie totale

L'intervention chirurgicale consistant en l'ablation totale de la prostate n'est intéressante que si la tumeur est bien localisée, avec la quasi-certitude de l'absence de métastases. Dans ce cas, elle offre de grande chance de rémission. Elle est donc réservée à des cancers peu avancés, et sur des patients dont l'espérance de vie le justifie. Cette ablation est fréquemment réalisée sous cœlioscopie, mais une nouvelle méthode de cryoablation (par cycles de congélation à l'azote liquide en endourétral) est de plus en plus utilisée.

Même si une intervention de ce type est extrêmement aisée et, si réalisée à temps, permet une totale rémission du cancer, il est très important d'en signaler le grand risque de perte massive de qualité de vie du patient. En effet, il est fréquent qu'une telle opération entraîne des troubles de la miction avec incontinence, mais également des troubles de l'érection et un dysfonctionnement de l'humeur. Actuellement, certains traitements post-opératoires permettent d'atténuer l'incidence de ces effets secondaires.

3. Radiothérapie

Le principe de cette technique est d'utiliser des radiations ionisantes pour venir à bout des cellules tumorales. Généralement utilisée à la place (dans le cas de patients fragiles) ou après une chirurgie, ou encore pour traiter les métastases localisées de ce cancer, la radiothérapie donne de bons résultats en particulier si elle est utilisée conjointement avec un traitement hormonal avec ou sans chimiothérapie.

Il existe différents moyens d'amener les rayonnements sur la tumeur, non-invasifs et invasifs.

- non invasifs : il s'agit simplement d'exposer pendant un certain temps la tumeur à des rayonnements de haute énergie. Ce type de traitement est administré en séances quotidiennes pendant plusieurs semaines ;
- invasifs : l'implantation de petites aiguilles (quelques millimètres de long environ) contenant des isotopes radioactifs (^{125}I , ^{103}Pd ...) directement dans la tumeur permet une diffusion prolongée des rayons X au cœur du foyer cancéreux, avec des effets secondaires limités pour les organes voisins de par la nature des rayons X émis (rayons X à courte distance). Les risques sur l'entourage du patient sont considérés comme nuls, et même si ces aiguilles deviennent inactives, elles sont laissées dans la prostate.

4. Hormonothérapie

Comme il y a une relation directe entre la quantité d'hormones mâles produites et la rapidité de croissance des cellules cancéreuses, un traitement limitant la production d'androgènes a semblé intéressant pour combattre les premiers stades de la maladie.

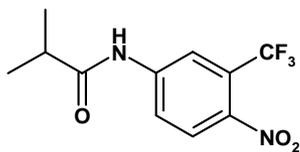
La testostérone est synthétisée sous l'influence de la LH (*luteinizing hormone*), hormone produite par l'hypophyse et elle-même induite par la LH-RH (*luteinizing hormone releasing hormone*) produite par l'hypothalamus. Une petite quantité d'hormones mâles (10 %) est d'origine surrénalienne. L'objectif du traitement hormonal est de limiter la production de la forme active de la testostérone, la dihydrotestostérone : pour ce faire, il existe plusieurs solutions possibles :

- la castration chirurgicale, consistant en l'ablation de la partie des testicules produisant les hormones (pulpéctomie), est une solution extrême mais peu utilisée car les nouveaux traitements permettent de l'éviter ;
- les agonistes de la LH-RH permettent de diminuer la production de testostérone autant qu'une castration chirurgicale (d'où son appellation de « castration chimique ») et représentent aujourd'hui un des traitements de choix avec des molécules type décapeptides comme la Triptoréline ou la Guséreléline (Fig. 6). Il est basé sur l'induction d'un rétrocontrôle au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire ;
- les oestrogènes, auparavant traitement dominant mais aujourd'hui utilisé en seconde intention, sont de façon similaire des inhibiteurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire et limitent donc la production de testostérone par les testicules ;
- les anti-androgènes, soit stéroïdiens au niveau central et périphérique (acétate de cyprotérone par exemple) soit non stéroïdiens à action uniquement périphérique (comme le flutamide) bloquent l'activité résiduelle des androgènes synthétisés par des glandes surrénales après castration chimique ou chirurgicale. Ils sont également utilisés, à court terme, au début du traitement par les agonistes LH-RH pour limiter l'effet « flush » lié à l'immédiate hypersécrétion de testostérone.

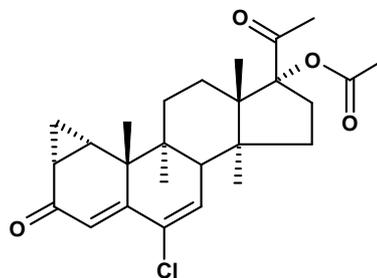
Tous ces traitements, bien que généralement très efficaces en terme de ralentissement de la croissance voire en diminution de la taille de la tumeur (taux de réponse de 80%) présentent des problèmes majeurs d'effets secondaires. En arrêtant la production d'androgènes d'un patient, on constate une diminution notable de la qualité de vie par perte de la libido et apparition d'impuissance, s'associant à de profonds troubles de l'humeur pouvant aller jusqu'à la dépression, les hormones jouant un rôle important dans la régulation du

PYROGLU-HIS-TRP-SER-
TYR-DTRP-LEU-ARG-PRO-

Triptoréline



Flutamide



Acétate de cyprotérone

Fig. 6 : Exemples de molécules utilisées dans le traitement hormonal du cancer de la prostate

comportement. De plus, il existe, lors de la prise des oestrogènes et des anti-androgènes, des risques thromboemboliques qui constitue un facteur limitant à leur utilisation et qui ne doivent pas être négligés.

Sur le long terme, il faut savoir qu'environ 80% des patients développent une résistance au traitement hormonal en moins de deux ans et entrent dans un stade d'échappement hormonal. Ceci dégrade considérablement le pronostic vital : non seulement la thérapie classique devient inutile, mais le taux de mortalité est accru : 50% des patients dont le cancer devient hormono-indépendant décèdent dans l'année, et la grande majorité voit son espérance de vie devenir inférieure à quelques années, malgré l'existence de chimiothérapies.

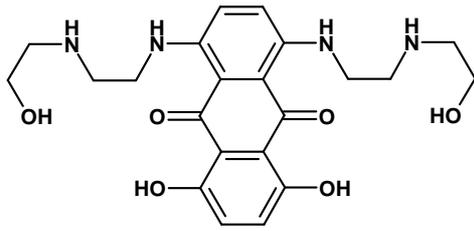
5. Chimiothérapie

La chimiothérapie est généralement utilisée dans le cancer de la prostate quand celui-ci commence à se développer en dehors de l'organe, ce qui est généralement traduit par une forte hausse du taux de PSA sérique. Généralement, il est adjoint au traitement hormonal déjà en place après cet échappement hormonal. De plus, un traitement « simple » ne donnant pas de bons résultats, il est nécessaire d'utiliser plusieurs molécules en association.

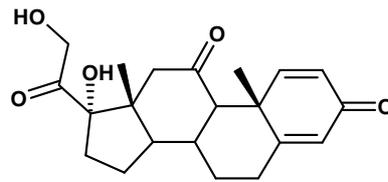
Les grandes classes d'anticancéreux peuvent ici être utilisées avec plus ou moins de succès selon l'avancement du cancer et le patient. C'est-à-dire (Fig. 7) :

- les antimétabolites : comme le Méthotrexate (Matrex[®]), inhibiteur de la dihydrofolate réductase, qui empêche la synthèse et l'incorporation des nucléotides dans l'ADN ;
- les alkylants de l'ADN, comme la Dacarbazine (Déticène[®]), métabolisée in vivo par N-déméthylation, donne une réaction d'alkylation sur l'ADN par le diazométhane, ce qui va rendre sa réplication impossible ;
- les ligands du petit sillon de l'ADN comme la Bléomycine (Bléomycine[®]) qui est un antibiotique cytotoxique, pouvant dégrader la double hélice de l'ADN ;
- les intercalants comme la Doxorubicine (Adriamycine[®]) qui bloque la synthèse de l'ADN et de l'ARN ;
- les inhibiteurs de la topoisomérase II comme le Mitoxantrone (Novantrone[®]) ;
- les poisons du fuseau, composés empêchant la polymérisation de la tubuline (Vinflunine...) ou sa dépolymérisation (taxanes). Les taxanes (Taxotere par exemple) (Guéritte F., 2001) sont des composés naturels ou hémisynthétiques qui bloquent la division cellulaire et favorisent la phosphorylation de Bcl-2, ce qui a pour conséquence de relancer l'apoptose.

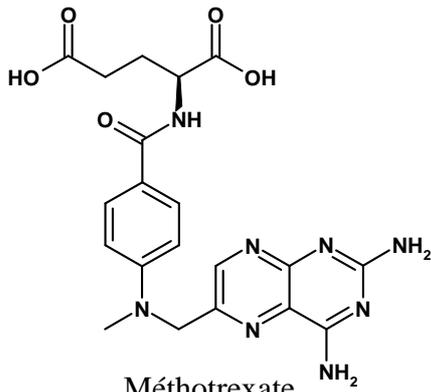
Il est clair ici que ces traitements ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et vont toucher la totalité des cellules de l'organisme, car leur action se situe au niveau de la division cellulaire. On peut arguer que la prolifération des cellules cancéreuses est extrêmement rapide, ce qui rend statistiquement plus probable qu'une cellule tumorale soit affectée par ce traitement. Néanmoins, ces types de chimiothérapie possèdent des effets secondaires extrêmement lourds : à côté des effets généralement associés à une chimiothérapie tels que la perte des cheveux et d'importants problèmes digestifs entraînant l'affaiblissement du malade, des problèmes hématologiques (anémie, thrombopénie, leucopénie) surviennent fréquemment, et comportent des risques bien plus importants pour la survie du patient. Leur toxicité peut concerner tous les systèmes vitaux (cardiovasculaires, pulmonaires, veinaux...) en fonction de la molécule utilisée.



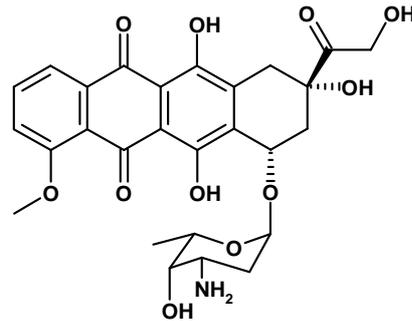
Mitoxantrone



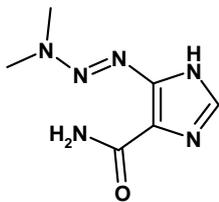
Prednisone



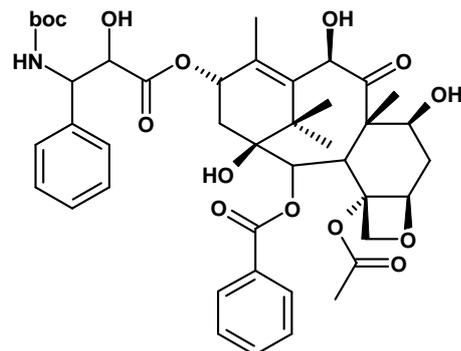
Méthotrexate



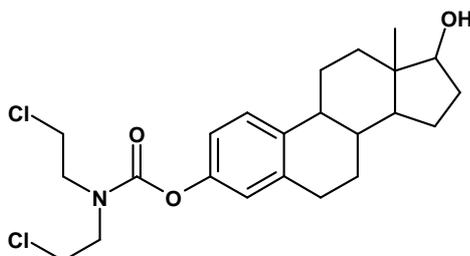
Doxorubicine



Dacarbazine



Docetaxel



Estramustine

Fig. 7 : Principales molécules de la chimiothérapie du cancer de la prostate

A l'heure actuelle, les associations Mitoxantrone et Prednisone (un corticostéroïde) ou Taxotère / Prednisone sont les traitements de référence en phase d'échappement hormonal (Gilbert D. C., Parker C., 2005) On peut constater une baisse du niveau de PSA circulant et une amélioration de la qualité de vie grâce aux effets secondaires limités. La survie médiane est de 11 mois.

Plus spécifique au cancer de la prostate, le phosphate d'Estramustine (Estracyt[®]) présente de bons résultats associé à un protecteur gastrique et à une prévention des thromboses veineuses. Il possède une activité d'alkylant mais aussi d'antineoplasique. Il présente également une potentialisation de l'action de certains inhibiteurs du fuseau, mais ses lourds effets secondaires en font un traitement de seconde intention, qui peut être utilisé avec le Taxotère.

6. Voies de recherche

Nous pouvons constater que les traitements proposés aux patients présentant un cancer de la prostate sont peu satisfaisants, peu sélectifs, présentant des effets secondaires importants et une amélioration limitée du pronostic vital. Ce cancer reste donc un des moins bien pris en charge. De par son incidence, il est néanmoins un thème de recherche important au niveau mondial.

a) Dépistage

Une voie de recherche évidente, même si souvent sous-estimée, est l'amélioration des techniques de dépistage actuellement en place. La combinaison d'examen médicaux (toucher rectal) et de dosages sanguins (PSA) permettent d'avoir une première idée de l'existence d'une tumeur avant contrôle par biopsie, ce qui limite le champ d'action à un constat de cancer déjà relativement avancé (présence d'une tumeur macroscopique), avec en plus le risque d'avoir des faux négatifs et des faux positifs. Dans l'idéal, il serait intéressant de pouvoir prévoir voire de prévenir l'apparition d'une tumeur.

Certaines équipes préconisent déjà, à la place d'un simple dosage de la PSA, de suivre l'évolution du taux de PSA circulant pour pouvoir anticiper le dépassement du seuil critique et permettre une prise en charge plus rapide. Mais ceci reste lié à l'existence d'une tumeur ! Le dépistage génétique constitue un espoir important : en effet, une étude (Dhanasekaran S. M. et al., 2001) a permis d'identifier plus de 200 gènes ou fragments de gènes associés à cette maladie, dont certains sont très présents dans les tissus précancéreux. Une autre équipe (Jeronimo C. et al., 2001) a pu mettre en place un dépistage basé sur la présence d'un gène issu d'une mutation propre à ce cancer, et concernant la glutathion-S-transférase (GST). Le gène de la GST-1 est caractérisé chez 90% des patients atteints d'un cancer de la prostate par une hyperméthylation de sa séquence (non retrouvée dans les tissus normaux ou chez les sujets présentant une hypertrophie bénigne de la prostate) (Meiers I. et al., 2007). L'intérêt est ici évident : plus la maladie est prise en charge tôt dans son stade d'évolution, plus les chances de rémission voire de guérison sont élevées.

b) Traitements physiques

Au niveau de la destruction directe des cellules mutantes, une méthode est en cours de mise au point et présente des résultats très prometteurs : le traitement par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) ou Ablatherm[®]. Après repérage par échographie de la masse tumorale, une sonde endorectale est introduite et va émettre des ultrasons extrêmement focalisés en traversant sans conséquences les tissus avoisinants. Au point focal, la température peut atteindre 100°C : les cellules touchées vont donc être détruites. Contrairement à la radiothérapie, ce type de traitement peut être renouvelé autant que nécessaire.

c) Chimiothérapie : vers moins de toxicité

Déjà couramment utilisé dans d'autres cancers, les taxanes ont été étudiés pour une application au cancer de la prostate pendant plusieurs années, et leur intérêt est aujourd'hui prouvé. Le Docétaxel (ou Taxotere[®]) en particulier présente de bons résultats : en se liant de façon stable à la tubuline, ce composé issu de la chimie des produits naturels va empêcher la mitose. Deux études ont montré que le docétaxel permettait d'apporter un bénéfice en survie (étude SWOG 9916 et étude TAX-327 exposées lors du congrès de l'American Society of Clinical Oncology 2004). La survie médiane a été meilleure et ce de façon significative pour les patients bénéficiant du docétaxel par rapport au schéma classique associant Mitoxantrone et Prednisone (gain de 3 mois). Fin 2004, la *Food and Drug Administration* a autorisé son utilisation sur le territoire américain.

Ces traitements, bien qu'apports non négligeables dans l'arsenal thérapeutique moderne, restent peu novateurs et sont toujours basés sur des mécanismes non sélectifs présentant d'importants effets secondaires. Il se développe donc des thérapies parallèles basées par exemple sur l'inhibition de mécanismes enzymatiques, présentant l'avantage d'une toxicité généralement réduite par rapport aux agents cytotoxiques classiques.

On peut citer plusieurs voies d'intérêt qui sont pour certaines abordées au laboratoire :

- l'inhibition des tyrosines kinases membranaires ou cytoplasmiques : protéines de phosphorylation, signaux de transduction importants pour la cellule. Elles jouent un rôle crucial lors de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Telliez A. et al., 2007)
- l'inhibition de l'activité farnésyltransférase impliquée dans les voies MAPK et PI-3K/Akt (Millet R. et al., 2004) qui, comme indiqué précédemment, contrôlent la prolifération et l'apoptose
- l'inhibition de la métabolisation de l'acide arachidonique, en particulier de la cyclooxygénase (Pommery N. et al., 2004, Goossens L. et al. 2007) qui sera développée dans la suite de ce travail.
- l'inhibition de l'angiogenèse qui est une des principales voies de recherche actuelles, avec de nombreux candidats médicaments à tous les stades d'étude (Oehler M. K., Bicknell R., 2000 ; Ryan C. J. et al., 2006).
- et bien sur, de nouveaux cytotoxiques (intercalants de l'ADN...) présentant des effets secondaires moins marqués.

On constate que les champs de recherche sont très vastes, et pour la plupart prometteurs. Néanmoins, il est toujours difficile d'anticiper les résultats *in vivo* à partir de résultats *in vitro*, vu le nombre important de facteurs supplémentaires en jeu.

Dans le cadre de cette recherche de nouvelles thérapies anticancéreuses à effets secondaires limités, il nous a semblé intéressant de nous pencher sur l'inhibition d'une enzyme, la cyclooxygénase, dont l'implication dans le phénomène d'inflammation et de cancérogenèse est importante.

Chapitre II :

La cyclooxygénase et son inhibition

Après une utilisation empirique pendant plusieurs millénaires des feuilles et de l'écorce de saule pour soulager fièvre et douleurs, c'est en 1893 qu'un chimiste allemand (Felix Hoffmann) employé chez Bayer fut le premier à synthétiser l'acide acétylsalicylique mieux toléré que l'acide salicylique extrait de la plante. La marque Aspirine® est déposée en 1899 et les premiers comprimés sont fabriqués en 1900 (10000 tonnes sont produites par an actuellement). En 1971, J. R. Vane a publié dans *Nature* (Vane J. R., 1971) la découverte du mode d'action de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) à laquelle appartient l'acide acétylsalicylique : l'inhibition de la cascade de métabolisation de l'acide arachidonique par inhibition de la cyclooxygénase. Les AINS sont aujourd'hui une des classes de médicaments les plus utilisés dans le monde.

La cyclooxygénase (COX), également appelée *prostaglandin endoperoxide G/H synthase* (PGHS) est une enzyme dont la fonction principale est la synthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique (AA). Son inhibition grâce à des molécules comme l'aspirine et l'indométacine, soulage donc des symptômes de l'inflammation et de la douleur. Son rôle dans le cancer a été récemment souligné, et a relancé la recherche de nouveaux composés actifs et de nouvelles applications thérapeutiques pour cette cible.

Après avoir présenté un résumé de l'état actuel des connaissances concernant l'implication de cette enzyme et de ses inhibiteurs dans la pathologie qui nous intéresse, nous reporterons dans ce chapitre nos choix de conception et de synthèse concernant les inhibiteurs COX retenus pour la réalisation de notre objectif global.

A - LA CYCLOOXYGENASE : DEUX SITES CATALYTIQUES, PLUSIEURS ISOFORMES

1. Fonction principale : formation des prostanoïdes impliqués dans l'inflammation

a) Cascade métabolique et rôle physiologique au taux basal

La fonction principale de COX est la métabolisation de l'acide arachidonique en PGH₂ en deux étapes. Tout d'abord, après hydrolyse par la phospholipase A₂ (PLA₂) des phospholipides membranaires pour libérer l'AA, COX va, dans son site de cyclooxygénation, former PGG₂, un intermédiaire peroxydé instable. Cette réaction d'oxydation est possible grâce à une tyrosine (Tyr385) présente à l'état radicalaire qui va arracher un proton à l'AA et ajouter deux molécules d'oxygène (Fig. 8, 9).

PGG₂ va ensuite être réduit via Tyr385 et avec la participation de l'hème du sous-site catalytique voisin présentant une activité peroxydase, pour donner PGH₂, endoperoxyde également instable. Immédiatement, une série d'enzymes prennent le relais pour synthétiser différents médiateurs (Fig. 8) comme la prostaglandine PGE₂, le thromboxane TXA₂ ou la prostacycline PGI₂, qui sont également appelés prostanoïdes. Le type de composé produit dépend de plusieurs facteurs, le plus important étant le type de cellule : par exemple, les cellules épithéliales produisent principalement PGI₂, alors que la COX plaquettaire produit principalement TXA₂ comme nous le verrons plus en détails dans la suite.

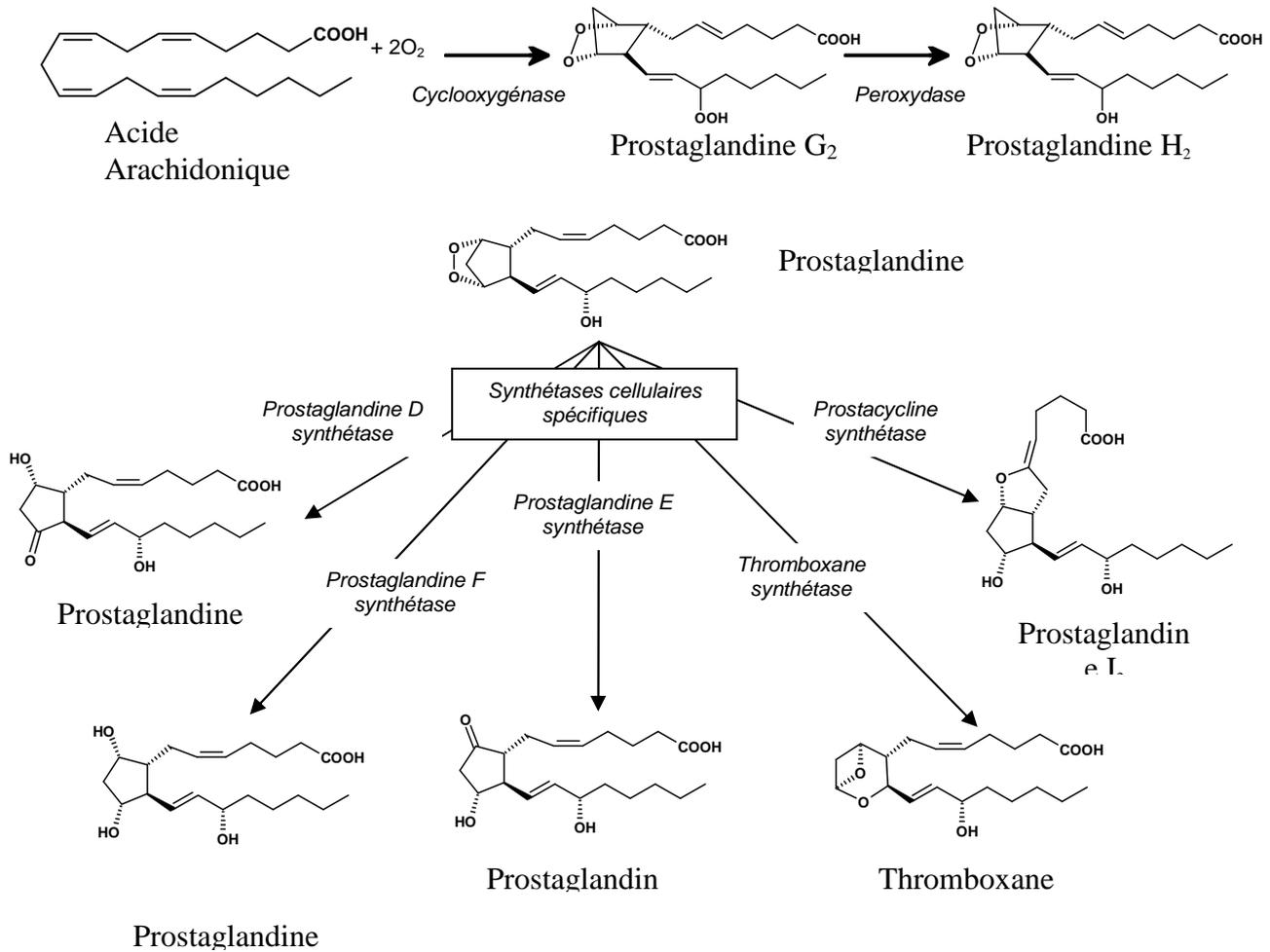


Fig. 8 : Métabolisation de l'acide arachidonique avec une première étape assurée par la cyclooxygénase
(adapté de Chandrasekharan N. V et Simmons D. L., 2004)

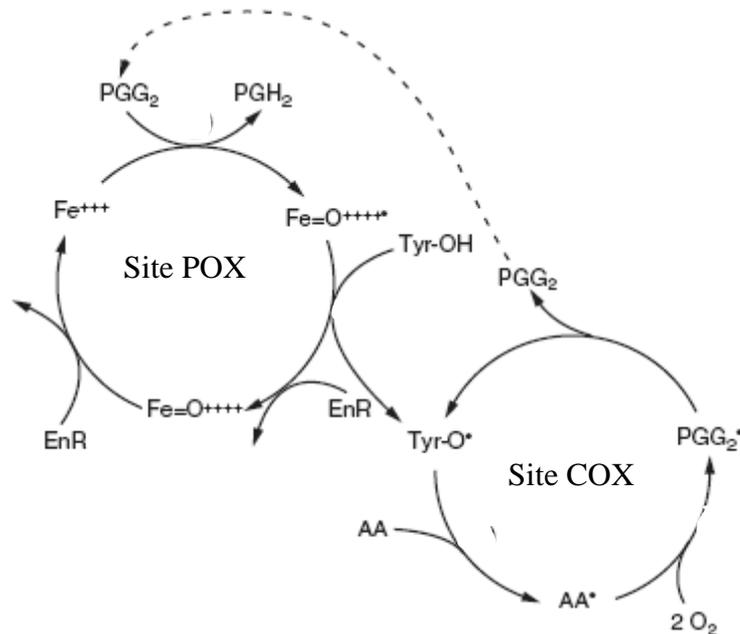


Fig. 9 : Cycle d'activité peroxydase et cyclooxygénase
(adapté de Chandrasekharan N. V et Simmons D. L., 2004)

Contrairement aux hormones, ces médiateurs sont produits par beaucoup de tissus et ont une fonction autocrine ainsi que paracrine passant par deux classes de récepteurs : la famille des récepteurs nucléaires PPAR (α , β , et γ), et des récepteurs cytoplasmiques (Forman B. M. et al., 1996). Ces derniers (par exemple EP1-2-3-4, FP, TP...) sont spécifiques à certains prostanoïdes, et possèdent des voies de transduction bien différentes (Narumiya S. et al., 1999) (Fig. 10).

Il est important de noter l'existence d'une deuxième voie de métabolisation de l'acide arachidonique qui fonctionne en parallèle de la voie des COX : la voie des lipoxygénases (LOX), qui transforme l'AA en leucotriènes, eicosanoïdes partageant certaines fonctions physiologiques avec les prostanoïdes : ce sont principalement des médiateurs de l'inflammation. De plus, en cas d'utilisation d'aspirine, une réaction conjointe de cette molécule et de l'enzyme sur l'AA peut conduire à d'autres médiateurs de l'inflammation à effets opposés que sont les lipoxines.

Du fait de la multiplicité des récepteurs et des voies de transduction du signal, les prostanoïdes possèdent des fonctions physiologiques différentes voire opposées (que nous résumerons plus bas). Ces molécules ont toutefois en commun leur intervention dans le phénomène inflammatoire.

b) La réaction inflammatoire et la douleur

La réponse inflammatoire est bénéfique et participe à la défense de l'organisme. En revanche, dans le cas d'une réponse non contrôlée, c'est-à-dire chronique ou étendue induite en particulier par les prostanoïdes (Narumiya S. et al., 1999), il y a apparition d'une pathologie. De plus, l'inflammation est généralement associée à la douleur (*rubor, calor, dolor, tumor*). Lors de la réaction inflammatoire, le taux de prostaglandines augmente, ce qui a pour effet de sensibiliser les récepteurs de la douleur (Dray A., Urban L., 1996). De plus, les prostaglandines sont suspectées d'agir au niveau de la moelle épinière et d'y favoriser la transmission des signaux de douleur (Ahmadi S. et al., 2002).

2. COX : plusieurs isoformes

a) Découverte et expression des isoformes

Depuis la découverte du mécanisme d'action de l'aspirine par J. R. Vane, de nombreuses recherches se sont penchées sur la cyclooxygénase. Jusqu'à la fin des années 80, il était communément admis que la production des prostaglandines n'avait comme limite que la quantité d'AA à disposition. Cependant, certains travaux ont mis en avant l'augmentation de la quantité en COX dans les tissus inflammés comparativement aux tissus normaux (Raz A. et al. ; 1988), ce qui a conduit à l'hypothèse que deux isoformes de cette enzyme existaient et qu'elles avaient des modes d'expression différents : COX-1, exprimée de façon constitutive et responsable du taux basal en prostanoïdes, et COX-2, exprimée de façon inductible et responsable en particulier de la réaction d'inflammation. Ceci a été prouvé peu de temps après, par clonage du gène inductible responsable de la formation de COX-2 (Xie W. et al. 1991). Des études plus poussées ont montré que les systèmes de régulation des gènes de COX-1 et COX-2 étaient entièrement distincts, la transcription de COX-2 pouvant être activée par des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines ou encore d'autres messagers de l'inflammation (Wadleigh D. J. et al. 2000). Par la suite, il a par contre été

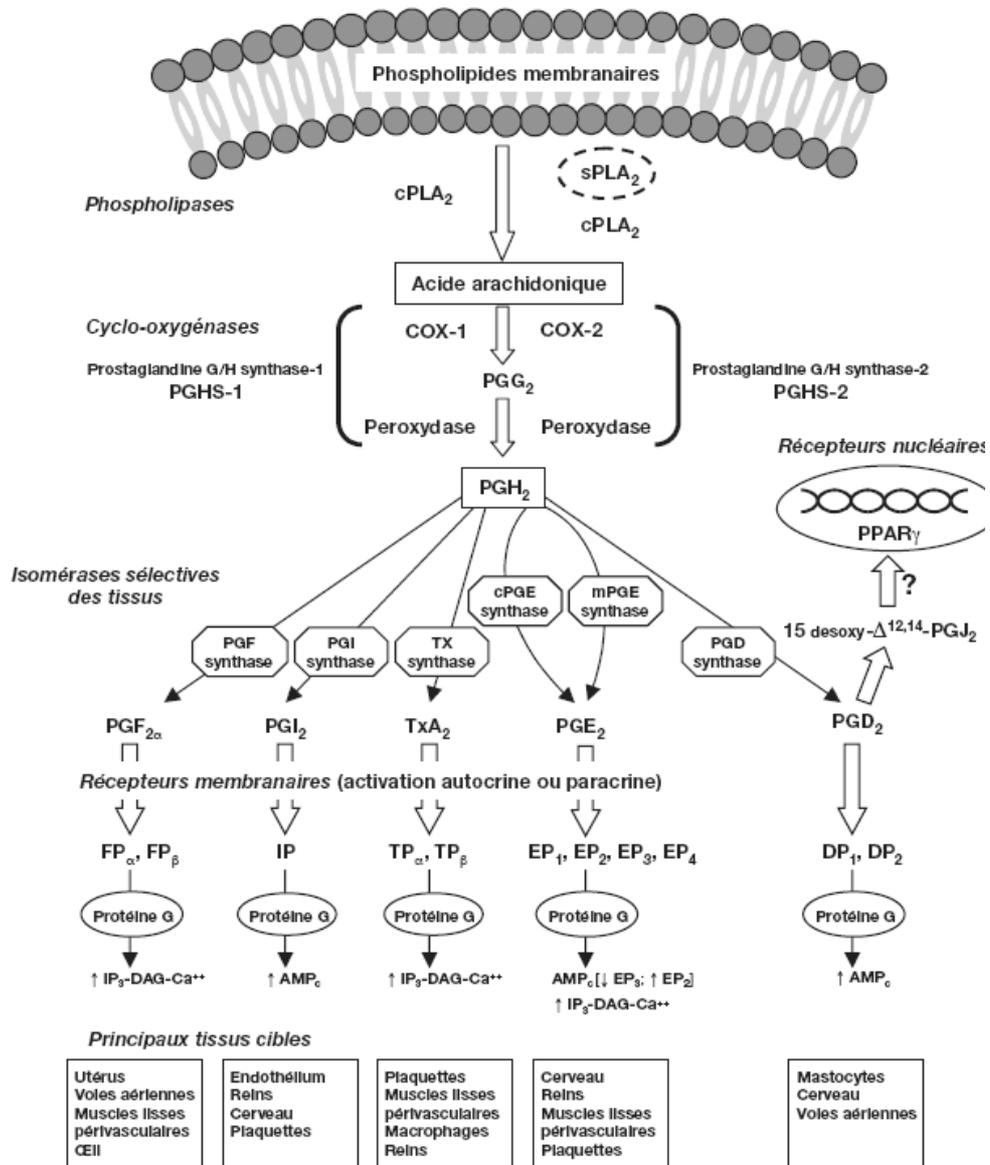


Fig. 10 : Résumé des voies d'action des métabolites de l'AA
(adapté de Jouzeau J.-Y. et al., 2004)

démontré que certains tissus exprimaient COX-2 de façon constitutive, notamment le cerveau et la prostate (Katori M., Majima M., 2000).

Il existe également une variante de COX-1, que certains appellent COX-1b ou encore COX-3 (Chandrasekharan N.V. et al., 2002) exprimée dans le cerveau, qui est en fait le produit d'un épissage différent du gène de COX-1 résultant de l'action de différentes cytokines. Son inhibition (notamment par le paracétamol) pourrait être à l'origine d'une partie de l'effet antalgique de certains AINS. COX-3 étant donc une variante très proche de COX-1, et à cause de sa distribution très spécifique, nous n'évoquerons dans la suite que les données connues sur COX-1 et COX-2.

b) Structures de COX-1 et COX-2 : similitudes et différences

COX-1 et COX-2 ont une masse de 71 kDa environ, mais l'ARN messager qui leur est associé diffère fortement : il fait 2,8 kb pour COX-1 et 4,5 kb pour COX-2, et l'activation de leur transcription se fait de manière très différente comme nous l'avons évoqué précédemment.

Après traduction, cette enzyme se retrouve dans la membrane luminale du réticulum endoplasmique ainsi que dans les feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire des monocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Cependant, on peut noter une localisation préférentielle et une activité COX-2 plus importante dans l'enveloppe nucléaire (Spencer A. G. et al., 1998).

Au niveau structural, on peut constater à tous les niveaux aussi bien des similitudes que des différences marquées entre les 2 isoformes. Dans la structure primaire, la séquence en acides aminés présente une homologie d'environ 60%, les acides aminés nécessaires à l'interaction avec l'acide arachidonique étant tous conservés.

Les structures 3D ont été publiées au milieu des années 90 aussi bien pour COX-1 (Picot D. et al., 1994) que pour COX-2 (Luong C. et al., 1996). Ces enzymes, organisées en homodimères, sont globalement identiques, et présentent trois sous-domaines (Kurumbail R. G. et al., 2001) (Fig. 11) :

- un domaine N-terminal « *Epidermal Growth Factor like* »
- un motif en hélice de liaison à la membrane
- un domaine catalytique en C-terminal représentant environ 80% de la protéine.

Ce domaine catalytique se présente sous la forme d'un long tunnel hydrophobe dont l'entrée se situe à proximité du domaine de liaison à la membrane. Dans le cas de COX-2, le site de cyclooxygénation est légèrement plus grand que celui de COX-1 d'environ 17% en présentant en plus une poche hydrophobe latérale (Botting R. M., 2006).

Dans la suite nous allons utiliser la numérotation des acides aminés de COX-1 appliquée à COX-2 (bien que COX-2 présente une insertion de 18 acides aminés dans la partie C terminale non utiles à l'activité catalytique).

Il existe deux acides aminés essentiels à l'activité de cyclooxygénation sur l'acide arachidonique (Garavito R. M., DeWitt D. L. 1999) :

- ³⁸⁵Tyr : situé au sommet du canal, il initie la réaction enzymatique et sert de passerelle vers le site de peroxydation, il est le principal intervenant de la réaction d'oxydation ;
- ¹²⁰Arg : son groupement guanidine intervient dans une liaison électrostatique avec la fonction acide de l'AA (ou de certains inhibiteurs de type anti-inflammatoires non

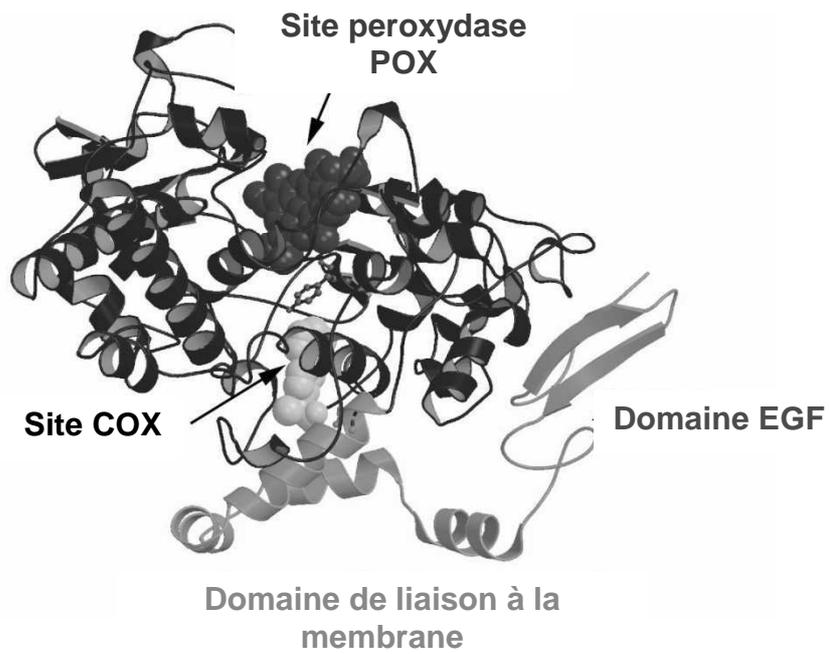


Fig. 11 : Modèle 3D de COX, comportant un noyau hème (en rouge) dans le site peroxydase et un site COX occupé ici par le Flurbiprofène (jaune)
(adapté de Kurumbail R. G., 2001)

stéroïdiens) en entrée de tunnel et assure la bonne position du ligand, cet acide aminé étant « le » plus important pour l'activité de COX et le *docking* des AINS.

Un noyau hème présent dans un site voisin totalement indépendant du site de cyclooxygénation, est également indispensable à l'activité peroxydase.

Bien que ces acides aminés indispensables soient présents dans les deux isoformes, il existe des différences notables dans la séquence primaire alentour, qui conduisent à de subtiles modifications de l'environnement électronique et de l'encombrement stérique dans le site actif (adapté de Garavito R. M., DeWitt D. L., 1999 et de Garg R. et al., 2003) (Fig. 12) :

- ⁵²³Ile et ⁴³⁴Ile de COX-1 sont remplacées par des valines dans COX-2. Ceci entraîne, après déplacement des acides aminés voisins, une poche hydrophile latérale supplémentaire par déplacement de ⁵¹⁸Phe, donnant accès à ⁵¹³Arg ce qui permet la création d'une liaison hydrogène ;
- Le remplacement de ⁵⁰³Phe par une leucine permet le déplacement de la ³⁸⁴Leu au sommet du canal de COX-2, engendrant la formation d'une cavité lipophile.

Ces différences ne conduisent pas à une modification de l'activité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat naturel qu'est l'acide arachidonique. En revanche, au point de vue pharmacologique, ce type de modifications va permettre un design efficace de nouveaux médicaments plus sélectifs de telle ou telle isoforme.

c) *Fonctions spécifiques de COX-1 et COX-2 (Botting R. M., 2006)*

Les isoformes COX-1 ou COX-2 aboutissent à la synthèse d'eicosanoïdes agissant sur les mêmes fonctions (Fig. 10) mais avec une localisation et une intensité souvent bien différentes.

(a) Système cardiovasculaire

Les plaquettes n'expriment que COX-1 qui ici ne produit que TXA₂, un agrégant plaquettaire. A l'inverse, COX-1 localisé dans les cellules endothéliales exprime majoritairement la prostacycline, dont un des rôles est de limiter certaines étapes de l'agrégation plaquettaire. On se trouve donc ici face à un système équilibré de contrôle, qui va, entre autres, permettre la réparation de tissus endommagés tout en ralentissant la formation de thromboses.

Dans les vaisseaux normaux, l'expression de COX-2 est très faible, même si elle participe à la fabrication de prostacycline PGI₂. En revanche, on constate d'importants niveaux de COX-2 dans les vaisseaux néoformés et les plaques d'athéromes.

(b) Tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est protégé principalement par deux types de prostanoides : essentiellement par PGE₂ et en partie par les prostacyclines. Ceux ci sont produits en majorité par COX-1 au niveau de la muqueuse gastrique et des cellules musculaires lisses du tractus gastro-intestinal, et vont avoir pour effet l'augmentation de la circulation sanguine par dilatation des vaisseaux au niveau de cette muqueuse tout en réduisant la production des acidifiants gastriques. Dans le côlon cependant, on peut constater une forte expression de COX-2.

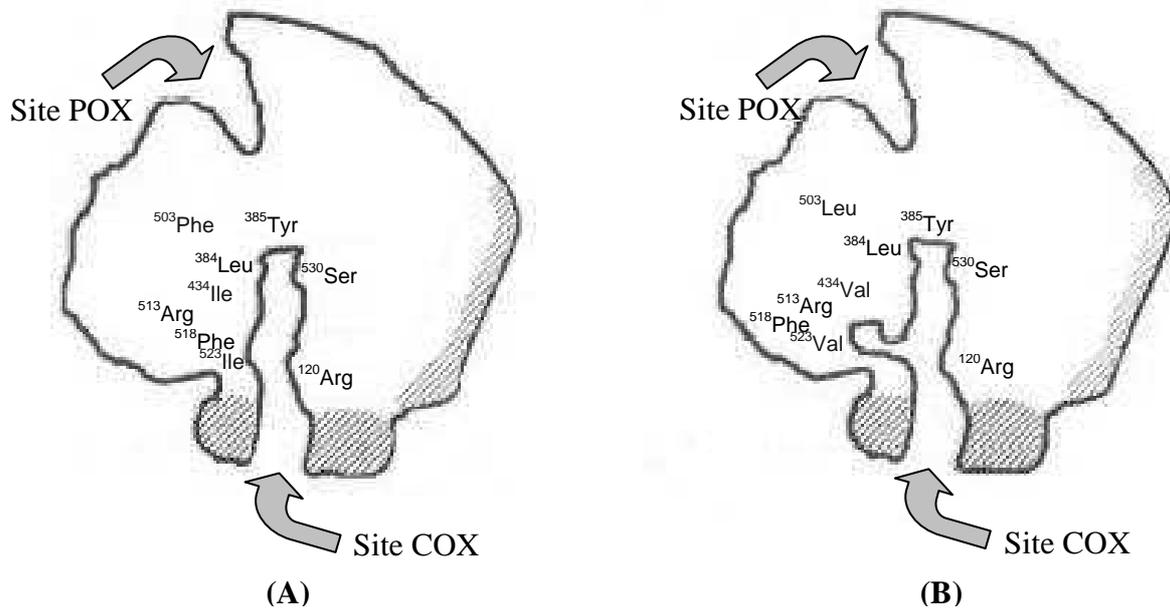


Fig. 12 : Sites actifs des COX-1 (A) et COX-2 (B)
 (adapté de Moore B.C. et Simmons D.L, 2000)

(c) Reins

Au niveau rénal, on retrouve principalement PGE₂, ainsi qu'une quantité moindre de TXA₂ et de prostacyclines, dont l'origine est principalement liée à COX-1. A ce niveau, la production de prostanoïdes n'est pas indispensable au fonctionnement normal de l'organe ; en revanche, en cas de pathologie même mineure, il est extrêmement important que les prostaglandines vasodilatatrices puissent venir agir et faciliter le fonctionnement du rein.

(d) Système nerveux central

La quasi-totalité du cerveau exprime COX-1 où sa fonction principale est la production de PGE₂ visant au contrôle du système nerveux périphérique ainsi qu'à la bonne transmission de l'information du toucher et de la douleur. COX-2 peut être exprimée dans les vaisseaux de l'hypothalamus et induire de la fièvre par formation de PGE₂. Une forme constitutive de COX-2 est également présente lors du développement du cerveau et jouerait un rôle dans l'organisation nerveuse.

L'altération de toutes ces fonctions physiologiques par les inhibiteurs non sélectifs de la cyclooxygénase sont sources d'effets secondaires qui peuvent être plus ou moins importants lors de prises rapprochées et à hautes doses de ce type de composés.

B - INHIBITEURS DE LA CYCLOOXYGENASE

1. Inhibiteurs non sélectifs

a) Classification des AINS (Fig. 13)

Les métabolites de l'AA résultant de l'action enzymatique de la cyclooxygénase sont des médiateurs indispensables au mécanisme de l'inflammation. Inhiber la cyclooxygénase semble une solution intéressante pour le traitement de l'inflammation, en particulier chronique, par la limitation de la quantité de médiateurs pro-inflammatoires produits. Ce sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui possèdent à la fois une activité anti-inflammatoire et analgésique, en inhibant la cyclooxygénase de façon non sélective.

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, de très nombreuses molécules ont été synthétisées afin d'augmenter la spécificité par rapport à l'aspirine et de diminuer les effets secondaires, notamment gastriques. Ces composés sont généralement classés par famille chimique, tout en présentant certaines analogies structurales.

- les fénacs : diclofénac, indométhacine, sulindac... portant une fonction acide
- les profènes : ibuprofène, kétoprofène, naproxène,... dont la particularité est de porter une fonction acide sur un carbone asymétrique
- les oxicames : piroxicam, tenoxicam... dérivés carboxamides du benzothiazine dioxyde
- les acétylants de la ⁵³⁰Ser : aspirine, *o*-(acetoxyphenyl)hept-2-ynyl-sulfide et certains dérivés de l'acide salicylique.

La plupart de ces composés présentent un groupement capable de créer une liaison ionique avec l'arginine 120 qui se situe en entrée du site actif.

On peut également classer les AINS en fonction de leurs interactions avec l'enzyme (Kurumbail R.G. et al., 1996).

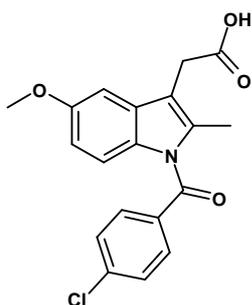
- inhibiteurs irréversibles de COX-1 et 2 : c'est le cas de l'aspirine, qui acétyle ⁵³⁰Ser, ce qui empêche l'AA de se loger dans la cavité de cyclooxygénation ;
- inhibiteurs compétitifs réversibles COX-1 et 2 : c'est le cas des oxicames et de la majorité des profènes ;
- inhibiteurs réversibles dépendant du temps : c'est le cas entre autres de l'indométhacine et du flurbiprofène, qui par l'interaction avec ¹²⁰Arg se logent dans le site catalytique et bloquent la configuration de l'enzyme.

b) Effets secondaires des AINS

Il a été mentionné précédemment le rôle important de COX-1 dans nombre de processus de régulation, particulièrement gastriques. Les AINS sont des inhibiteurs non sélectifs, et entraînent donc des effets secondaires assez importants :

- saignements et ulcérations gastriques : PGE2 et PGI2 sont des protecteurs de la muqueuse gastrique. Leur diminution, consécutive à l'inhibition de l'activité de la COX, fragilise cette muqueuse et entraîne des saignements voire des ulcérations au niveau de l'estomac. Pour cette raison, la prise d'AINS doit préférentiellement se faire

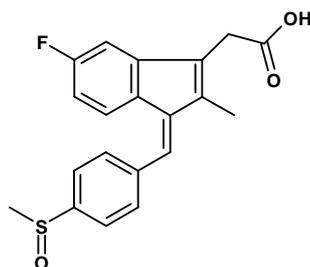
Les fénacs



Indométhacine

CI₅₀ COX-1 = 0,16 μM

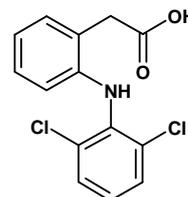
CI₅₀ COX-2 = 0,46 μM



Sulindac

CI₅₀ COX-1 = 1,02 μM

CI₅₀ COX-2 = 10,43 μM

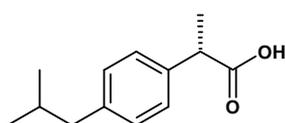


Diclofénac

CI₅₀ COX-1 = 0,14 μM

CI₅₀ COX-2 = 0,05 μM

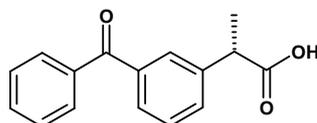
Les profènes



Ibuprofène

CI₅₀ COX-1 = 4,7 μM

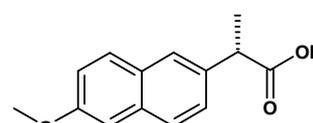
CI₅₀ COX-2 > 30 μM



Kétoprofène

CI₅₀ COX-1 = 0,02 μM

CI₅₀ COX-2 = 1,08 μM

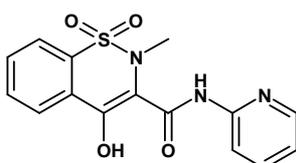


Naproxène

CI₅₀ COX-1 = 7,76 μM

CI₅₀ COX-2 = 74 μM

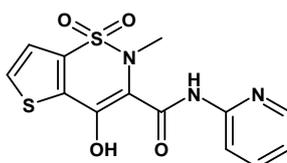
Les oxicames



Piroxicam

CI₅₀ COX-1 = 0,76 μM

CI₅₀ COX-2 = 9,0 μM

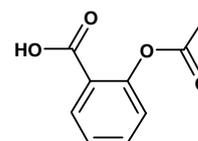


Tenoxicam

CI₅₀ COX-1 = 2,30 μM

CI₅₀ COX-2 = 14 μM

L'aspirine



Aspirine

CI₅₀ COX-1 = 0,3 μM

CI₅₀ COX-2 = 50 μM

Figure 13 : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les valeurs d'inhibition enzymatique sont déterminées à partir d'expériences sur sang total

au cours des repas. Différentes associations et *prodrugs* sont également envisagées, comme des composés à libération lente, ou encore des composés mixtes possédant un groupement donneur de monoxyde d'azote (NO) permettant de protéger le tractus gastrointestinal, en particulier par ses propriétés de dilatation des vaisseaux sanguins de l'estomac.

- diminution de l'activité rénale : les prostaglandines sont également des modulateurs de la filtration glomérulaire, et la diminution de leur production entraîne une augmentation de la rétention hydrosodée pouvant conduire à une insuffisance rénale.
- bronchoconstriction : PGE₂ étant un bronchodilatateur assez puissant, sa diminution peut entraîner des crises d'asthme.
- ralentissement de l'agrégation plaquettaire : c'est ici la thromboxane TXA₂, facteur d'agrégation plaquettaire, qui entre en jeu. Lors de la prise d'AINS, le temps de formation d'un agrégat de plaquettes est augmenté, ce qui allonge donc la durée de saignement. Il faut noter que l'aspirine présente un effet antiagrégant plaquettaire exacerbé : étant un inhibiteur irréversible, et les plaquettes ne pouvant synthétiser COX, son effet est d'autant plus important. Cet effet secondaire est utilisé dans la prévention des thromboses, par la prise quotidienne de faibles doses d'aspirine.

Il existe d'autres effets secondaires qui, même si moins fréquents, sont importants et peuvent entraîner des contre-indications : allergies (jusqu'à l'œdème de Quincke), insuffisance hépatique (syndrome de Reye), problèmes hématologiques...

Tous ces effets secondaires découlent d'une altération de la fonction physiologique normale de la cyclooxygénase, qui est attribué depuis les années 90 à l'isoforme COX-1. La recherche pharmaceutique s'est donc naturellement orientée vers la conception d'inhibiteurs sélectifs de COX-2.

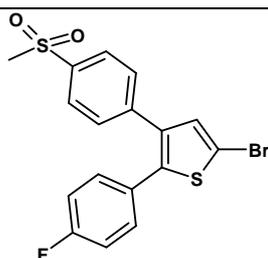
Pour compléter cette liste on peut citer l'intérêt des inhibiteurs mixtes COX / LOX qui vont éviter, par un effet de bascule, la formation de leucotriènes aux effets pro-inflammatoires proches de ceux des prostaglandines (Goossens L. et al., 2007).

2. Inhibiteurs sélectifs (Singh P. et Mittal A., 2008)

a) *Les différentes classes*

Avant l'identification de l'isoforme inductible de la cyclooxygénase, un anti-inflammatoire puissant avait été identifié, le DuP-697. Il ne possédait cependant pas le même profil d'inhibition que ses homologues (Gans K.R. et al., 1990). La découverte de COX-2 a permis d'identifier le mode d'action de ce composé, et a souligné l'intérêt d'une inhibition sélective de cette isoforme.

DuP-697



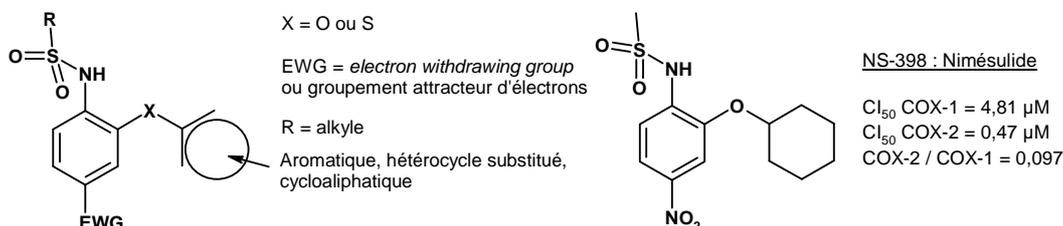
CI₅₀ COX-1
= 1,18 μM

CI₅₀ COX-2
= 0,06 μM

Premier représentant de la classe des coxibs. Son temps de demi-vie est trop long (292 h) pour être utilisé autrement que comme outil pharmacologique.

Les inhibiteurs sélectifs COX-2 sont devenus la principale voie de recherche pour les maladies de l'inflammation, avec plus de 500 composés décrits en une dizaine d'années, dont seulement trois ont été mis sur le marché. Ils sont assez hétérogènes et possèdent plusieurs structures types.

(e) Structures de type diaryléthers, tels que le NS-398



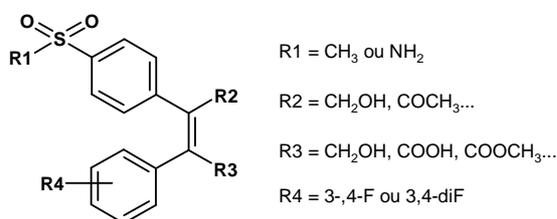
Ce sont les premiers composés découverts : éther ou thioéther, ils ont tous en commun un groupement sulfonamide possédant un -NH acide qui semble indispensable à l'activité. Le premier représentant de cette classe est le nimésulide. De nombreux composés ont été synthétisés et ont permis de mettre en avant des relations structure - activité (De Leval X. et al., 2000).

(f) Structures d'AINS modifiés

Cette approche peut sembler la plus logique et la plus intéressante, même si les groupements indispensables à l'activité ne sont plus les mêmes. En particulier, l'arginine 120 n'est plus un acide aminé de première importance dans l'interaction ligand - récepteur. La stratégie classique utilisée ici est l'augmentation de l'encombrement des composés afin de tirer profit de l'élargissement du site, en particulier dans le fond du tunnel hydrophobe. Des études de modifications structurales ont été réalisées sur plusieurs composés, en particulier sur l'indométhacine (Dannhardt G., Laufer S., 2000), comme présenté dans la figure ci-contre (Fig. 14). Ceci a permis entre autres de fournir de nouvelles pistes de recherche pour les Coxibs.

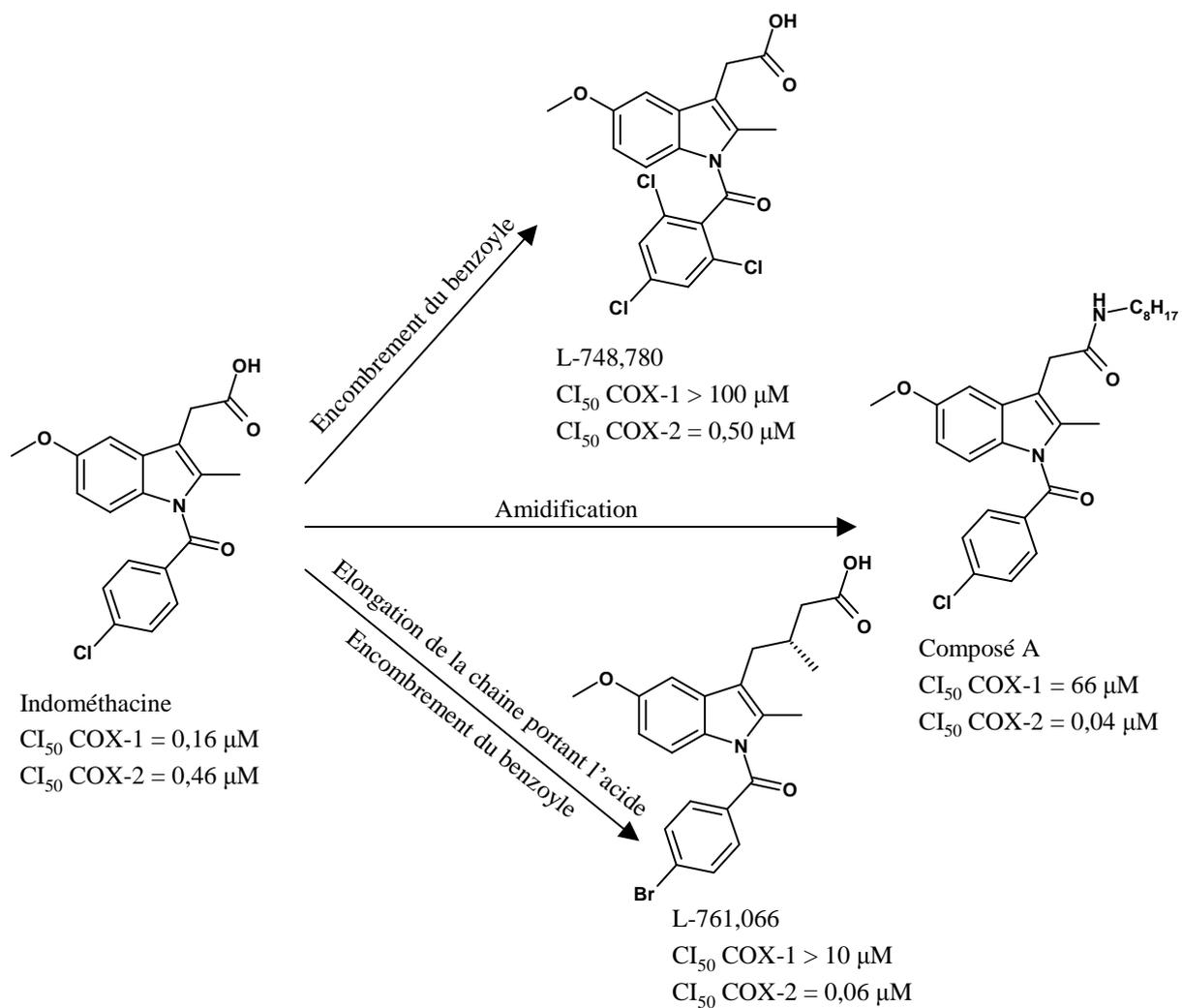
(g) Les dérivés du cis-stilbène

Ces composés présentent une orientation vicinale des deux aryles, ainsi qu'un groupement sulfonyle, comme les coxibs (Blac C. et al., 1997). Leurs orientations dans l'espace sont également assez similaires.



(h) Structures de types diaryles vicinaux (Coxibs)

La structure est caractérisée par la présence de deux aryles, l'un portant généralement un groupement sulfonylé, liés à un hétérocycle, pouvant lui-même être de natures différentes



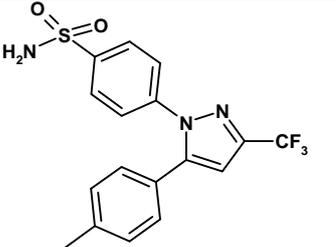
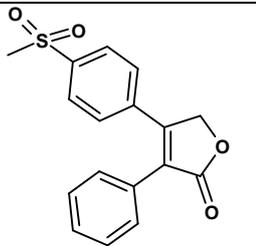
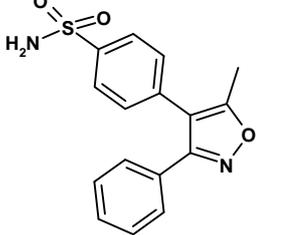
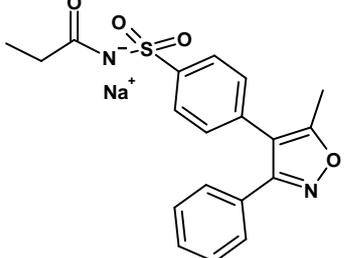
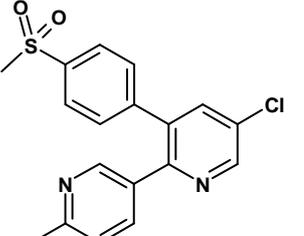
Les valeurs d'inhibition enzymatique sont déterminées à partir d'expériences sur sang total humain.

Fig. 14 : Modification de l'indométhacine en vue d'une sélectivité COX-2
 (adapté de Dannhardt G. et Kiefer W., 2001)

(pyrazole, furanone...). Cet hétérocycle a pour fonction l'orientation de la molécule dans le site actif (cf structure du DuP 697).

C'est la classe d'inhibiteurs sélectifs COX-2 qui a suscité le plus grand intérêt et la mise sur le marché de plusieurs composés comme le Célécoxib (Celebrex[®]) (Penning T.D. et al., 1997), ou le Rofécoxib (Vioxx[®]) (Ehrlich E.W. et al., 1999), pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde. Cette classe est encore prometteuse et plusieurs candidats « médicament » existent ; c'est pour cette raison que nous avons retenu cette classe comme exemple d'inhibiteurs sélectifs COX-2 dans la suite de nos travaux.

Actuellement, plusieurs coxibs sont ou ont été commercialisés [CI₅₀ obtenues sur sang total humain (Riendeau D. et al., 2001)].

Célécoxib, Celebrex [®]		CI ₅₀ COX-1 = 6,7 μM CI ₅₀ COX-2 = 0,87 μM	Premier inhibiteur COX-2 approuvé par la <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) en 1998 pour le traitement de l'ostéoarthrite et de l'arthrite rhumatoïde (Goldenberg M.M., 1999), et en 2000 pour la réduction des polypes adénomateux colorectaux.
Rofécoxib, Vioxx [®]		CI ₅₀ COX-1 = 18,8 μM CI ₅₀ COX-2 = 0,53 μM	Commercialisé en 1999 pour le traitement de l'inflammation aiguë, de l'ostéoarthrite et de la dysménorrhée (Prasit P. et al., 1999) et en 2002 pour l'arthrite rhumatoïde, mais retirée du marché en 2004.
Valdécoxib, Bextra [®]		CI ₅₀ COX-1 = 26,1 μM CI ₅₀ COX-2 = 0,87 μM	Approuvé en 2001 pour le traitement des maladies rhumatismales par la FDA. Sa solubilité aqueuse est faible, comme celle du Rofécoxib et du Célécoxib (Talley J. J. et al, 2000a).
Sodium Parécoxib Dynastal [®]		<i>Similaire au Valdécoxib</i>	Prodrogue du Valdécoxib présentée sous forme ionique, elle présente une grande solubilité aqueuse et peut ainsi être utilisée en intramusculaire ou en intraveineuse (Talley J. J. et al, 2000b).
Etoricoxib		CI ₅₀ COX-1 = 116 μM CI ₅₀ COX-2 = 1,1 μM	Composé commercialisé (Belgique - Arcoxia [®] -...) ou en cours de commercialisation dans plusieurs pays (France, USA...) (Martina S. D. et al., 2005). Efficace contre l'inflammation et la douleur, peu d'effets sur le TGI, mais effets cardiovasculaires encore mal explicités.

b) Les effets secondaires d'une inhibition sélective de COX-2

Les effets secondaires gastriques présentés par les AINS, peut-être à l'exception du nimésulide (Suleyman H. et al., 2008), ne sont pas totalement disparus, même s'ils sont bien moins importants (Fig. 15). En revanche, d'autres effets secondaires se sont manifestés à plus long terme.

Certains des effets secondaires constatés ont permis de mettre en évidence le rôle de l'isoforme COX-2 dans la régulation du système Rénine – Angiotensine (Harris R.C. et al., 1994). Ce sont des effets hypertenseurs, des dysfonctions rénales, et des effets de retard sur la cicatrisation des plaies de type ulcères.

Enfin, cette isoforme étant exprimée de manière constitutive dans certaines parties du cerveau, il est possible mais très rare de voir apparaître certaines pathologies touchant le système nerveux central comme des vertiges.

L'effet secondaire qui a donné et qui donne encore lieu aux plus nombreuses études est le risque de complications cardiovasculaires. L'étude clinique VIGOR (*Vioxx Gastrointestinal Research Outcome*) a mis en évidence une augmentation des risques d'infarctus et de thrombose lors de prises répétées de Rofécoxib, probablement due à la baisse de production de PGE₁, prostaglandine vasodilatatrice. La mort de certains patients a déclenché une plus large étude clinique, appelée APPROVe (*Adenomatous Polyp PRevention on Vioxx*) dont les conclusions ont entraîné le retrait du marché du Rofécoxib par Merck Sharp & Dohme-Chibret le 30 septembre 2004. Après 18 mois de traitement, le risque relatif de problèmes cardiovasculaires augmente d'un facteur 2 versus placebo : la recherche s'oriente donc actuellement vers des composés mixtes (donneurs de NO, inhibiteurs 5-LOX...) pouvant éviter au maximum ces effets secondaires. Une voie intéressante réside dans l'ajout d'un groupement donneur de NO, élément capable en particulier d'entraîner une vasodilatation et ainsi de diminuer les risques cardiovasculaires liés à l'utilisation des coxibs.

Il faut noter que ce problème semble propre au Rofécoxib et non aux COX-2 sélectifs dans leur ensemble. L'étude CLASS (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*) n'a pu déceler aucune différence entre un AINS classique et le Célécoxib pour les mêmes occurrences cardiovasculaires. Ceci pourrait indiquer que c'est un métabolite spécifique du Vioxx qui serait à l'origine de ses effets délétères.

3. Inhibition de COX-2 : les autres applications

Bien que possédant des effets secondaires, les inhibiteurs sélectifs COX-2 pourraient disposer d'un intérêt thérapeutique renouvelé : leur utilité dans d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer et notamment le cancer étant actuellement l'objet de beaucoup de réflexion.

Dans certaines parties du système nerveux central, COX-2 est exprimée de façon constitutive, en particulier dans certains neurones excitateurs. De plus, elle est également exprimée de façon inductible dans d'autres neurones, au cours de stimuli excitateurs type ischémie. Des expériences ont montré que les inhibiteurs COX-2 exercent leurs effets à doses thérapeutiques à la fois en périphérie, dans le cerveau, et dans la moelle épinière. L'analgésie consécutive à leur prise serait donc en partie due à un effet central.

L'homéostasie neuronale peut être associée à un taux basal en PG dans le SNC, taux basal lui-même associé au développement du cerveau (Halliday G. et al., 2000). En particulier, COX-2 semble présent dans la glie de certaines parties de l'hippocampe et du cortex associées

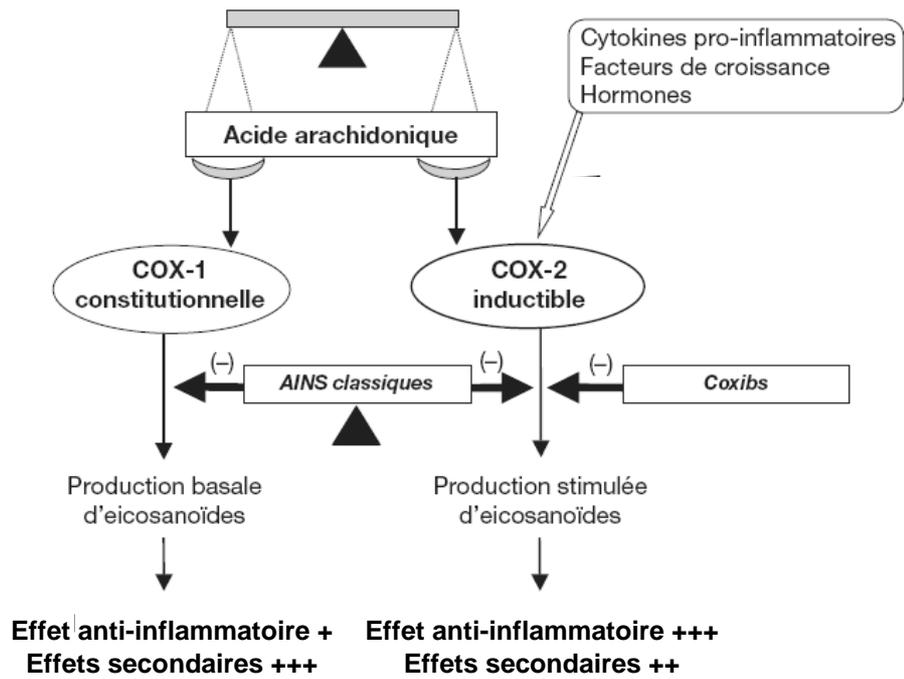


Fig. 15 : Effets de l'inhibition COX-1 versus COX-2
 (adapté de Jouzeau J.-Y. et al., 2004)

à la cognition. De plus, la surexpression de COX-2 est associée à la cascade de l'inflammation : il semble alors possible que COX-2 joue un rôle dans les maladies neurodégénératives type choc, Alzheimer, Parkinson... (Liang X. et al., 2007) Ces hypothèses sont actuellement en cours de vérification *in vitro* et *in vivo* car il existe une controverse (Firuzi O. Pratico D., 2006)

La plaque d'athérome, siège d'une inflammation chronique, exprime l'isoforme inducible de la cyclooxygénase (COX-2) qui produit préférentiellement de la PGE2. Il est donc plausible que la production de PGE2 dans cette plaque soit l'un des mécanismes du potentiel thrombogène de cette plaque : inhiber COX-2 permettrait donc à ce niveau de limiter les complications de l'athérosclérose, même si ces résultats sont actuellement également controversés (Cipollone F. et al., 2008).

Une autre voie de développement pour les inhibiteurs COX-2 sélectifs en cours d'exploration est le traitement du cancer. En effet, l'isoforme de cette enzyme est un acteur important dans cette pathologie.

C - IMPLICATION DE COX-2 DANS LA PATHOLOGIE CANCEREUSE

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la régulation de COX-2 était une des étapes clés de la cancérisation (DuBois R. N. et al., 1998 ; Prescott S. M., Fitzpatrick F. A., 2000 ; Liu C. H. et al., 2001). A titre d'exemple, un certain nombre d'études précliniques et/ou cliniques ont exploré ce sujet dans le cas du côlon (Antonakopoulos N., Karamanolis D. G., 2007), du sein (Agrawal A. Fentiman I. S., 2008), du foie (Breinig M. et al., 2007), de la peau (Rundhaug J. E., Fischer S. M., 2008), ou encore des gliomes de haut grade (Hau P. et al., 2007). Pour ce qui est du cancer de la prostate, de nombreuses études ont souligné l'implication de COX-2 dans la pathologie et donc dans les possibilités d'intervention (revue dans Goossens L. et al., 2007). COX-2 est surexprimée dans le cancer de la prostate (Gupta S. et al., 2000) tout au long du processus cancéreux depuis le stade précoce de l'hyperplasie jusqu'au stade métastatique (Aparicio Gallego G. et al., 2007). En amont, COX-2 est également impliquée dans le lien très étroit existant entre inflammation et néoplasie prostatique (Sciarra A. et al., 2007).

Par la voie des cyclooxygénases, un apport d'AA, de PGE₂ (Hughes-Fulford M. et al., 2001), ou même de graisse animale (source d'acide linoléique précurseur de l'AA) permettent de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques au stade hormono-indépendant du cancer (Tjandrawinata R. R. et al., 1997). De plus, l'acide arachidonique peut induire au niveau de la moelle osseuse, et via l'activité COX-2, une libération de TNF- α favorisant la communication entre cellules prostatiques et cellules osseuses (Angelucci A. et al., 2008). Les prostaglandines ont également une activité stimulatrice sur la sécrétion hormonale ce qui influence là encore la genèse d'un cancer. De façon réciproque, il a été montré que l'hormonothérapie (agonistes LH-RH, anti-androgènes) pouvait avoir comme effet secondaire d'induire l'expression de COX-2 et orienter le processus tumoral vers le stade d'hormono-indépendance (Cai Y. et al., 2008). Tout ceci a conduit à penser que COX-2 jouait un rôle au niveau de toutes les étapes de la progression tumorale et de nombreuses études (Telliez A. et al., 2006) ont cherché à expliciter l'influence de cette enzyme dans chaque étape de la cancérogenèse, tout en s'efforçant de proposer des alternatives thérapeutiques (Liao Z. et al., 2007).

1. Rôle de la cyclooxygénase dans les différents aspects de la pathologie (Fig. 16)

a) Initiation et promotion de la tumeur.

Le métabolisme de l'acide arachidonique en lui-même est une source d'agents cancérogènes de par sa nature : en utilisant un intermédiaire peroxyde, on se trouve en présence d'une source potentielle de radicaux libres, qui sont dangereux pour l'organisme car pouvant former des adduits avec l'ADN (Nikolic D., Van Breemen R. B., 2001). Les cyclooxygénases peuvent également activer certaines substances « pro » cancérigènes d'origines environnementales ou alimentaires (amines aromatiques et hétérocycles, hydrocarbures polycycliques...) au niveau des sites extra-hépatiques et provoquer ainsi des altérations au niveau de l'ADN ou des protéines cellulaires impliquées dans la progression tumorale (Wiese F. W. et al., 2001).

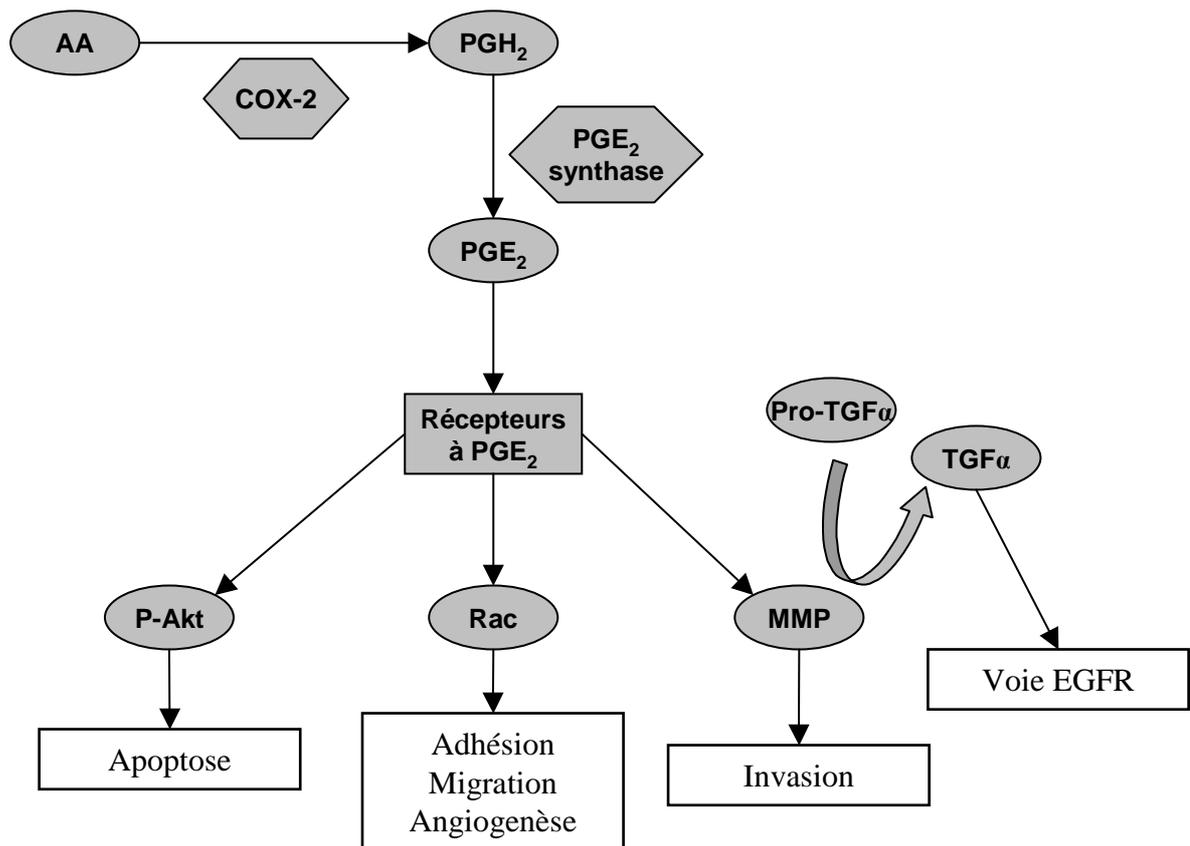


Fig. 16 : Résumé de l'influence de PGE₂ sur les différents aspects de la pathologie cancéreuse

La production de PGE₂ (par COX-1 ou par COX-2) va par la suite être un facteur influençant l'installation du processus tumoral et ce principalement par deux voies :

- l'activation de la voie PI-3K/Akt qui va induire la survie cellulaire
- l'activation des récepteurs des facteurs de croissance (Han C. et Wu T., 2005), qui va stimuler l'intervention des voies de signalisation (Ras/MAPK, JAK/STAT, PI3K) (Telliez A. et al., 2006).

A noter également le rôle déterminant de COX-2 et des récepteurs EP2 et EP4 dans l'expression de l'aromatase qui catalyse la synthèse des oestrogènes à partir des androgènes après la ménopause (Subbaramaiah K. et al., 2006).

b) Apoptose

Plusieurs études ont démontré que des rats présentant une surexpression de COX-2 montraient également une surexpression en protéine anti-apoptotique Bcl-2 qu'un traitement par un AINS permettait de contrebalancer (Tsujii M., DuBois R. N., 1995). La protéine pro-apoptotique Bax est quant à elle présente en bien plus faible quantité (Liu C. H. et al., 2001). De plus, COX-2 participe à la régulation en NO, qui a un effet dose dépendant dans la régulation de l'apoptose, ce qui sera étayé dans la quatrième partie du travail.

Enfin, cet effet anti-apoptotique est surtout médié par le cross-talk existant entre COX-2 et p53 (de Moraes E. et al., 2007). Selon le type de cancer et le contexte biologique, la protéine p53 peut contrôler l'expression de COX-2 via NF-κB qui, en retour, contrôle l'activité transcriptionnelle de p53.

c) Angiogenèse

Nous avons vu que la création de vaisseaux destinés à l'irrigation d'une tumeur est indispensable pour que cette tumeur puisse dépasser une certaine taille. Or, la production de prostanoïdes va pouvoir activer des médiateurs pro-angiogéniques, en particulier VEGF et FGF, ce qui va avoir un effet important sur la vitesse de formation des vaisseaux autour de la tumeur (Iniguez M. A. et al., 2003). Ceci a été prouvé par l'utilisation de Célécoxib dans un modèle animal, où l'on a pu observer une diminution de la taille des vaisseaux formés au cours de l'angiogenèse (Masferrer J. L. et al., 2000). Ce sont donc essentiellement VEGF et les intégrines, responsables de l'adhésion des cellules endothéliales et de la MEC (également sous le contrôle de COX-2) qui médient l'angiogenèse tumorale COX-2 dépendante (Dermond O. et Rüegg C., 2001) (Fig. 17).

d) Invasion et métastases

Tout d'abord, il a été prouvé que la surexpression de COX-2 induisait la synthèse des MMPs et donc facilitait la mobilité des cellules tumorales dans la matrice (Tsujii M. et al., 1997). De plus, COX-2 induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine (Okamoto A. et al., 2008). Un mécanisme plus indirect impliquerait un effet modulateur des inhibiteurs de COX et des antagonistes EP4 sur l'activité des cellules NK responsables de la lyse des cellules transformées (Fulton A. M. et al., 2006). Tout ceci va expliquer l'effet inducteur de COX-2 sur le détachement des cellules cancéreuses, leur passage et leur progression dans la circulation sanguine ou le réseau lymphatique.

e) COX-2, système immunitaire et inflammation.

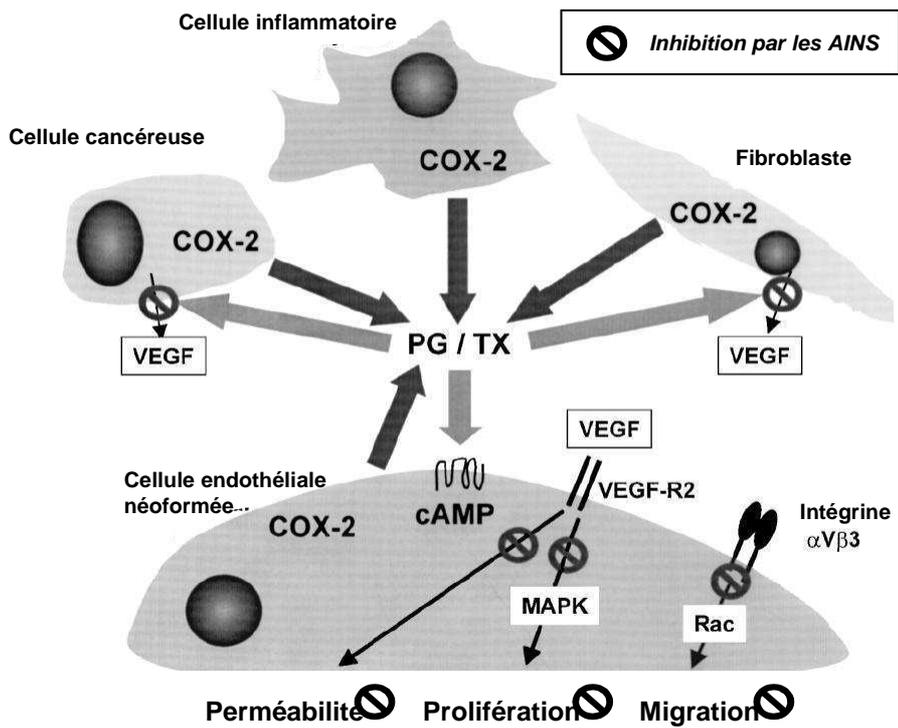


Fig. 17 : Résumé du rôle de COX-2 dans l'angiogénèse
 (adapté de Dermond O. et Ruegg C., 2001)

La PGE2 induit directement l'interleukine-10, qui a un effet immunosuppresseur, et inhibe la production de lymphokines, la prolifération des cellules B et T et l'activité cytotoxique des cellules NK (Huang M. et al. 1998), ce qui crée un espace favorable à la prolifération des cellules non différenciées.

2. Les inhibiteurs de cyclooxygénase comme anticancéreux

Avant d'évoquer quelques études cliniques menées actuellement avec des AINS ou avec le Célécoxib, il faut préciser que la question qui se pose à l'heure actuelle est de savoir si cet inhibiteur sélectif COX-2 présente ses activités antitumorales uniquement via son effet inhibiteur enzymatique ou s'il possède d'autres cibles au niveau de la cellule transformée (Schönthal A. H. 2007). Il est en effet surprenant que des analogues structuraux très proches du Célécoxib (Fig. 18) mais dépourvus de cette activité inhibitrice COX-2 (tels que le 2,5-diméthyl Célécoxib ; Schönthal A. H. et al., 2008) soient capables de mimer toutes les activités antitumorales du Célécoxib, *in vitro* et *in vivo* (Song X. et al., 2002 ; Kulp S. K. et al., 2004). Même si le rôle de COX-2 est indéniable dans la pathologie cancéreuse (Fürstenberger G. et al., 2006), il est tout autant évident que ce type de molécules interfère avec d'autres cibles intracellulaires. Le groupement sulfonamide pourrait orienter vers un effet inhibiteur des anhydrases carboniques. Ces métalloenzymes, les isoformes CAs IX et XII en particulier, sont impliquées dans la croissance tumorale (Pastorekova S. et al., 2007) et on a pu noter *in vitro* que le Célécoxib et le Valdécoxib inhibaient l'enzyme contrairement au Rofécoxib portant un groupement méthylsulfone (Weber A. et al., 2004).

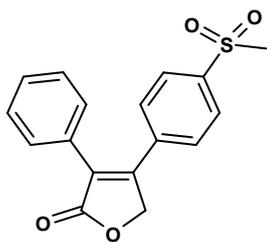
L'inhibition de PDK-1 (3-phosphoinositide-dépendant kinase-1), enzyme cruciale dans les voies de signalisation de la croissance et de la survie cellulaire, a aussi été évoquée (Arico S. et al., 2002 ; Kulp S. K. et al., 2004). Cette hypothèse reste toutefois controversée, et la recherche sur des dérivés de Célécoxib apparentés à l'OSU-03012 (inactif sur COX-2, inhibiteur de PDK-1 et efficace en inhibition de prolifération cellulaire) continue. Cette cible est par ailleurs étudiée au laboratoire (Gluszok S., 2007).

Le Célécoxib pourrait également présenter un effet très précoce sur l'ATPase transmembranaire qui maintient le gradient de calcium entre cytosol et réticulum endoplasmique (Pyrko P. et al., 2007).

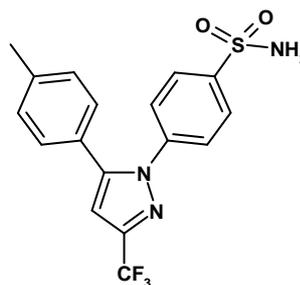
En conclusion, même si le mécanisme d'action exact du Célécoxib et de ses analogues structuraux reste à éclaircir, leur intérêt comme agent anticancéreux se démontre de plus en plus :

a) En traitement préventif

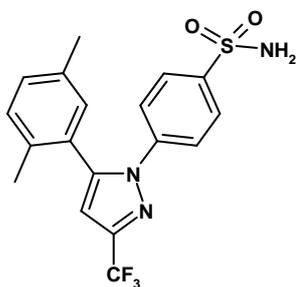
Il a été montré que l'aspirine ainsi que des inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase pouvaient présenter des propriétés intéressantes sur l'apparition de la pathologie, au niveau du cancer du côlon notamment. Plusieurs études portant en particulier sur les polyposes adénomateuses familiales (PAF, une des principales causes de cancer du côlon) ont montré que l'utilisation de Sulindac (Giardiello F. M. et al., 1993 ; North G. L. 2001) ou encore de Célécoxib (Steinbach G. et al., 2000) avaient un effet retardant sur l'apparition de ce type de pathologie. Le Célécoxib est aujourd'hui fréquemment utilisé en prévention spécifique dans les cas de risque de développement de PAF. Cependant, l'utilisation de tels composés de façon généralisée et régulière est rendue difficile par les nombreux effets secondaires que nous avons évoqués précédemment.



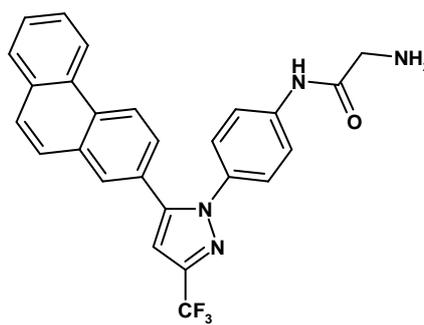
Rofécoxib



Célécoxib



2,5-diméthyl-célécoxib



OSU-03012

Fig. 18 : Rofécoxib, célécoxib et quelques uns de ses dérivés

b) Les inhibiteurs de cyclooxygénase en association

Dès 1994, une expérience relativement large a été menée sur des patients présentant différents cancers métastasés, étude consistant, entre autres, à évaluer l'influence de l'administration d'indométhacine sur la maladie (Lundholm K. et al., 1994). Il en résulte que l'indométhacine a non seulement une influence positive sur le contrôle de la douleur, mais également sur la durée de vie du patient.

Toutefois, bien que très prometteurs, il est évident que des inhibiteurs enzymatiques utilisés en monothérapie n'auront pas une incidence suffisante sur la prolifération cellulaire pour être administrés à des patients présentant des tumeurs avancées et les essais cliniques sont maintenant orientés vers leur utilisation combinée avec d'autres chimiothérapies.

(i) Essais précliniques

L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs conjointement avec des chimiothérapies conventionnelles a donné de bons résultats, mettant en avant une synergie d'action avec les différents composés évalués, par exemple sur des modèles du cancer du poumon (Teicher B. A. et al., 1994). De même, en association avec une radiothérapie poussée, toujours sur le modèle de Lewis du cancer du poumon, l'équipe de B. A. Teicher a pu constater une synergie d'action. Ceci a déclenché d'autres recherches, notamment *in vivo* qui ont conduit aux mêmes conclusions (Pyo H. et al., 2001).

L'utilisation d'inhibiteurs COX-2 dans le cadre d'une castration chimique est également envisagée (Cai Y. et al., 2008), principalement car cette castration chimique entraîne une surexpression de COX-2 conduisant à une prolifération accélérée.

(ii) Essais cliniques

Les résultats encourageant des essais précliniques ont lancé une série d'études cliniques au début des années 2000, dont les résultats sont pour la plupart encore en cours d'analyse ou simplement confidentiels, bien que plusieurs revues (en particulier dans le cas du cancer du sein) en présentent un nombre important (Méric J.-B et al., 2006 ; Gasparini G. et al., 2003).

Dans le cancer de la prostate, des résultats intéressants en terme de baisse du taux de PSA circulant ont été obtenus avec un traitement au Célecoxib des patients ayant suivi une ablation de la prostate ou une radiothérapie complète (Pruthi R. S. et al., 2004).

D - CONCEPTION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE CYCLOOXYGENASE

Pour essayer d'optimiser l'activité des inhibiteurs de cyclooxygénase au niveau de leur cible et donc ainsi d'en diminuer la toxicité systémique, nous avons choisi de retenir les pharmacophores les plus représentatifs des AINS et des coxibs.

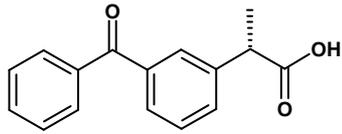
1. Profènes

Dans un premier temps, nous avons voulu utiliser des composés dont le profil d'inhibition est déjà bien connu afin de valider les concepts que nous allons amener dans la suite. Leurs CI_{50} d'inhibition sur COX-1 et COX-2 sont, dans le sang total humain de l'ordre du micromolaire. Dans l'optique de pharmaco-modulations, la classe des profènes présente un intérêt important : une fonction acide carboxylique qui permettra de moduler chimiquement par le biais d'une fonction ester, facilement métabolisable par des estérases sanguines et conduisant à une libération du profène initial.

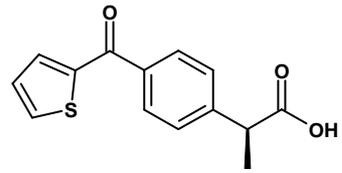
Il existe une grande quantité de profènes disponibles. Cependant, certains présentent des caractéristiques particulières qui en font de bons candidats pour des modifications chimiques ultérieures. C'est notamment le cas du kétoprofène, du suprofène et du carprofène (Fig. 19), composés ayant retenu notre attention pour plusieurs raisons, en particulier :

- CI_{50} intéressantes (même si le carprofène a une activité moindre que les 2 autres profènes, il présente un début de sélectivité COX-2)
- différences de rigidité (cétone cyclique ou non)
- isomérisation de position de la fonction acide carboxylique.

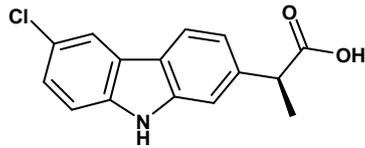
Un point commun notable est la présence d'un centre d'asymétrie sur le carbone portant cette fonction acide. Commercialement, pour avoir une autorisation de mise sur le marché, il est nécessaire d'obtenir un seul des isomères. *In vitro*, sur des enzymes isolées, l'isomère S présente une activité supérieure au R, mais *in vivo* le profène optiquement pur sera rapidement racémisé. Pour cette raison, nous utiliserons un mélange racémique dans nos synthèses et dans nos évaluations biologiques.



Kétoprofène
 CI_{50} COX-1 = 0,35 μ M
 CI_{50} COX-2 = 0,76 μ M



Suprofène
 CI_{50} COX-1 = 0,61 μ M
 CI_{50} COX-2 = 0,72 μ M



Carprofène
 CI_{50} COX-1 = 59,5 μ M
 CI_{50} COX-2 = 37,7 μ M

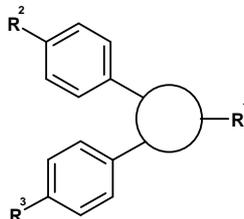
Les valeurs d'inhibition sont obtenues à partir d'expériences réalisées sur sang total humain.

Fig. 19 : Profènes utilisés pour les modulations

2. Diarylpyrazoles

a) *Conception*

Comme nous avons vu précédemment, la classe des inhibiteurs sélectifs COX-2 type Coxib est basée sur le schéma suivant :



La modulation des groupements R^1 , R^2 et R^3 permet de toucher à la biodisponibilité, au devenir métabolique, à l'affinité et à la spécificité des molécules, le schéma global des coxibs reste cependant le même.

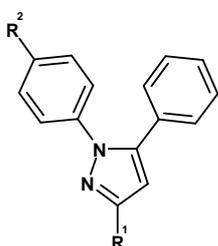
Il est généralement admis que trois fonctions doivent être présentes dans la molécule pour lui conférer une activité sélective COX-2 :

- l'hétérocycle central, responsable de l'orientation de la molécule dans son site de liaison, il peut être de nature diverse : pyrrole, thiazole, imidazole... Il semble que les cycles pyrazole et cyclopentone donnent les meilleurs résultats ;
- la substitution en para d'un des cycles benzéniques par un sulfonamide augmente la sélectivité pour COX-2 (Fig. 20). Le remplacement par un hydrogène conduit à une perte de la spécificité, mais l'utilisation d'un sulfonyleméthyl ne semble pas diminuer l'affinité tout en augmentant la biodisponibilité (Li J. J. et al., 1995) ;
- l'encombrement important de la molécule, apporté par l'ajout d'un troisième cycle du type benzyle, permet de profiter des différences de structure entre les isoformes de la cyclooxygénase et ainsi d'augmenter la sélectivité des produits envers COX-2.

Ces estimations empiriques ont plus récemment été justifiées par des études de docking faites avec le Célécoxib dans le site actif de COX-2 (Michaux C. et al., 2006) ainsi que par des études cristallographiques réalisées sur ce même inhibiteur co-cristallisé avec COX-2 (Ermondi G. et al., 2004). Il en ressort que (Fig. 21) :

- l'oxygène du groupe sulfonamide ($-\text{SO}_2\text{-NH}_2$) interagit avec la fonction amide de ^{518}Phe , dont le positionnement dans l'espace est spécifique à COX-2,
- le second aromatique établit des interactions de stacking avec les résidus aromatiques de la protéine présents dans le site (^{518}Phe également, entre autres).
- le groupement $-\text{CF}_3$ va se loger dans la cavité en entrée de site, en direction de ^{120}Arg même s'il n'existe pas ici d'interactions.

En parallèle de ces études bibliographiques, des recherches conduites au laboratoire sur les composés mixtes inhibiteurs COX-2 / 5-LOX (Pommery N. et al., 2004) ont mis en avant un dérivé de Celecoxib comme structure de base inhibitrice COX-2. En mettant de côté la structure particulière pharmacophore 5-LOX, on peut donc proposer les structures suivantes :



R^1 : $-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$; $-(\text{CH}_2)_{n-1}\text{-COOH}$; et leurs dérivés fonctionnalisés

R^2 : H ; $-\text{SO}_2\text{CH}_3$; $-\text{SO}_2\text{NH}_2$

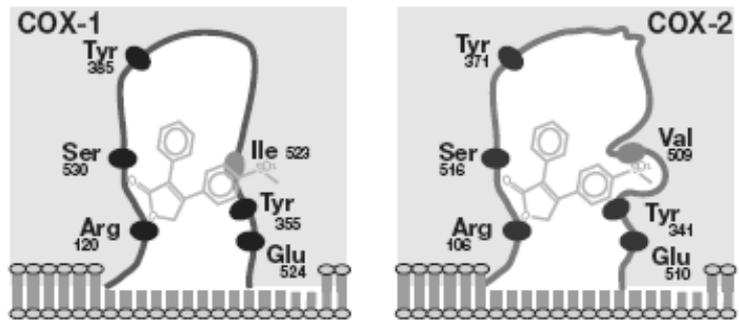
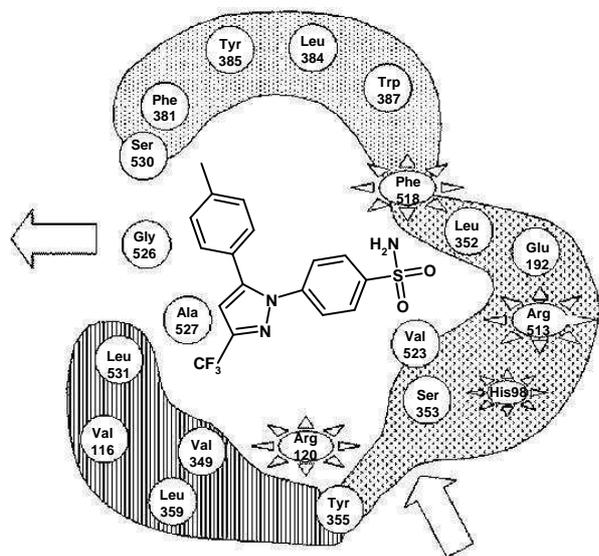


Fig. 20 : Importance du groupement sulfonamide ou sulfonyleméthyl dans la sélectivité COX-2 (ici l'exemple du Rofécoxib)
(adapté de Jouzeau J.-Y., 2004)



Entrée du tunnel COX

Fig. 21 : Docking du Célécoxib obtenu par diffraction de rayons X
(adapté de Michaux C. et al., 2006)

Il est ici important de souligner le choix de fonctions en R¹ : nous allons principalement utiliser cette position pour poursuivre notre étude. Nous avons donc besoin de formes stables, fonctionnalisables, et permettant après métabolisation de libérer le produit de départ. Bien entendu, les différents groupements utilisés vont ainsi permettre d'étudier leur influence sur nos cibles biologiques. De plus, modifier l'espacement entre l'hétérocycle et la fonction alcool / acide carboxylique semble intéressant, dans la mesure où il existe une arginine à proximité dans le site de liaison : amener un groupement capable d'établir des liaisons hydrogènes pourrait augmenter l'affinité de nos produits.

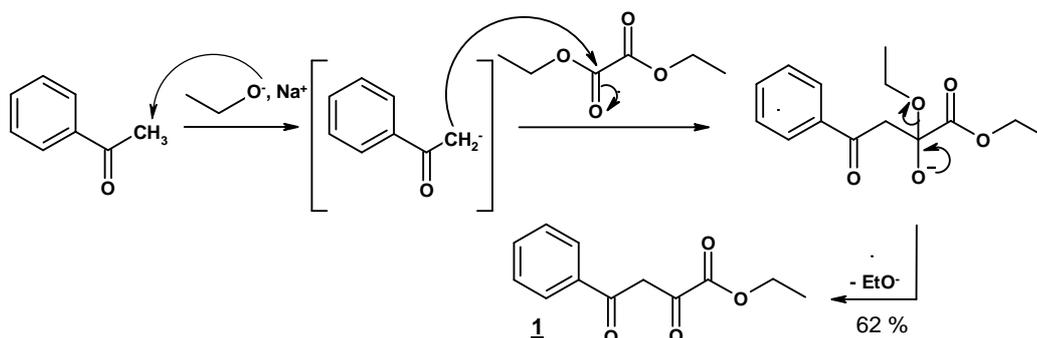
Concernant R², il nous a paru intéressant de vérifier les allégations concernant la présence d'un groupe sulfonamide à cette position, comparativement à un hydrogène ou à un sulfonyleméthyl.

b) Stratégie de synthèse

La méthode la plus utilisée pour obtenir un cycle pyrazole est la condensation d'une β-dicéto et d'une hydrazine. Dans notre cas, cette voie de synthèse est utilisable et intéressante, la modification des substituants en 1 et 5 du cycle pyrazole étant aisée. Le résumé de la voie de synthèse choisie pour obtenir les composés est présenté Fig. 22.

(a) Synthèse des β-dicétones

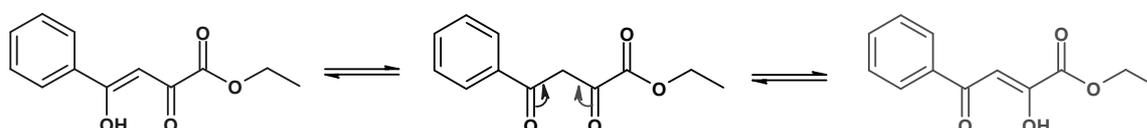
Synthèse du 2,4-dioxo-4-phénylbutyrate d'éthyle (**1**)



Pour arracher le proton en α de l'acétophénone il faut utiliser une base forte : ici l'éthanolate de sodium paraît judicieux, de par sa forte basicité mais aussi par le fait qu'il est régénéré en fin de réaction.

L'éthanolate ne peut réagir que sur l'acétophénone, l'oxalate de diéthyle ne possédant pas d'hydrogène basique. On peut cependant noter que le produit final présente deux atomes d'hydrogène très labiles car positionnés entre une cétone et un ester. Les réactifs étant introduits en rapport stœchiométrique, on évite la réaction d'une seconde molécule d'oxalate sur **1** et on obtient donc peu de produits secondaires. La dicéto se obtient assez facilement après neutralisation du milieu par HCl.

Il faut ici noter que le 2,4-dioxo-4-phénylbutyrate possède deux formes tautomères énoliques :



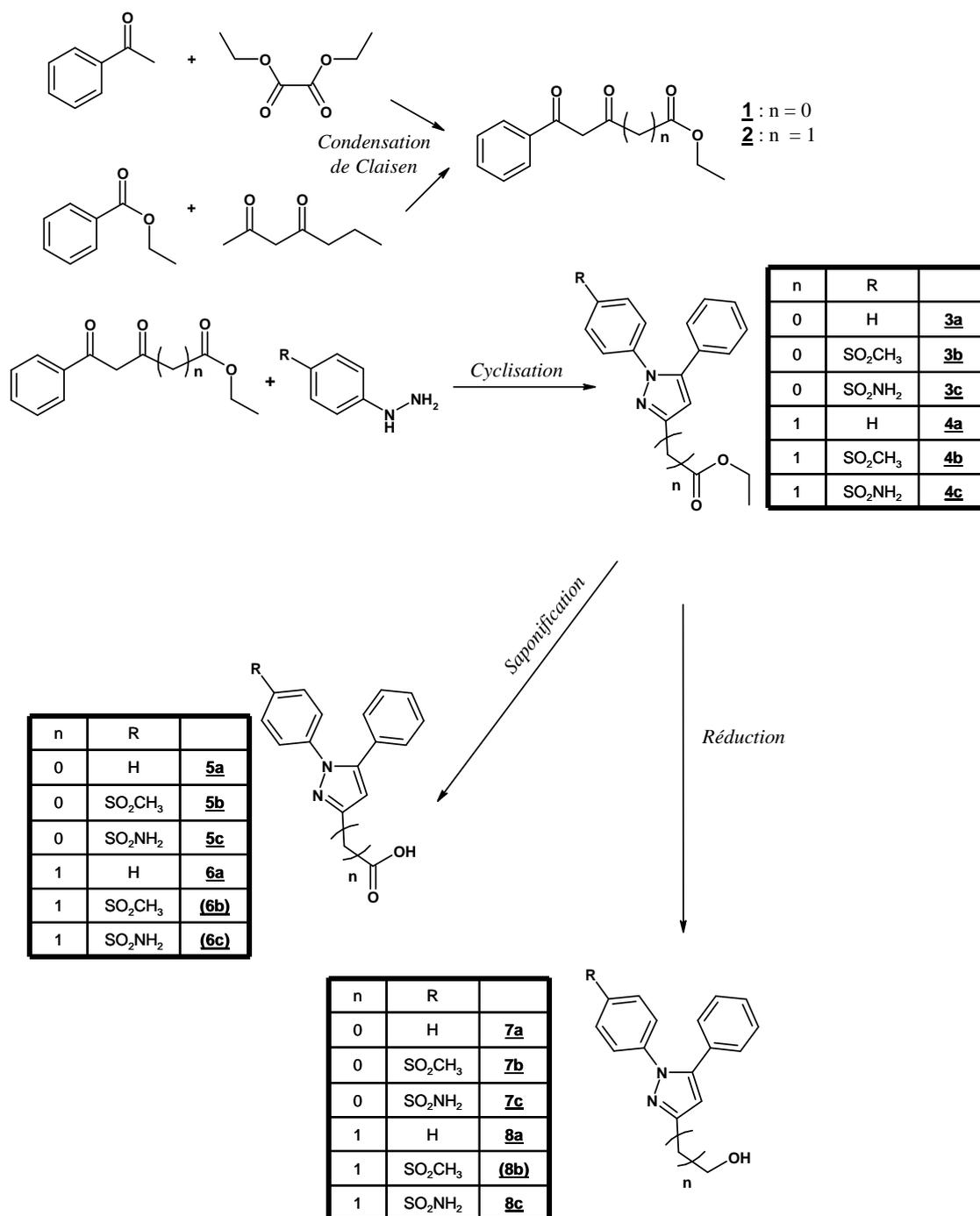
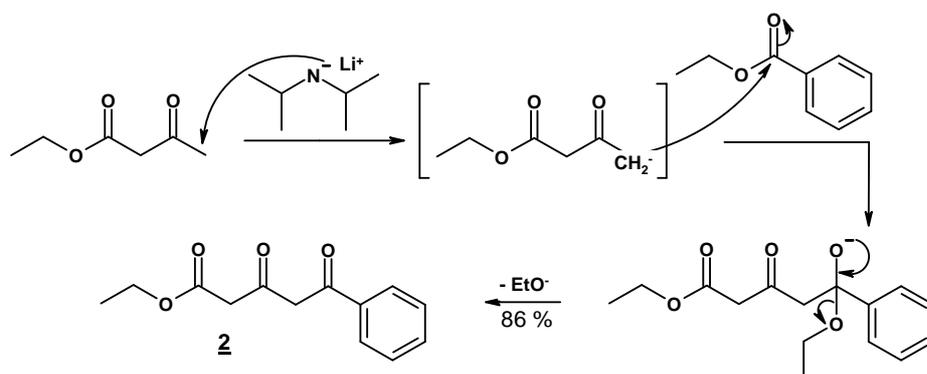


Fig. 22 : Stratégie de synthèse des composés de type diarylpyrazole
 les composés entre parenthèse n'ont pu être synthétisés

La présence des formes énoliques est favorisée par un milieu acide, et également par une liaison hydrogène entre l'oxygène de la cétone et le proton de l'énol formant un cycle à 6 atomes.

La réaction est assez propre pour que le produit puisse être utilisé sans purification dans la suite des réactions.

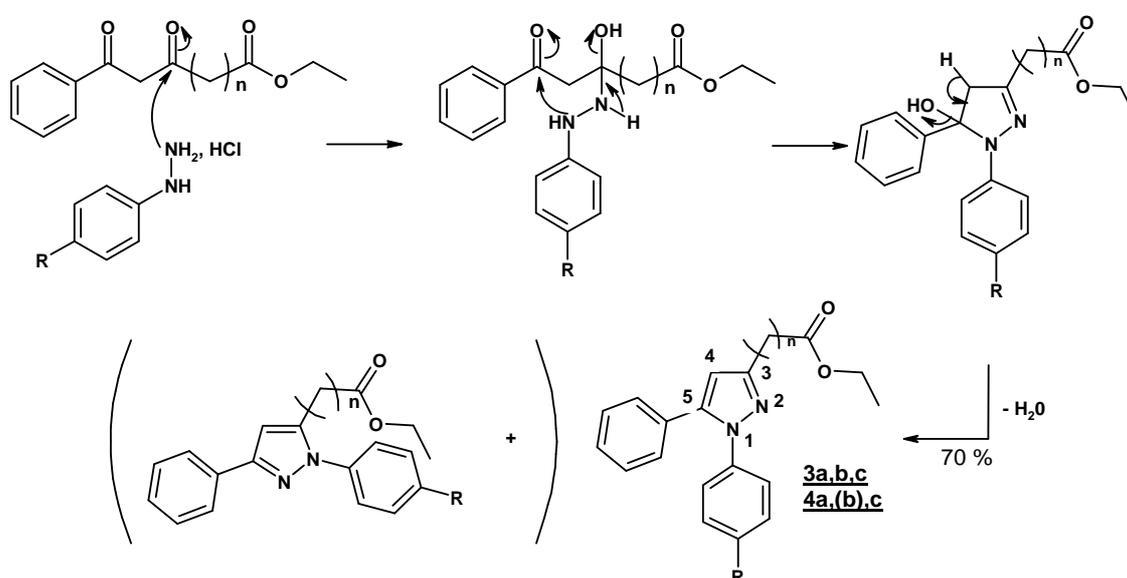
Synthèse du 3,5-dioxo-5-phénylpentanoate d'éthyle (2)



Nous utilisons à nouveau la mobilité d'un hydrogène en α d'une cétone. Le carbanion résultant de l'arrachement du proton par le diisopropylamidure de lithium va pouvoir attaquer le centre électrophile qu'est le carbonyle de l'ester du benzoate d'éthyle, qui va, après réarrangement, générer l'éthanolate de lithium.

Mais l'acétoacétate d'éthyle présente d'autres hydrogènes labiles : ceux situés directement entre les fonctions ester et cétone, qui en cas de réaction conduiraient à des produits secondaires. C'est pour cette raison que l'on utilise une base très encombrée, qui réagira plus facilement avec les hydrogènes en bout de chaîne. Malgré ces précautions, la réaction fournit de nombreux produits secondaires et après neutralisation du milieu réactionnel, il est nécessaire d'effectuer une purification par chromatographie sur gel de silice.

(b) Cyclisation en pyrazole à partir d'une hydrazine et d'une dicétone (3, 4)
(Singh S.K. et al., 2005)



Cette cyclisation se fait dans l'éthanol à reflux, sans ajout d'autres réactifs. Les hydrazines sont sous forme de chlorhydrates : ceci donne un milieu faiblement acide (1 éq de HCl). Ces ions H^+ contribuent à la réaction car ils facilitent la déshydratation lors de la cyclisation, par protonation des hydroxyles.

La cyclisation est irréversible et se fait spontanément, en quelques heures à reflux dans l'éthanol. Il se forme cependant un produit secondaire, qui résulte de la réaction « symétrique » : l'azote le moins encombré de l'hydrazine peut réagir sur la cétone benzylique, ce qui engendrera le pyrazole substitué en 1,3.

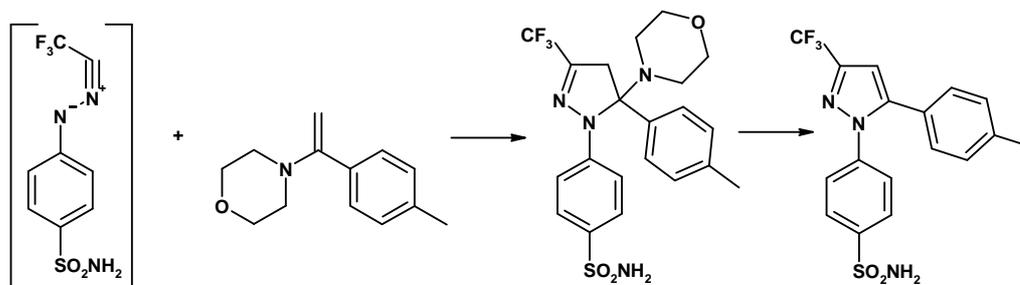
Ces composés étant des isomères de position, ils possèdent des propriétés physiques assez proches et leurs rapports frontaux sont très voisins. Leur séparation est alors difficile : seule une chromatographie sur gel de silice dans un éluant peu polaire suivie d'une recristallisation permet de s'assurer d'avoir un produit pur pour avancer dans le schéma de synthèse. Dans certains cas, il faut attendre une étape ultérieure pour pouvoir séparer les deux isomères.

Une méthode de discrimination permettant de s'assurer de l'obtention du bon isomère après la purification est la réalisation d'un spectre RMN « azote-proton » permettant de voir les couplages entre les atomes d'azote et les atomes d'hydrogène. En effet, l'azote non substitué du cycle pyrazolique voit deux environnements électroniques facilement distinguables en RMN selon que l'on a substitué en 1,3 ou en 1,5.

Il faut noter que les quantités relatives des isomères obtenus sont principalement fonction du substituant de l'aryle en position 1 du pyrazole (de 20 % à 50 % environ de l'isomère 1,3), et la différence de vitesse d'éluion, de la valeur de « n ». On a pu remarquer que si $n = 1$, les composés sont excessivement difficiles à séparer (plusieurs chromatographies suivies de recristallisations fractionnées sont nécessaires mais pas forcément suffisantes, et l'on obtient des mélanges qui seront purifiés au fur et à mesure des étapes réactionnelles – dans le cas où l'obtention d'un intermédiaire pur est nécessaire, une fraction est isolée et triturée pour éviter un trop grande perte de quantité).

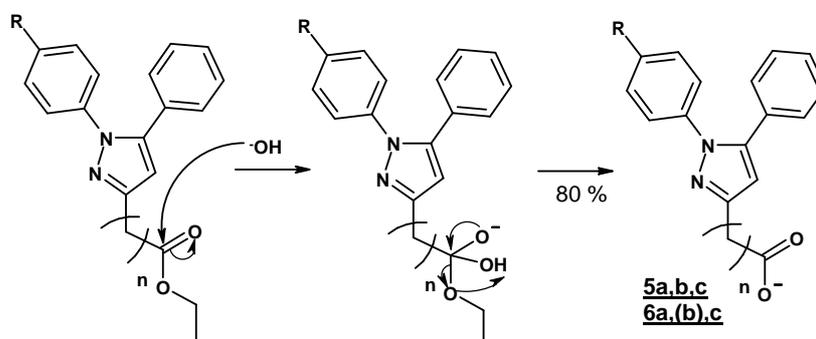
Des essais de modification des conditions réactionnelles ont été effectués pour tenter de pallier le problème d'obtention des deux régioisomères par changement des conditions de pH : ajout d'acides chlorhydrique ou paratoluènesulfonique ou d'une base, la triéthylamine (Humphries P.S., Finefield J.M., 2006). Ces essais n'ont pas permis d'avoir une cyclisation régiosélective, ni même d'améliorer le rapport d'obtention des deux composés. D'autres essais ont été réalisés par changement de l'ordre et de la vitesse d'introduction des réactifs, de la température, etc... sans résultats.

Des travaux sont actuellement en cours pour atteindre cet objectif, notamment en se basant sur une nouvelle voie de synthèse du Célécoxib mettant en jeu une addition entre une nitrilimine et une énamine (Oh L. M., 2006), les deux réactifs étant facilement accessibles :



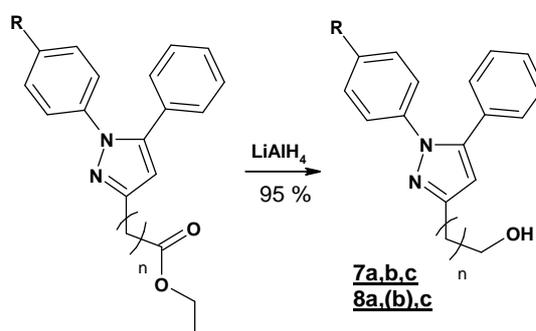
La synthèse micro-onde serait une autre méthode de réaction intéressante à exploiter même si relativement longue à optimiser, en réduisant le temps de réaction à quelques minutes au lieu de plusieurs heures.

(c) Saponification des esters éthyliques de diarylpyrazole (5, 6)



Cette saponification a lieu avec de la soude en milieu alcoolique, la seule fonction réactive dans ces conditions étant l'ester. Les rendements sont très bons, d'autant plus que la purification se fait simplement : après évaporation du solvant, le résidu est repris dans l'eau. L'acide carboxylique passe sous forme carboxylate, et un lavage par l'acétate d'éthyle permet d'éliminer tout excédent d'ester. L'acidification puis l'extraction par l'acétate d'éthyle permet d'obtenir l'acide carboxylique pur, qui cristallise après évaporation.

(d) Réduction des esters en alcools (7, 8)



La réduction d'un ester en alcool se fait classiquement par un hydrure (ici l'hydrure de lithium et d'aluminium) dans un solvant anhydre tel que le THF fraîchement distillé. L'ester étant ici encore le groupement le plus réactif, l'introduction d'un nombre d'équivalents limité en hydrure permet de limiter la formation de produits secondaires. Après neutralisation du milieu réactionnel, il est néanmoins nécessaire de purifier le mélange obtenu par chromatographie sur gel de silice.

Dans le cas où $n = 1$, les rendements sont très faibles, principalement à cause d'une purification délicate.

Ces différentes étapes de synthèse permettent d'obtenir les composés initiaux qui seront testés en inhibition enzymatique de COX et en tant qu'inhibiteurs de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques dans la suite de notre travail, comme référence par rapport à nos composés modifiés.

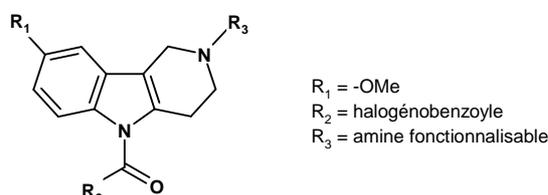
3. γ -Carbolines

a) Conception

Comme il est possible que les effets secondaires de la classe des coxibs sur le système cardiovasculaire soient un effet de classe, il semble intéressant de concevoir des inhibiteurs sélectifs COX-2 différents et novateurs. En conséquence, sur la base de relations structure-activité des diaryles, certains auteurs se sont penchés sur la possibilité de modifier des inhibiteurs non sélectifs afin de les rendre sélectifs, en particulier en modulant l'indométhacine (Fig. 23) (Dannhardt G., Laufer S., 2000).

Le principe général de ces modifications est de jouer sur l'encombrement de la molécule pour tirer profit de la poche latérale présente dans l'isoforme COX-2. Différentes modulations ont donc été réalisées sur le squelette de l'indométhacine, avec plus ou moins de réussite. L'introduction d'un trichlorobenzoyle en lieu et place du parachlorobenzoyle comme sur le composé L-748,780 a énormément réduit son affinité pour COX-1. L'ajout sur l'acide carboxylique d'une chaîne butyrique, conjointement avec le remplacement du parachlorobenzoyle par le parabromobenzoyle, a conduit à d'excellents résultats avec le composé L-761,066. Par contre, il a été observé que le groupement 2-méthyle sur l'indole était indispensable à l'activité inhibitrice de la molécule.

A partir de ces études, nous avons pu dégager quelques points structuraux essentiels pour la conception d'un inhibiteur sélectif COX-2. En se basant sur le motif diaryle, celui de l'indométhacine et celui du carprofène, il paraît intéressant de conserver une structure polycyclique rigide, et, dans cette optique, le motif de la N-aroyle- γ -carboline, peut sans doute être utilisé et modifié pour conduire à une inhibition sélective :



Le groupement méthoxy permet de mimer celui de l'indométhacine. L'introduction d'un groupement benzoyle sur l'azote indolique permet de se rapprocher du motif diaryle, et l'amine va permettre la fonctionnalisation de ce composé pour y apporter les modifications utiles au sujet.

On peut remarquer que la structure de la γ -carboline est bien plus rigide que celle des diaryles classiques et de l'Indométhacine : la seule partie ayant une capacité de rotation dans le motif diaryle étant le groupement benzoyle.

b) Synthèse du noyau γ -carboline (9)

Dans la suite, les modulations se baseront sur le noyau 8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (ou γ -carboline) que nous modulerons sur les deux amines libres.

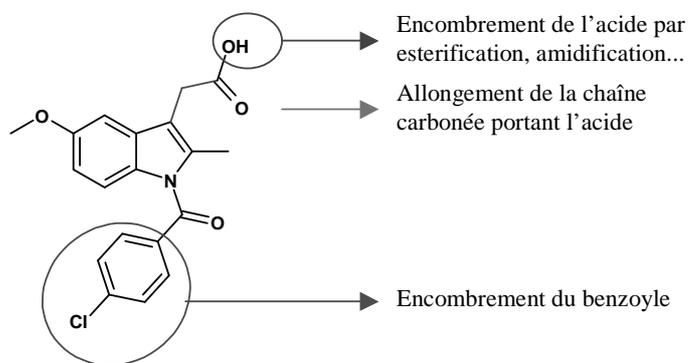
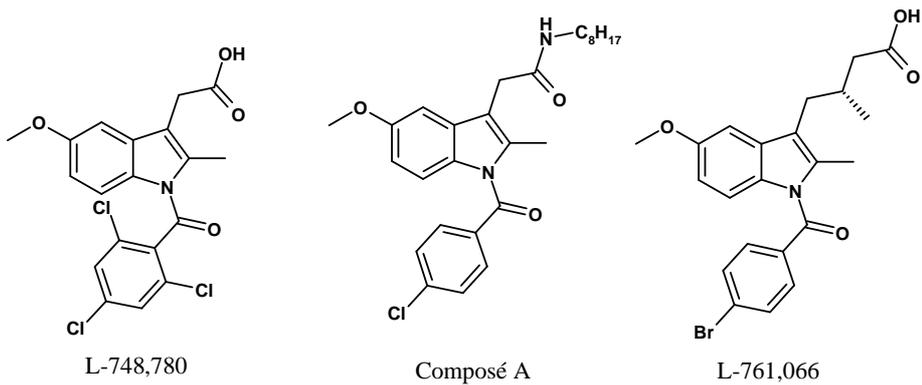
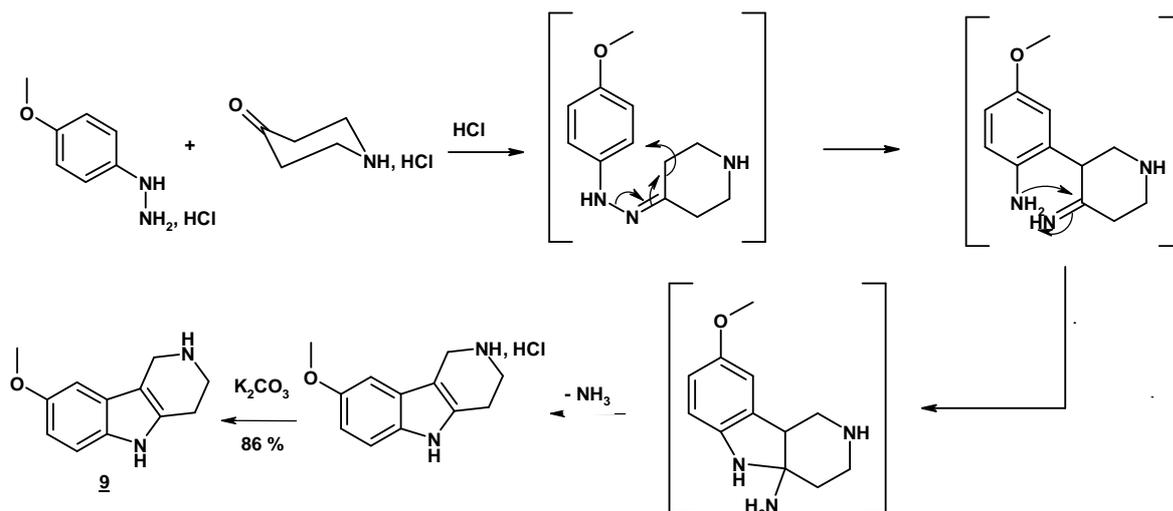


Fig. 23 : Modifications possibles de l'indométhacine en vue d'une sélectivité COX-2
 (adapté de Dannhardt G. et Kiefer W., 2001)



La γ -carboline **9** se synthétise par la réaction de Fisher en condition acide. Nous effectuons un traitement basique à la fin de la réaction pour obtenir la γ -carboline sous forme base. Ce type de réaction est bien documenté (Fischer E., Jourdan F., 1883 ; Brown D. W. et al., 1993) et a été réalisé au laboratoire. Cette réaction présente l'avantage de donner de très bons rendements (de l'ordre de 85 %) après une simple précipitation.

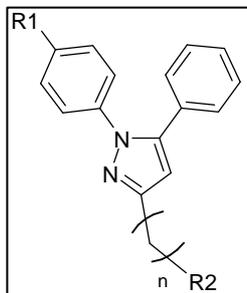
E - EVALUATION DES DERIVES DIARYLPYRAZOLES COMME INHIBITEURS DE CYCLOOXYGENASE

Après avoir synthétisé plusieurs séries de molécules, nous avons voulu évaluer leur potentiel d'inhibition de la cyclooxygénase sur sang total selon un protocole mis en place au laboratoire (Pommery J. et al., 2005 ; voir annexes). Les résultats sont présentés dans le tableau 1 sous la forme de pourcentages d'inhibition mesurés à une concentration de 10^{-4} M. La référence choisie est le Célécoxib, présentant le même type de squelette et conduisant à de très bons résultats sur notre modèle.

La première constatation est l'influence évidente du groupement R1 sur la spécificité envers une isoforme. En effet, on constate que lorsque R1 est un hydrogène, l'inhibiteur n'a aucune affinité pour COX-2 même s'il peut inhiber COX-1. Le groupement sulfonylméthyl est relativement « neutre », alors que le sulfonamide permet une sélectivité COX-2, ce qui tend à confirmer les informations tirées de l'étude bibliographique.

Concernant les différents groupements présents en R2 pour n=0, on peut constater que l'alcool présente une activité mesurée supérieure à celle des acides correspondants. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, la liaison avec l'enzyme peut être défavorisée par la présence d'un groupement ionisable à cette position, et nous ne pouvons pas créer d'interactions avec l'arginine présente en entrée de site sur la COX. Mais il est possible également que ces résultats négatifs découlent de l'emprisonnement de ces composés particuliers dans certains compartiments sanguins tels que les protéines. Ceci entraîne une disponibilité limitée du principe actif, et donc une activité mesurée moindre. Nous ne pouvons donc pas mettre de côté ce type de composés dès maintenant, et leur modification dans la suite du travail permettra d'apporter des éclaircissements sur leur activité réelle.

Le seul composé ayant pu être testé sur notre modèle d'inhibition de la cyclooxygénase avec n=1 (**6a**) ne présente pas de différence significative avec son homologue n=0 (**5a**), en étant actif sur COX-1 mais pas sur COX-2. Il sera intéressant de pouvoir évaluer par la suite l'activité du dérivé n=1 possédant un sulfonamide (**5c**), afin de constater l'influence de l'éloignement de la fonction acide de l'hétérocycle sur le *docking* dans le site de COX-2.



Molécule	R1	R2	n	Inhibition de COX-1 ^a	Inhibition de COX-2 ^a	Spécificité COX-1/COX-2
Célécoxib	-	-	-	CI ₅₀ = 13 μM	CI ₅₀ = 0,8 μM	16,3
7a	H	-CH ₂ OH	0	69	0	0
5a	H	-COOH	0	44	0	0
6a	H	COOH	1	37	0	0
7b	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ OH	0	60	32	0,5
5b	-SO ₂ CH ₃	-COOH	0	56	15	0,3
7c	-SO ₂ NH ₂	-CH ₂ OH	0	61	90	1,5
5c	-SO ₂ NH ₂	-COOH	0	0	10	n/a

^aPourcentage d'inhibition à une concentration de 10⁻⁴M (ou CI₅₀ pour le

Tableau 1 : Inhibition de l'activité de la cyclooxygénase
par les dérivés de diarylpyrazoles

F - INHIBITION DE LA CYCLOOXYGENASE : **CONCLUSION**

La cyclooxygénase, existant sous deux isoformes exploitables pharmacologiquement, est la cible d'une grande quantité de médicaments anti-inflammatoires. La découverte relativement récente de l'implication de cette enzyme dans la pathologie cancéreuse, en particulier le cancer de la prostate, a relancé l'intérêt de la recherche d'inhibiteurs présentant moins d'effets secondaires. Nous avons par conséquent conçu, puis synthétisé des inhibiteurs novateurs basés sur le squelette diarylpyrazole et γ -carboline.

Les dérivés de diarylpyrazole ont présenté des profils d'inhibition intéressants sur notre modèle d'évaluation de l'activité enzymatique des cyclooxygénase, tout en possédant des groupements chimiques assez facilement fonctionnalisables pour envisager de conduire une chimie plus poussée sur cette base.

De par la présence dans tout l'organisme de récepteurs COX-1, et l'omniprésence potentielle de COX-2, il est permis de se demander quelle fraction d'un principe actif sera réellement active sur le site tumoral. Pour remédier à ce problème récurrent des inhibiteurs enzymatiques, la méthode de vectorisation paraît adaptée. Dans le cancer de la prostate en particulier, l'existence d'une protéase particulière et active uniquement dans l'organe rend envisageable le ciblage par un vecteur de nature peptidique. Nous nous sommes donc intéressés à cette protéase afin d'adjoindre, à un inhibiteur de cyclooxygénase, un peptide permettant de cibler la tumeur.

Chapitre III :

***La conception d'une prodrug vectorisable
par activation par l'antigène spécifique prostatique***

Dans les années 70, la recherche des antigènes spécifiques dans le sperme a conduit à la découverte de trois antigènes « spécifiques à la prostate » : la γ -protéine séminale (Hara M. et al., 1971), la protéine E (Li T. S., Beling C. G., 1973) et la protéine p30 (Sensabaugh G. F., 1978) ; elles ont plus tard été identifiées comme identiques et appelées « Prostate Specific Antigen » (PSA) (Wang M. C. et al., 1979).

Lorsque nous avons évoqué le suivi de l'évolution du cancer de la prostate, la mesure du taux de PSA circulant comme marqueur a été reportée comme un outil pratique et accessible. Bien que principalement connue du grand public pour cette raison, cette protéase à sérine possède un rôle physiologique important, et malgré certains dérèglements de son activité dans plusieurs pathologies, son activité enzymatique la rend attractive dans la conception de *prodrugs* vectorisées par un peptide potentiellement reconnu par la PSA.

A - STRUCTURE, EXPRESSION ET FONCTION DE LA PSA

1. Les protéases à sérine

Les protéases sont des enzymes capables de cliver les liaisons peptidiques, ce qui les rend indispensables à la majorité des organismes vivants. La plupart sont synthétisées d'abord sous la forme de zymogènes, précurseurs inactifs car dotés d'une séquence peptidique additionnelle qu'il suffira alors de cliver pour activer l'enzyme (Khan A. R, James M. N., 1998). Il existe principalement deux types de protéases à sérine : les « trypsin-like » et les « subtilisin-like » (Creighton T. E., 1992). Le nom de cette famille d'enzymes provient de l'acide aminé responsable de l'action métabolique de la protéine : ici, sérine indique que l'hydrolyse de la liaison amide va se faire grâce à une triade catalytique : sérine (nucléophile), aspartate (électrophile), et histidine (base) au cœur du site actif (Neurath H., 1984).

Dans la famille des protéases à sérine, il existe 5 sous-familles qui sont différenciées par la position des introns sur les gènes dont elles sont originaires. Par exemple, la sous-famille des kallikréines présente un intron après le codon de l'histidine ainsi qu'après celui de l'acide aspartique, et un troisième intron avant le codon de la sérine.

2. Les kallikréines

Les gènes codant pour la famille des kallikréines sont situés sur le chromosome 19, plus particulièrement dans la région 19q13.4 (Yousef G. M., Diamandis E. P., 2001).

Initialement, les kallikréines ont été présentées comme des protéases à sérine capable de digérer certaines protéines de masse molaire importante en vue de produire des peptides bioactifs appelés kinines. Elles sont aujourd'hui classées en deux catégories : les kallikréines plasmatiques et les tissulaires.

La seule kallikréine plasmatique connue ou KLKB1 génère la bradykinine, et est produite par le foie. Jusque récemment, trois enzymes de la famille des kallikréines tissulaires étaient connues : hK1, hK2 (kallikréine glandulaire) et hK3 (PSA). Cependant, les études portant sur le séquençage de l'ADN semblent indiquer l'existence de 15 kallikréines pour cette famille,

présentant de 40 à 80% d'homologie entre elles (Yousef G. M., Diamandis E. P., 2001). Les seules possédant une activité enzymatique importante sont hK1 (« human kallikrein 1 ») située dans le pancréas et les reins, et la PSA, exprimée de façon très majoritaire dans la prostate.

Au niveau structural, ce sont en fait des glycoprotéines très stables composées d'une unique chaîne peptidique, de taille relativement faible (20-40 kDa environ) (Clements J. A., 1989 ; Borgoño C. A. et al., 2004). Elles présentent bien sûr la triade catalytique classique des protéases à sérine.

3. Expression de la PSA et activation

a) Le gène de PSA et son expression

Comme pour les autres kallikréines tissulaires, le gène codant pour PSA se trouve dans la région chromosomique 19q13.4. Sa transcription est régulée positivement par un récepteur aux androgènes, qui est un récepteur à hormone stéroïdienne se liant sous forme d'homodimère à certaines séquences spécifiques de l'ADN du gène de la PSA (Riegman P. H. et al., 1991 ; Schuur E. R. et al., 1996 ; Cleutjens K. B. et al., 1997).

La PSA est exprimée, contrairement à ce qu'indique son nom, dans d'autres tissus que la prostate – bien qu'à des concentrations beaucoup plus faibles. On la retrouve notamment dans le sein (en particulier en cas de cancer), la thyroïde, le côlon, les reins, le foie, les poumons, les glandes salivaires... (Diamandis E. P., Yu H., 1997 ; Zarghami N. et al., 1997 ; Magklara A. et al., 2000a ; Darling M. R. et al., 2006 ; Narita D. et al., 2006). Il faut noter que la source principale de PSA chez la femme (retrouvée notamment donc dans le sein) est probablement la glande de Skene également appelée « prostate féminine » (Zaviacic M., Ablin R. J., 2000).

Chez l'homme, la production de PSA à destination du liquide séminal se situe dans les cellules épithéliales recouvrant les tissus glandulaires (Fig. 24), situés en majorité dans la zone périphérique, et va présenter au final une concentration de 0.5 à 2.0 mg/mL en PSA (Lövgren J. et al., 1999). Son action sur ses substrats naturels [principalement la semenogeline I et II (SgI et SgII) ainsi que la fibronectine] conduit à la décompaction du sperme, afin de faciliter le déplacement des spermatozoïdes (Lilja H. et al., 1987). Il est possible que cette enzyme présente d'autres fonctions, telles que la régulation de certains facteurs de croissance (Peehl D. M. et al., 1995).

b) Activation de la PSA

Avant de pouvoir exercer son action, il est important de noter que la PSA n'est pas produite mature par les cellules prostatiques, mais sous la forme de prépro-PSA nécessitant plusieurs clivages pour être active. En effet, les cellules épithéliales recouvrant les glandes prostatiques vont synthétiser la PSA adjointe d'une séquence de 17 acides aminés supplémentaires, rapidement clivés pour donner de la pro-PSA (Lundwall A. et Lilja H., 1987), qui est dotée de 7 acides aminés supplémentaires par rapport à la PSA active (Fig. 24 et 25).

La libération de la PSA active se fait après clivage entre l'arginine en position 7 et l'isoleucine en position 8 par une trypsine sérique en cas d'échappement dans la circulation

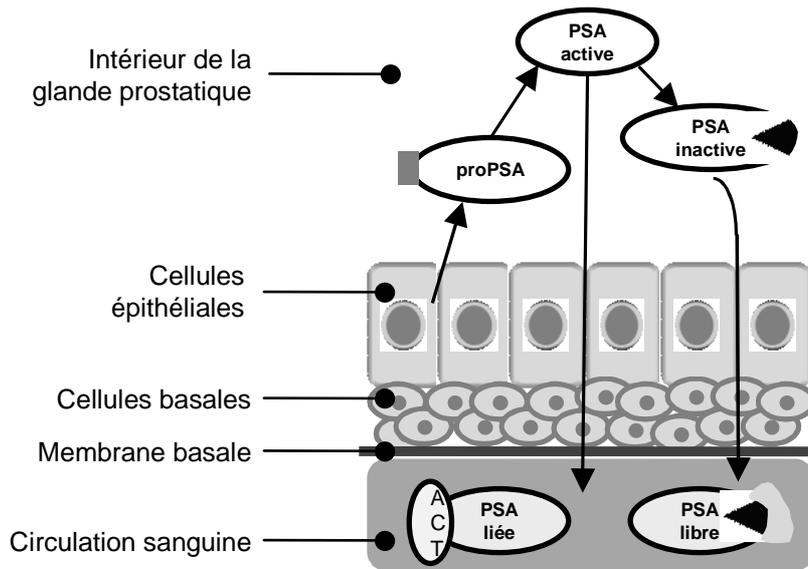


Fig. 24 : Synthèse et migration de la PSA
(adapté de Balk S. P. et al., 2003)

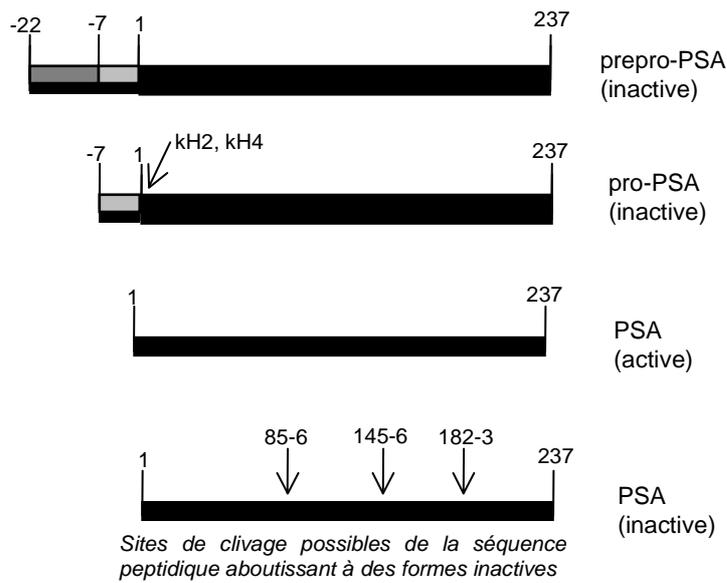


Fig. 25 : Evolution de la structure primaire de la PSA
(adapté de Balk S. P. et al., 2003)

ou plus communément par hK2 dans la prostate, qui possède une activité enzymatique proche et est exprimée à proximité (Takayama T. K. et al., 1997 ; Balk S. P. et al., 2003) ou encore par hK4 (Takayama T. K. et al., 2001). Il faut noter que seulement 30% de la PSA se retrouvant dans le sperme est active enzymatiquement, le reste étant inactivé soit par couplage avec un inhibiteur de la protéine C (Christensson A. et Lilja H., 1994), soit par clivage au cœur de la séquence, probablement dû à diverses protéases présentes dans les sécrétions (Zhang W. M. et al., 1995) (Fig. 24 et 25).

Toutefois, la totalité de la PSA produite ne se retrouve pas dans le sperme. En effet, il est fréquent qu'une partie de la PSA sécrétée puisse traverser la barrière cellulaire et se retrouver dans la circulation sanguine, PSA qui est normalement rapidement liée à des inhibiteurs de protéases (principalement l'antichymotrypsine α -1 ou ACT) est alors désactivée. De plus, il est possible que de la PSA déjà inactivée (par les inhibiteurs aussi bien que par des clivages internes) passe dans la circulation. Chez un homme sain, il existe très peu voire aucune PSA circulante dans sa forme active (Fig. 24), de même pour la pro-PSA.

4. Structure de la PSA et activité

a) Structure

L'enzyme mature est une glycoprotéine composée d'une chaîne de 237 acides aminés, dont la chaîne polysaccharide est liée à l'asparagine 45, et totalise un poids d'environ 30 kDa (26 kDa pour la chaîne peptidique et 4 kDa pour la chaîne carbohydate) (Schaller J. et al., 1987). Sa séquence a été décomposée à la fin des années 80 (Schulz P. et al., 1988 ; Klobeck H. G. et al., 1989), et la comparaison avec celle des autres kallikréines a permis de mieux comprendre les modes d'actions des enzymes de cette famille (Fig. 26).

La PSA pure n'a pas été cristallisée. Cependant, plusieurs modèles [*in silico* ou de cristallographie classique après liaison d'un substrat dans le site actif (Ménez R. et al., 2008)] sont disponibles, de même que les données concernant la PSA de cheval (Carvalho A. L. et al., 2002), qui partage de grandes similitudes avec la PSA humaine (60 % de la séquence environ). Dans un environnement physiologique, la PSA n'est pas dimérisée. Les conditions nécessaires à sa cristallisation tendent cependant à créer un dimère factice. Un exemple de structure modélisée est présenté sur la figure 27, où l'on voit la triade catalytique ainsi que le tryptophane 215 qui est important dans la structure du site de liaison, comme nous le verrons dans notre partie « conception ».

Cette structure semble confirmer les hypothèses de modulation d'activité de l'enzyme et les acides aminés essentiels à cette activité.

b) Activité

Son activité est proche d'une chymotrypsine et partage la triade catalytique His-Asp-Ser des protéases à sérine. Dans ce cas, il s'agit de l'histidine 57, l'aspartate 102 et la sérine 195 (Watt K. W. et al., 1986). Elle va donc pouvoir cliver les extrémités C terminales de certains résidus Tyrosine et Leucine, sans montrer d'activité type trypsique. Lors des premières évaluations de l'activité enzymatique de la PSA, une certaine activité trypsine avait pu être détectée, mais elle résultait de la contamination des échantillons « purifiés » par hGK-1 (Watt

	16	20	30	40	50	61	70
PSA	IVGG	WECEKHSQPW	QVLVASRGRA	.VCGGVLVHP	QWVLTAAACI	RKSVLLGR	HSLF.HPEDT
KLK2	IVGG	WECEKHSQPW	QVAVYSHGWA	.HCGGVLVHP	QWVLTAAACL	KNNSQVWLR	HNLF.EPEDT
KLK1	IVGG	WECEKHSQPW	QAALYHFSTF	.QCGGILVHR	QWVLTAAACI	SDNYQLWLR	HNLF.DDENT
HPK	IIGG	WECEKHSQPW	QVAVYSQGHF	.QCGGVLVHP	QWVLTAAACM	SDDYQLWLR	HNLS.KDEDT
KLK6	LVHG	GPCDKTSHPY	QAALYTSQHL	.LCGGVLIHP	LWVLTAAACK	KPNLQVFLGK	HNLS.QRESS
KLK4	IING	EDCSPHSQPW	QAALVMENEL	.FCGGVLVHP	QWVLSAARCF	QNSYTIIGLGL	HSLAQQEPFG
	80	90	95	100	110	120	
PSA	GQVFQVSHSF	PHPLYDMSLLKNRPLRPGDGS	SRLMLLRLS	EPAE.LTDAVK	VMDLPT..QE		
KLK2	GQRVPVSHSF	PHPLY.MSLLKHKSLRPFDEDS	SRLMLLRLS	EPAK.ITDVVK	VLGLPT..QE		
KLK1	AQFVHVSSEF	PHPGFNMSLLENHTRQADEDY	SRLMLLRLT	EPADTITDAVK	VVELPT..EE		
HPK	AQFHVSSEF	LDPPFDLSLLKKYLRYDDI	SRLMLLRLA	QPAR.ITDAVK	ILDLPT..QE		
KLK6	QEQSSVVRVAV	IHPDYDAASH.....	DQITMLLRLA	RPAK.LSELIQ	PLPLER..DC		
KLK4	SQMVEASLSV	RHPFYMRPLL.....	ANLMLLIKLD	ESVS.ESDTIR	SISIAS..QC		
	130	140	150	160	170	186A	
PSA	PALGTTTCYAS	GWGSIEPEEF	LTPKKLQCVL	LHVISNDVCA	QVHPQKVTFF	MLCAGRWTGGKS	
KLK2	PALGTTTCYAS	GWGSIEPEEF	LRRSLQCVS	LHLLSNDMCA	RAYSEKVTFF	MLCAGLWTGGKD	
KLK1	PEVGSTCLAS	GWGSIEPENF	SFPDDLQCVL	LKILPNDECK	KAHVQKVTDF	MLCVGHLEGGKD	
HPK	PKLGGSTCYTS	GWGLISTPTN	RSGTLCQVE	LRLQSNEMCA	RAYPEKMTFF	MLCATHRDDSGS	
KLK6	SANTTSCHIL	GWGKT..ADG	DFPDTIQCAV	IHLVSREECE	HAYPGQITQN	MLCAGDEKYGKD	
KLK4	PTAGNSCLVS	GWGLL..ANG	RMPITVLCVN	VSVVSEEVCS	KLYDPLVHFS	MFCAGGGQDQKD	
	190	200	210	223A	230	240	
PSA	TCSGDGGGPL	VCNG...VL	QGITSWGSEP	CALPERPSLYT	KVVHYRKKWK	DTIVANP	
KLK2	TCGGDGGGPL	VCNG...VL	QGITSWGPEP	CALPEKPAVYT	KVVHYRKKWK	DTIAANP	
KLK1	TCVGDGGGPL	MCDG...VL	QGVTSWGYVP	CGTFNKPQVAV	RVLSYVKWIE	DTIAENS	
HPK	ICLDGGGAL	ICDG...VF	QGVTSWGYSE	CADFNDNFVFT	KVMPHKKWK	ETIEKNS	
KLK6	SCQDGGGPL	VCGD...HL	RGLVSWGNIPI	CGSKEKPGVYT	NVCRYTNIWQ	KTIQAK.	
KLK4	SCNGDGGPL	ICNG...YL	QGLVSPGKAP	CGQVGPVGYT	NLCKPTEWIE	KTVQAS.	

 site de glycosylation
 boucle kallikréine
 conservé
 épitope 8G8F5
 triade catalytique
 site de liaison du Zn²⁺

Fig. 26 : Structures primaires de différentes kallikréines
(adapté de Ménez R. et al., 2008)

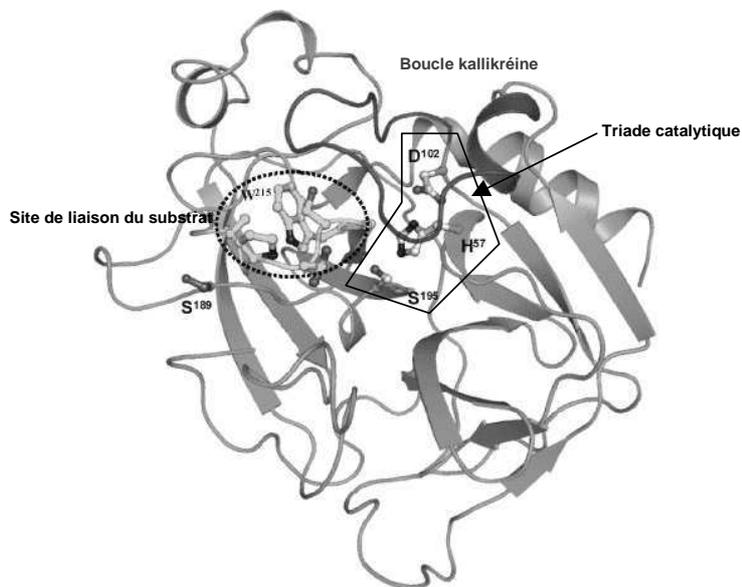


Fig. 27 : Structure modélisée de la PSA
(adapté de Hassan M. I. et al., 2007)

K. W. et al., 1986 ; Malm J. et al., 2000). Cette action enzymatique peut être régulée de plusieurs façons dans le système reproducteur : la première étape de contrôle de l'activité de PSA est son activation par clivage des acides aminés supplémentaires de la pro-PSA comme indiqué précédemment. De plus, il existe une inactivation par clivage à l'intérieur de la chaîne peptidique. Les glandes sécrétant la PSA ne disposent cependant pas d'inhibiteurs de protéase pouvant se lier à cette enzyme.

In vitro, il a été montré que des ions, en particulier Zn^{2+} , étaient capables d'inhiber l'activité enzymatique de la PSA (Malm J. et al., 2000), ce qui a été confirmé par des études cristallographiques (Ménez R. et al., 2008). Cette inhibition a été identifiée comme mettant en jeu en premier lieu la complexation entre l'ion et les substrats naturels de la PSA comme SgI (Jonsson M. et al., 2005), ce qui rend plausible l'hypothèse d'une régulation de PSA *in vivo* par un contrôle du taux de Zn^{2+} circulant par SgI et II (Fig. 28)

Encore aujourd'hui, les données sur la régulation de l'activité de la PSA semblent incomplètes et font l'objet de recherches approfondies, qui sont en partie motivées par les spéculations sur le rôle réel de cette enzyme dans le cancer de la prostate.

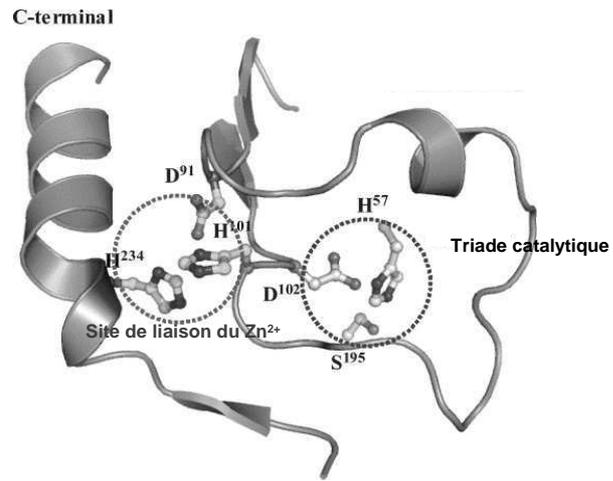


Fig. 28 : Structure de la PSA : site de liaison cationique
(adapté de Hassan M. I. et al., 2007)

B - LA PSA DANS LE CANCER DE LA PROSTATE

Lorsque nous avons évoqué le cancer de la prostate et son dépistage, la mesure de la quantité de PSA circulant est apparue comme un outil fréquemment utilisé. En effet, en cas d'anomalie au niveau de l'organe, l'expression et le devenir métabolique de cette enzyme subissent des perturbations caractéristiques.

1. Expression et métabolisation de la PSA dans le cancer de la prostate

a) Expression au stade hormono-dépendant

La PSA est exprimée de manière généralisée par toutes les cellules dans les tissus cancéreux prostatiques, même si la quantité produite par chaque cellule est inférieure à ce que peut produire une cellule prostatique normale (Magklara A. et al., 2000b). Ceci semble principalement dû à l'activation continue des récepteurs aux androgènes, même si d'autres facteurs d'activation ont été identifiés (Yeung F. et al., 2000). C'est une des raisons pour lesquelles la production de PSA n'est pas complètement arrêtée lors d'hormonothérapies. A l'inverse, une diminution du taux de PSA n'indique pas forcément une diminution du nombre de cellules cancéreuses prostatiques.

b) Expression au stade hormono-indépendant

Expérimentalement, on constate que la PSA est toujours exprimée en cas d'échappement hormonal du cancer de la prostate. Dans ce cas, les facteurs régulant l'expression du gène de la PSA sont encore mal connus, mais il semble que le récepteur aux androgènes commandant la transcription de ce gène demeure activé en permanence, potentiellement par mutation (Taplin M. E. et al., 2003). Cette activation semble résistante aux essais antagonistes du récepteur aux androgènes. Cependant, le lien entre production de PSA et prolifération cellulaire semble, dans le cas de cancer de la prostate hormono-indépendant, assez flou.

c) Devenir du PSA en cas de cancer de la prostate

Par rapport aux tissus normaux de la prostate, on constate une nette différence de répartition des différents « dérivés » de la PSA (prépro-PSA, PSA clivée, etc.) en cas d'existence de tissus tumoraux.

Tout d'abord, la PSA clivée dans sa séquence (et donc rendue inactive) semble disparaître à la fois du liquide séminal et de la circulation, probablement à cause de la diminution de l'activité des protéases dans ce liquide (Mikolajczyk S. D. et al., 2000a), alors que sa concentration augmente fortement en cas d'hyperplasie bénigne de la prostate (Linton H. J. et al., 2003).

Une nouvelle forme de PSA spécifique au cancer de la prostate, résultant du clivage entre la leucine 5 et la sérine 6 du pro-PSA, a été découverte assez récemment (Mikolajczyk S. D. et al., 2000b). Cette forme stable est inactive enzymatiquement et peut circuler sous forme de PSA libre car elle n'est pas reconnue par ACT. Ceci a conduit à la découverte d'autres formes clivées de pro-PSA probablement spécifiques aux tumeurs prostatiques (Peyromaure M. et al., 2005). L'origine de ce type de dérivés est encore incertaine, même si une diminution de

l'activité de hK2 dans les tissus prostatiques par rapport à l'activité d'autres protéases semble la raison la plus plausible.

Ces différentes formes de PSA (y compris la PSA liée à l'ACT) se retrouvent en bien plus grande quantité dans la circulation dans le cas d'un cancer. La raison principale est la détérioration des couches de cellules basales et de la paroi de la prostate, qui rendent l'organe beaucoup plus poreux et propice à une fuite de protéines. Ceci fait de la mesure des quantités en différentes formes de PSA circulantes un outil intéressant en première approche de détection d'hyperplasie prostatique et de cancer.

2. Rôle de la PSA dans la pathologie

La PSA présente dans la circulation est en très grande majorité inactive pour les raisons que nous avons évoquées. Cependant, dans le micro-environnement entourant une tumeur, la PSA conserve son rôle de protéase et peut influencer sur le métabolisme d'un nombre important de protéines liées à l'évolution de la pathologie. Par exemple, une cible bien connue de la PSA est la protéine de liaison 3 du facteur de croissance *insulin-like*, qui est un facteur de croissance important pour le cancer de la prostate (Okabe E. et al., 1999). Ceci va résulter en un taux circulant en IGF (*Insulin-like Growth Factor*) plus important, entraînant une prolifération plus importante.

La PSA est également capable d'influer sur la formation de métastases. En l'occurrence, cette enzyme peut cliver les glycoprotéines matricielles telles que la fibronectine, et l'ajout *in vitro* d'anticorps neutralisant la PSA résulte en la diminution des capacités migratoires de certaines cellules cancéreuses (Ishii K. et al., 2004).

Il semble également que la PSA soit impliquée dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes, la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. En effet, plusieurs expériences sur différentes lignées cellulaires issues du cancer de la prostate ont indiqué que près de 800 gènes sont régulés par la PSA (Bindukumar B. et al., 2005), que ce soit par surexpression ou par diminution d'expression, et qu'il s'agisse de pro- ou d'anti-tumoraux. On a donc, à ce niveau, un rôle bivalent de la PSA sur la croissance tumorale.

En parallèle, la PSA aurait une action mitogène *in vitro* sur certaines autres cellules comme par exemple les ostéoblastes, probablement médiée par activation de certains facteurs de croissance (Killian C. S. et al., 1993). Ceci suggère un rôle direct de la PSA dans la formation de métastases, en particulier osseuses, qui sont fréquentes et rapides après échappement hormonal d'une tumeur prostatique.

Si les résultats obtenus *in vitro* permettent d'approfondir la connaissance de la pathologie, l'importance de tous ces facteurs sur le développement de la maladie *in vivo* doit encore être clairement établie. En périphérie de la tumeur, le milieu est très particulier, ce qui rend l'étude de l'influence du taux de PSA sur les cellules particulièrement difficile. De plus, les modèles animaux reflétant ces conditions sont pratiquement inexistantes. L'obtention de composés inhibiteurs ciblant directement l'enzyme reste donc encore actuellement au stade recherche (Koistinen H. et al., 2008).

3. La mesure du taux circulant des différentes formes de PSA : le dépistage

La PSA dispose de 6 sites principaux pouvant faire office d'antigènes. Un d'entre eux peut être masqué par ACT lors de l'inactivation de la PSA dans la circulation, ce qui rend possible un *screening* spécifique PSA libre / PSA liée. Pour les mesures du taux global de PSA circulant, il reste possible d'utiliser les 5 autres sites présents avec les anticorps correspondants.

Il existe de nombreuses utilisations et interprétations des taux de PSA circulants comme marqueurs des différents stades du cancer de la prostate, et les débats sont encore vifs quant à la meilleure utilisation de cette protéase et de sa migration dans la circulation sanguine pour juger de l'évolution de la pathologie et de l'impact d'un traitement.

a) Taux de PSA total pour la détection précoce du cancer de la prostate

Suite à une large étude épidémiologique, la valeur limite du taux de PSA total (soit PSA libre et PSA liée), avant d'être orienté vers une biopsie et un toucher rectal pour confirmer la présence d'une tumeur (Catalona W. J. et al., 1994), a été fixé à 4 ng/mL. La conséquence de l'utilisation d'une valeur unique pour un large panel de population d'origines et de comportements différents, est bien entendu une source de nombreux faux positifs et de faux négatifs. Ce manque de spécificité montre le recouvrement important des taux de PSA chez les patients sains ou présentant une hyperplasie bénigne de la prostate et les patients présentant un cancer de la prostate, ce qui n'est pas surprenant étant donné les taux de production en PSA des différentes cellules.

Il faut toutefois noter que l'explosion du nombre de cancers de la prostate déclarés dès la fin des années 80 et au début des années 90 est principalement liée à la généralisation du dépistage et de la méthode du dosage du taux de PSA circulant.

b) Modification des critères et détection précoce du cancer de la prostate

Les résultats mitigés de dépistage obtenus par le dosage du taux de PSA circulant total ont conduit à chercher de nouvelles méthodes ou interprétations d'analyses sanguines.

Une des premières modifications apportée a été d'inclure un facteur de risque lié à l'âge, en diminuant le seuil conduisant à des examens plus poussés chez les jeunes et en l'augmentant chez les personnes plus âgées. Ceci a permis de dépister un nombre de cancers plus important dans la population jeune, mais le risque de faux négatifs semble accru dans la population âgée et donc à risques (Crawford E. D. et al., 1999).

Une autre possibilité est de prendre en compte la taille de la prostate (mesurée par échographie trans-rectale) : on en déduit alors la « densité de PSA », dont la valeur seuil avant biopsie est fixée à 0,15 (Kundu S. D. et al., 2007). Les limites de cette méthode se situent dans la variabilité entre la taille effective des glandes prostatiques et la taille apparente de l'organe, ce qui entraîne une controverse importante sur les faux négatifs obtenus.

La vitesse d'augmentation du taux de PSA circulant est un paramètre dont l'utilité est actuellement en passe d'être prouvée, avec un seuil critique situé à 0.75 ng/mL d'augmentation par an. Une fois de plus, cette méthode est sujette à débat dans la

communauté scientifique avec des résultats prouvant difficilement son utilité même lors de tests à grande échelle (Connolly D. et al., 2008). Une autre façon d'aborder la variation du taux de PSA circulant est de l'exprimer en temps nécessaire pour doubler sa valeur.

c) Formes de la PSA et détection du cancer de la prostate

Nous avons vu que la PSA pouvait se trouver sous différentes formes dans la circulation : la PSA liée (à l'ACT), et la PSA libre, qui peut être dérivée de la pro-PSA, de la PSA clivée, etc.. On peut alors s'intéresser au ratio PSA libre / PSA totale : ceci peut servir à compléter la mesure du taux de PSA total circulant. Plus le ratio est élevé, plus le risque est faible, vu que les clivages à l'intérieur de la séquence de la PSA sont beaucoup moins fréquents dans le cas d'une tumeur.

Récemment, et au vu de la découverte de la pro-PSA clivée comme forme existant uniquement dans le cas d'un cancer, la recherche s'oriente vers la mesure du taux circulant de cette forme particulière dans le dépistage du cancer de la prostate (Mikolajczyk S. D. et al., 2004).

d) Taux de PSA et suivi de traitement

La PSA provient presque uniquement des cellules prostatiques. Il est donc logique que l'ablation de la prostate conduise à une diminution de taux de PSA circulant : ceci constitue un moyen de vérification de l'efficacité d'une intervention chirurgicale, 92% des patients présentant une augmentation de cette valeur développant une rechute (Sandler H. M., Eisenberger M. A., 2007).

Dans le cas de castration chimique, le taux de PSA chute généralement assez rapidement, ce qui s'accompagne d'améliorations des symptômes que le patient pouvait présenter. De plus, le suivi dans le temps de ce taux permet d'anticiper un échappement hormonal et donc de commencer une chimiothérapie plus lourde, mais plus adaptée, plus tôt dans le stade de développement de la tumeur.

On peut donc constater que l'utilisation, désormais généralisée, de la PSA comme marqueur d'apparition et de développement du cancer de la prostate est toujours soumise à controverse. Il est intéressant de noter la différence d'activité entre la PSA circulante, toujours inactive, et la PSA confinée à la prostate, conservant son activité enzymatique. Ceci permet d'envisager l'utilisation de cette activité à des fins de ciblage de thérapie au moyen de *prodrug*, en utilisant un vecteur peptidique potentiellement reconnu, clivé, et libérant le principe actif ainsi vectorisé uniquement sur le site d'intérêt thérapeutique.

C - UTILISATION DE LA PSA POUR LA VECTORISATION D'UN PRINCIPE ACTIF

1. L'émergence des vecteurs ciblant la PSA : étude bibliographique résumée

L'utilisation d'un peptide capable d'amener une molécule pharmacologiquement active sur le site d'intérêt, et obtenir que la libération de cette entité se fasse uniquement à cet endroit est l'un des objectifs majeurs de la recherche contre le cancer. Cette thérapie ciblée nécessite non seulement une bonne connaissance de la cible, mais également une chimie aboutie permettant de réunir peptide et principe actif, par le biais ou non d'un espaceur, tout en prédisant le devenir métabolique du composé final.

Depuis la fin des années 90, plusieurs équipes ont abordé cette thématique dans l'optique de vectoriser des molécules déjà commercialisées comme anticancéreux en se focalisant sur l'optimisation de séquences peptidiques afin de faciliter la reconnaissance par la PSA, sans forcément utiliser une chimie novatrice pour lier de façon covalente les deux fonctions (Denmeade S. R. et al, 1997 ; Denmeade S. R. et al, 1998 ; Coombs G. S. et al., 1998 ; Khan S. R., Denmeade S. R., 2000 ; DeFeo-Jones D. et al., 2000 ; DeFeo-Jones D. et al., 2002 ; Brady S. F. et al., 2002 ; Mhaka A. et al., 2002 ; DiPaola R. S. et al, 2002 ; Denmeade S. R. et al., 2003 ; Kratz F. et al., 2005 ; Kumar S. K. 2007). Le choix de chaque partie de la molécule finale conduisant à autant de propriétés différentes, nous allons nous intéresser à quelques exemples les plus aboutis dans le cancer de la prostate pour essayer d'en souligner les principaux aspects.

De manière générale, il est important de préciser que le ciblage des cellules cancéreuses présente un avantage décisif dans la recherche de thérapeutiques à effets secondaires limités. En effet, en arrivant à prolonger la durée de vie de la *prodrug* partout dans l'organisme sauf sur le site tumoral, où elle sera rapidement métabolisé pour libérer son principe actif, il devient possible de limiter fortement les effets secondaires dus à l'action du principe actif sur les organes périphériques. De plus, en éliminant cette voie d'action (et donc de dégradation potentielle) d'un composé, il est possible de diminuer la dose efficace, ce qui constitue le premier moyen de diminution des effets secondaires, tout ceci en gardant, sur le site d'intérêt, la même efficacité.

a) Prodrug de la doxorubicine (Denmeade S. R. et al., 1998)

Ici, un peptide tiré de la séquence de Sg I, reconnu par la PSA [His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln (HSSKLQ)] a été exploité pour vectoriser la doxorubicine (Dox), en le protégeant en N-terminal par acétylation (Ac-HSSKLQ) ou par morpholino-carbonylation (Mu-HSSKLQ). Ce peptide a ensuite été greffé à la doxorubicine par réaction d'amidification sur son amine primaire libre (Fig. 29), de façon directe pour Ac-HSSKLQ ou par l'intermédiaire d'une leucine supplémentaire pour Mu-HSSKLQ [en s'inspirant de travaux préalables d'une autre équipe (De Jong J. et al., 1992)].

Dans ces cas, la PSA devait cliver entre Gln et Dox ou Leu, en fonction du peptide utilisé. Les résultats obtenus (chromatogrammes HPLC en Fig. 30) ont montré que la PSA n'était pas

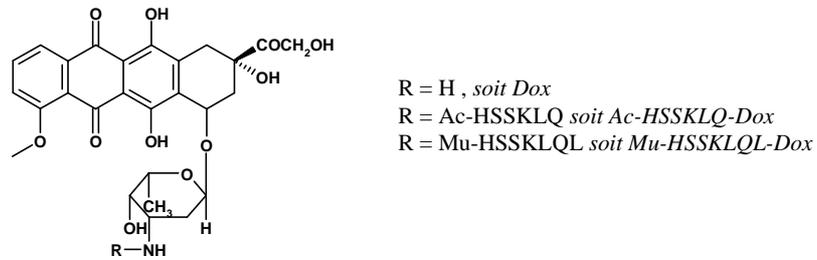


Fig. 29 : Doxorubicine vectorisée
 (adapté de Denmeade S. R. et al., 1998)

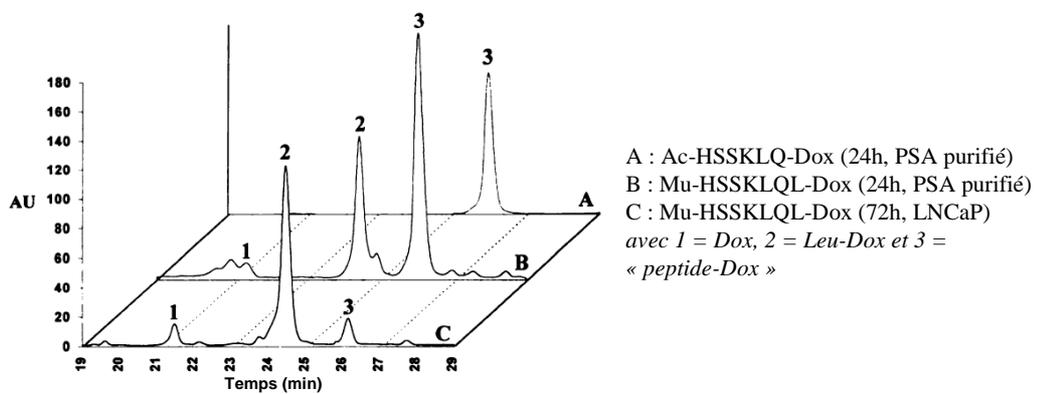


Fig. 30 : Métabolisation des dérivés de doxorubicine incubés à différents temps
 (adapté de Denmeade S. R. et al., 1998)

capable de cliver directement entre un acide aminé et la doxorubicine, même si le peptide est bien reconnu par l'enzyme. En revanche, avec l'addition de la Leu comme espaceur entre le peptide et le principe actif, le clivage a bien lieu (plus de 90% de clivage après 72h d'incubation avec la lignée cellulaire LNCaP, issue de cancer de la prostate hormono-dépendant et exprimant la PSA). En revanche, le composé libéré est alors Leu-Dox, qui possède des propriétés très similaires à la doxorubicine seule au niveau antiprolifératif sur cette lignée cellulaire.

On a donc ici un premier exemple de vectorisation permettant la libération d'un composé anticancéreux sur le site tumoral. En revanche, on constate que le principe actif libéré est différent de celui envisagé au départ : les contraintes chimiques et biologiques ont orienté la synthèse et ne permettent pas la libération de doxorubicine intacte. Bien que sans effets sur l'activité du produit utilisé dans cette étude en particulier, ceci limite de façon considérable la généralisation de la méthode.

b) *Vectorisation de la vinblastine* (DeFeo-Jones D. et al., 2002)

Lors du clivage enzymatique d'un peptide, les deux peptides de taille inférieure obtenus présentent une amine primaire libre et un acide carboxylique libre résultant de l'hydrolyse de l'amide. Ces deux fonctions, systématiquement présentes lors de l'action d'une protéase sur un peptide, peuvent être perçues comme des groupements susceptibles de réagir de façon intramoléculaire. L'amine primaire, notamment, présente un caractère nucléophile assez marqué : on peut donc envisager sa réaction sur un site électrophile voisin.

Dans le cas de la PSA, et en utilisant la séquence reconnue spécifiquement par cette enzyme résultant des travaux préalables non publiés de la même équipe (Ac-Hyp-Ser-Ser-Chg-Gln-Ser-Ser-Pro), le couplage de la 4-O-désoxyvinblastine avec ce peptide (Fig. 31) a été étudié *in vitro* et *in vivo*.

Le processus de métabolisation doit amener le clivage entre les deux sérines adjacentes à la proline portant la vinblastine. Le composé ainsi obtenu [4-O-(Ser-Pro)-désacétylvinblastine] doit alors, selon le mécanisme proposé, réagir selon un réarrangement intramoléculaire pour libérer d'une part le principe actif, d'autre part la sérine et la proline cyclisées sous forme de dicétopipérazine (Fig. 32).

In vivo, on constate que, bien que cette réaction soit majoritaire, un nombre important de produits secondaires de dégradation subsistent. Cependant, la perte de masse tumorale engendrée par l'administration de cette *prodrug* à des animaux xéno greffés est supérieure à celle obtenue par simple injection de vinblastine, ce qui suggère un effet plus ciblé et donc une vectorisation effective.

c) *Vectorisation du Paclitaxel* (Kumar S. K. et al., 2007)

Ici, la vectorisation est envisagée pour deux raisons : pour toucher en priorité l'organe ciblé évidemment, et permettre à une molécule très peu soluble comme le paclitaxel d'être soluble dans l'eau. Pour parvenir à ce but, ce taxane a été greffé sur plusieurs peptides différents, obtenus lors d'études préalables, tels que Mu-HSSKLQ.

Dans ce cas, un espaceur a été utilisé afin d'augmenter la cinétique de clivage par le PSA : en effet, l'utilisation de diamines (ici l'éthylène diamine ou l'alcool para-aminobenzylique) va permettre au PSA de cliver après le dernier acide aminé. De façon similaire aux travaux présentés précédemment (DeFeo-Jones D. et al., 2002), la cyclisation intramoléculaire de

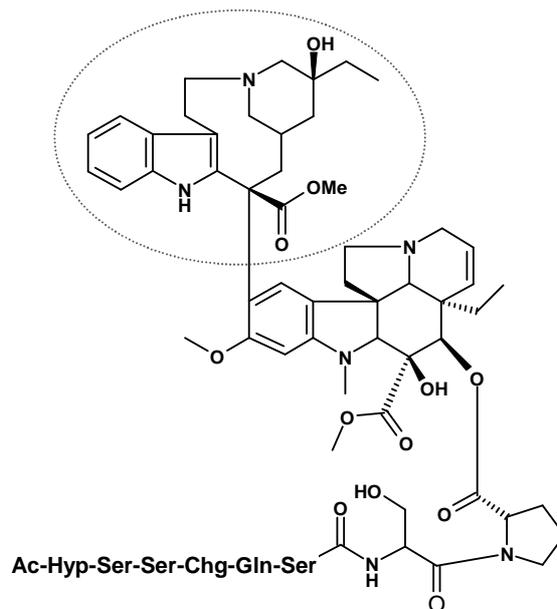


Fig. 31 : 4-O-(Ac-Hyp-Ser-Ser-Chg-Gln-Ser-Ser-Pr)-désacétylvinblastine
 (adapté de DeFeo-Jones D. et al., 2002)

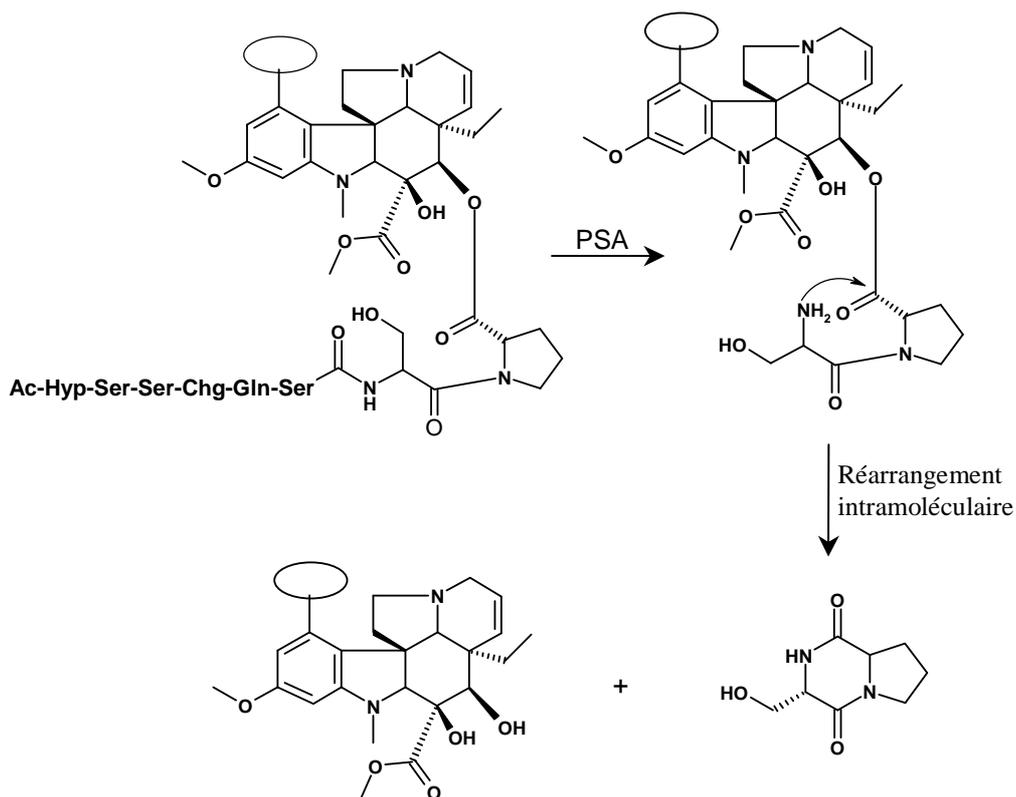


Fig. 32 : Métabolisation de la 4-O-(Ac-Hyp-Ser-Ser-Chg-Gln-Ser-Ser-Pr)-désacétylvinblastine
 (adapté de DeFeo-Jones D. et al., 2002)

l'espaceur va conduire à la libération du principe actif intact selon le mécanisme présenté sur le figure 33.

Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi de retenir l'approche « peptide – espaceur – molécule pharmacologique » permettant une cyclisation intramoléculaire afin de libérer l'inhibiteur de cyclooxygénase après clivage par la PSA. Notre attention s'est d'abord portée sur la conception d'un espaceur novateur, liant un dérivé diarylpyrazole à un peptide, puis sur la construction du peptide retenu, permettant d'aborder une étude de métabolisation *in vitro*.

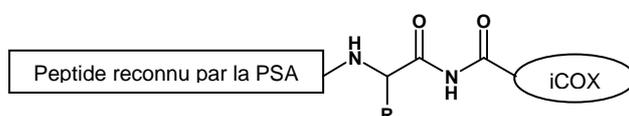
2. Notre conception de prodrug

a) *Couplage à l'inhibiteur de cyclooxygénase : un espaceur novateur*

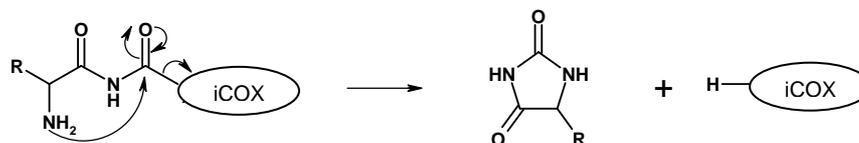
(a) Conception de l'espaceur

L'élaboration de l'espaceur doit satisfaire à plusieurs conditions. Tout d'abord, sa synthèse doit présenter le moins de risques possibles de formation de produits secondaires, et doit nécessairement être accessible aux fonctions présentes sur le peptide ainsi que sur l'inhibiteur de cyclooxygénase retenu.

En envisageant l'espaceur suivant, comprenant un acide aminé, en symbolisant l'inhibiteur de cyclooxygénase par iCOX :



et en considérant un peptide reconnu par la PSA, et clivé entre ses deux derniers acides aminés, ceci conduirait à une réaction de ce type :



R étant fonction du dernier acide aminé de la chaîne peptidique.

Ce type de cyclisation intramoléculaire conduit à la formation de deux composés :

- l'inhibiteur de cyclooxygénase, qui doit donc pouvoir, après ce réarrangement, être libéré sous sa forme active
- un dérivé d'hydantoïne, composés bien connus, et éliminés rapidement par l'organisme. Un de leurs effets secondaires est un certain pouvoir tératogène, ce qui paraît, dans le cas du traitement d'un cancer de la prostate, peu relevant.

L'utilisation d'un acide aminé naturel présente l'avantage de former, en cas de cyclisation intramoléculaire sur notre espaceur, un hétérocycle à cinq atomes, ce qui est énergétiquement

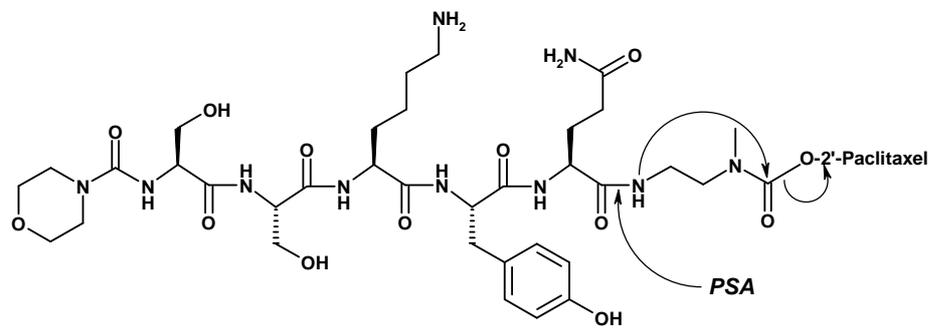


Fig. 33 : Mécanisme de libération du Paclitaxel vectorisé
 (adapté de Kumar S. K. et al., 2007)

favorable. Il sera toutefois intéressant, dans la suite, d'effectuer une comparaison de cinétique de cyclisation entre un « cycle à 5 », que l'on peut par exemple obtenir avec une glycine en C terminal, et un « cycle à 6 », résultant de la cyclisation d'un composé type β -alanine sur notre espaceur.

Un autre facteur pouvant influencer sur la vitesse de cyclisation est l'encombrement du carbone α du dernier acide aminé. Il sera donc intéressant dans la suite de synthétiser différents cas de figure, avec une glycine ou une alanine côté C-terminal.

(b) Choix de l'inhibiteur de cyclooxygénase

La conception d'inhibiteurs de cyclooxygénase sélectifs COX-2 présentée dans la partie précédente a mis en avant le squelette diarylpyrazole dans nos schémas de synthèse. Il nous a paru intéressant de tenter de vectoriser ces produits : en effet, leurs propriétés chimiques et biologiques permettent d'envisager plusieurs stratégies de synthèse pour l'obtention de l'espaceur voulu.

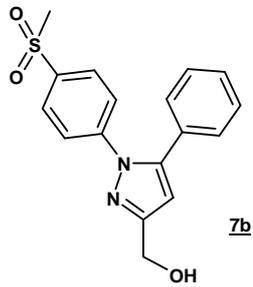
Plus spécifiquement, si on prend en compte la nécessité d'avoir une fonction protonable pouvant en plus porter la liaison type amide de l'espaceur, un inhibiteur fonctionnalisé en alcool semble intéressant pour la suite. Le 1-(4-méthanesulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1*H*-pyrazole (**7b**) correspond à ces critères (Fig. 34).

b) *Séquence peptidique retenue*

Plusieurs peptides sont communément admis comme étant clivables par la PSA. Dans le cadre de notre travail, il nous a semblé plus intéressant de focaliser l'étude sur la synthèse et le devenir métabolique de l'espaceur. Nous nous sommes donc dirigés vers un peptide assez court, présentant les caractéristiques requises pour être reconnu puis clivé par la PSA entre ses deux derniers acides aminés. Pour sa conception, il est nécessaire de s'intéresser en détail au site catalytique de l'enzyme. Nous allons donc utiliser la nomenclature classique des sites d'interaction et de clivage des protéases (Fig. 35).

En nous basant sur une étude approfondie, à la fois *in silico* et par essais de digestion menés par l'équipe de D. R. Corey (Coombs G. S et al., 1998) et portant sur l'importance de chaque acide aminé de la chaîne du peptide, et de ses interactions dans le site de clivage du PSA, nous allons envisager un pentapeptide. Celui ci, en plus de permettre des modulations chimiques afin de vérifier nos hypothèses, doit remplir les conditions suivantes dans les sites P4 à P'1 :

- P4 : L'affinité substrat - PSA est augmentée si ce peptide est acétylé, par création de liaisons hydrogène. Si l'acide aminé est β -branché, l'affinité chute. Il peut se créer dans le site une interaction de Van der Waals avec la Trp215. Une alanine semble convenir.
- P3 : Une liaison H avec l'acide de Glu218 de S3 doit pouvoir se faire afin d'augmenter l'affinité et la sélectivité envers PSA. Ici, une sérine paraît optimale (et est d'ailleurs retrouvée fréquemment dans les substrats consensus en P3), et une asparagine présente également les capacités de liaison requises.
- P2 : A ce niveau, plusieurs interactions jouent un rôle dans la reconnaissance ligand - enzyme. Tout d'abord, un effet de stacking entre l'His57 de la PSA (faisant partie



1-(4-méthanesulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1*H*-pyrazole

Fig. 34 : Diarylpyrazole retenu pour la vectorisation peptidique

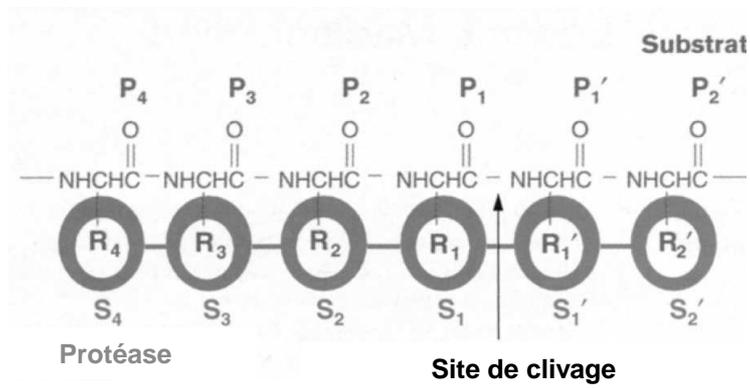


Fig. 35 : Site de clivage d'une protéase : dénomination des sites et des acides aminés du substrat

(adapté de Coombs G. S. et al., 1998)

de la triade catalytique) et un acide aminé présentant un cycle aromatique sur la chaîne latérale est possible. Ce même cycle aromatique profite ainsi de la poche située entre Tyr99 et Trp215. Il semble donc intéressant d'utiliser en P2 un acide aminé doté d'un cycle aromatique sur sa chaîne latérale, tel que la phénylalanine.

- P1 : Si les parois de S1 sont hydrophobes, le fond de la cavité est polaire. Toutefois, la taille de ce site est réduite, ce qui encourage l'utilisation d'acides aminés faiblement ramifiés tels que la sérine. Cependant, expérimentalement, on constate que l'utilisation de la glutamine permet une bonne occupation du site, et a tendance à « forcer » le PSA à cliver après cet acide aminé lorsque la séquence peptidique est courte, et donc par essence peu spécifique.
- P'1 : A cause d'une taille de site S'1 réduite, l'acide aminé situé après le site de clivage doit être de petite taille. Au vu de cette information, et en tenant compte de la glutamine présente en P1, l'utilisation d'une glycine ou d'une alanine à cette position paraît judicieuse.

Enfin, les sites adjacents S5 et S'2 sont de taille très réduite, ce qui participe à la sélectivité de la PSA. Dans notre étude, l'utilisation d'un acide aminé en P'2 est impossible car elle compromettrait la cyclisation de l'espaceur. Les interactions entre P5 et le site S5 sont quant à elles très limitées, et jouent plus un rôle de discrimination qu'un rôle de reconnaissance. L'utilisation d'un sixième acide aminé dans notre séquence peptidique ne paraît donc pas indispensable au vu de l'objectif de notre étude.

En plus de ces interactions directement dépendantes du choix des acides aminés utilisés pour la synthèse du peptide, le site de clivage de la PSA crée spontanément des interactions de plusieurs natures avec les fragments de peptides métabolisés. Ceci est dû aux interactions nombreuses qui se forment entre les atomes d'azote et d'oxygène composant les liaisons peptidiques.

Au final, nous avons choisi de retenir les peptides suivants :

Ac-Ala-Asn-Phe-Gln-(Gly/Ala)-OH

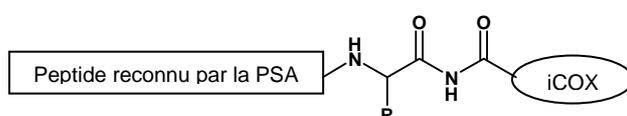
Il faut noter ici qu'en plus de favoriser les interactions dans le site actif de la PSA, l'acétylation du N terminal de notre séquence présente d'autres avantages : la protection de cette extrémité augmente la stabilité face aux aminopeptidases présentes dans les milieux biologiques, tout en fournissant une protection chimique adaptée lors de nos synthèses.

D - STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Le but du travail de vectorisation entrepris ici est de montrer l'efficacité de notre espaceur dans une situation de réarrangement après clivage enzymatique, tout en se focalisant sur une chimie permettant l'application la plus large possible de la méthode.

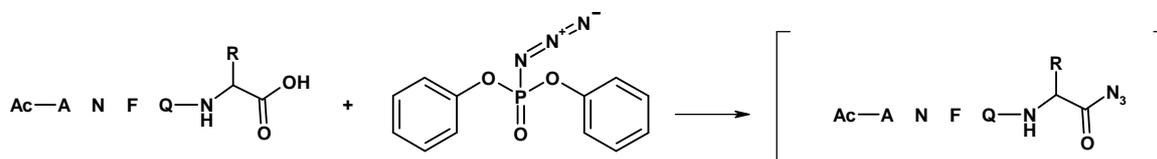
1. Voies de synthèse possibles

Nous avons vu que l'espaceur visé est le suivant :



En première approche, il peut sembler intéressant de faire réagir un acide-azide porté par le peptide sur un thioacide, ici porté sous forme de thiocarbamate par l'inhibiteur de cyclooxygénase.

L'activation du C terminal du peptide en acide-azide peut se faire facilement et sélectivement par addition de diphénylphosphorylazide (DPPA) :



L'inconvénient de cette activation est l'instabilité du produit obtenu, qui doit généralement être remis en réaction directement après sa formation.

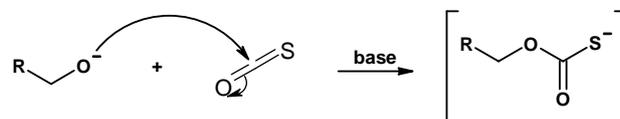
Concernant l'inhibiteur de cyclooxygénase il existe plusieurs voies de synthèse pour fonctionnaliser un alcool en thiocarbamate. Tout d'abord, la réaction à température ambiante et à pression atmosphérique du monoxyde de carbone et du soufre élémentaire sur un alcool primaire, en s'aidant d'une base telle que le diaza-1,8-bicyclo[5.4.0]undécène-7 (DBU), conduit au sel de thiocarbamate (Mizuno T. et al., 2005):



Cependant cette réaction présente deux inconvénients majeurs : d'une part, le sel formé est instable (les équipes travaillant avec cette méthode formant généralement l'ester par S-méthylation avec l'iodure de méthyle *in situ*) et va devoir être remis en réaction directement après sa formation. Comme il en est de même pour l'acide-azide dérivé du peptide, ceci pose un problème pratique conséquent. D'autre part, l'utilisation de monoxyde de carbone, gaz

toxique inodore et incolore, présente d'importants risques au niveau de la sécurité de manipulation dans un laboratoire.

Une autre voie de synthèse met en jeu la réaction de sulfure de carbonyle SCO en milieu basique sur l'alcool (Bean M. et Kohn H., 1983 ; Mizuno T. et al., 2002) :



Ici encore, le sel obtenu est très instable, nous obligeant à synthétiser les deux réactifs nécessaires pour le couplage et à les faire réagir *in situ*, ce qui est peu pratique et source de mauvais rendements.

Suite aux recherches bibliographiques présentées, nous avons décidé de nous orienter vers la stratégie de synthèse « opposée », à savoir l'activation de l'alcool en azidoformate, et l'activation du peptide en thioacide que nous allons présenter ci-après et selon le schéma de synthèse présenté dans la figure 36.

2. Synthèse des peptides

Les peptides ont été réalisés sur un synthétiseur couplé à un micro onde, en utilisant une résine de Wang que nous avons greffée avec le premier acide aminé de façon classique. La méthode utilisée est de type « Fmoc » (fluorénylméthoxycarbonyl), en utilisant comme activateurs le *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)diméthylaminométhylène]-*N*-méthylméthanammonium hexafluorurophosphate-*N*-oxyde (HBTU) et la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA). La protection du *N*-terminal a également été effectuée par l'appareil, en utilisant de l'anhydride acétique.

Nous récupérons alors la résine chargée en peptide, que nous clivons en utilisant un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA) et de pièges à carbocations servant à piéger les groupements protecteurs ainsi libérés. Après précipitation et lyophilisation, la suite de la synthèse peut être amorcée.

Sur un peptide assez court (5 acides aminés ici), les rendements sont très bons après lyophilisation (de l'ordre de 80%), et les produits obtenus sont purs à plus de 95%.

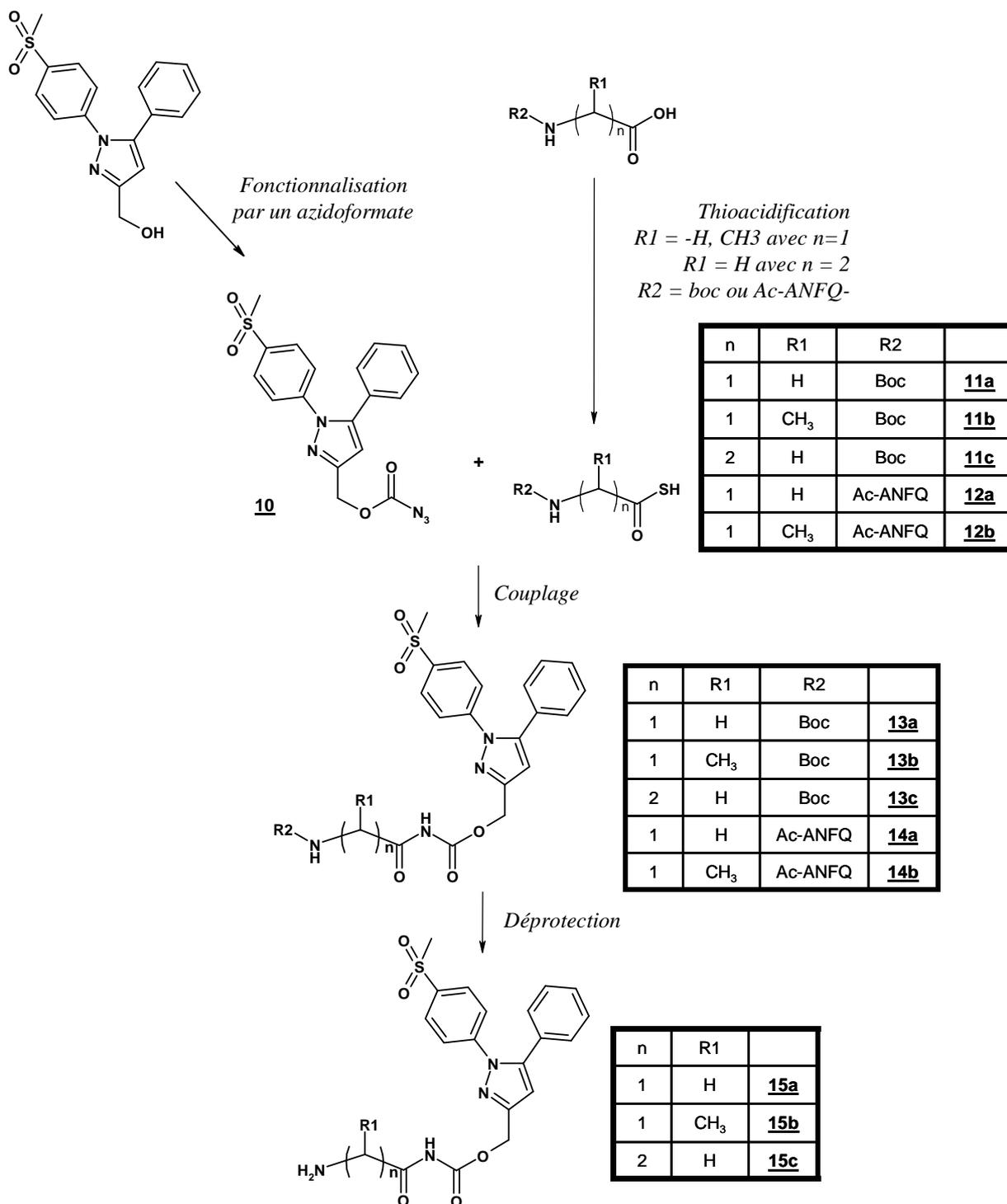
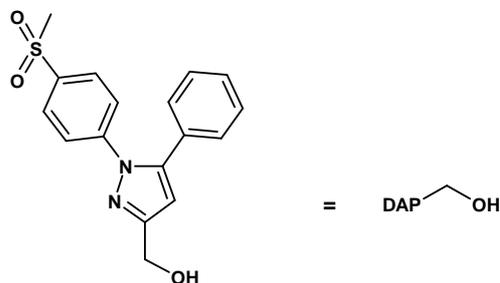


Fig. 36 : Stratégie de synthèse des inhibiteurs de cyclooxygénase vectorisés

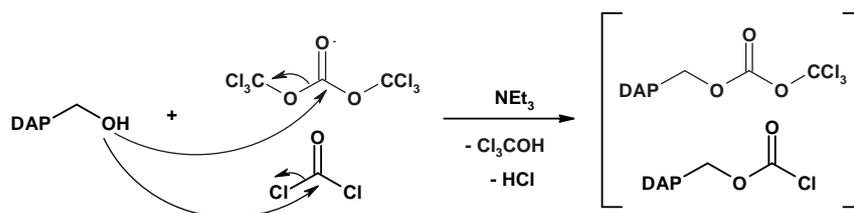
3. Activation de l'inhibiteur de cyclooxygénase

Dans la suite, pour plus de clarté dans les schémas de synthèse, nous allons symboliser le 1-(4-méthanesulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1*H*-pyrazole par DAP-CH₂-OH :



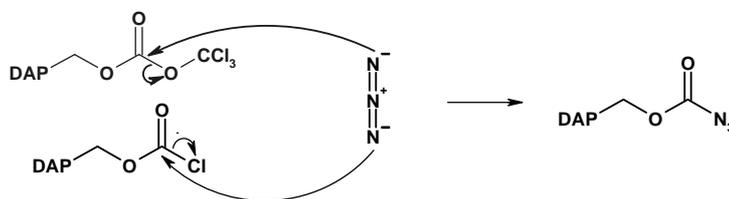
a) *Préactivation par le triphosgène*

Les premières manipulations abordées pour obtenir l'azidofomate nécessitent l'utilisation de triphosgène comme électrophile (faisant apparaître du phosgène dans le milieu, lui aussi réactif) afin de fonctionnaliser l'alcool tout en permettant *in situ* la réaction de l'azide de sodium (Patil R. T. et al., 2002) afin d'obtenir la fonction recherchée, selon le mécanisme suivant :

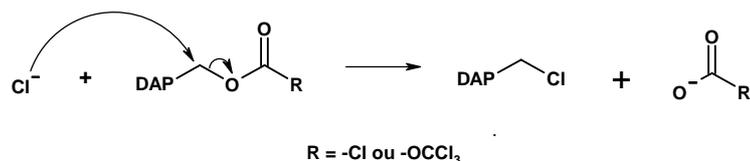


La fonction alcool du diarylpyrazole peut réagir sur le triphosgène, ou sur le phosgène, qui résulte de la dégradation du triphosgène en présence de quantités catalytiques de Cl⁻.

Ensuite, l'azide de sodium présent en solution va pouvoir réagir par une réaction d'attaque sur un site électrophile, par les doublets libres portés par l'azote :

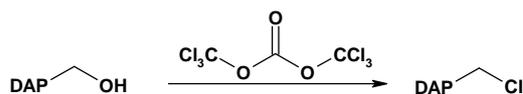


Cette réaction a conduit à la formation d'un seul produit majoritaire, avec un rendement de l'ordre de 80%. Cependant, les analyses du produit obtenu par LC/MS notamment ont révélé une différence de masse importante avec le produit attendu : au lieu de retrouver MH⁺ = 398 g/mol, nous avons obtenu une masse de MH⁺ = 347 g/mol. Le profil isotopique conduisant à soupçonner la présence d'un halogène type chlore sur la molécule, nous pouvons proposer le mécanisme de formation suivant pour le composé obtenu :



Il est en effet vraisemblable que l'activation par le phosgène ou le triphosgène de notre composé permette une attaque de type nucléophile du chlore sur le carbone portant la fonction type carbamate. De par cette fonction, et en prenant en compte la délocalisation des électrons sur le cycle pyrazole voisin, ce carbone présente probablement un caractère δ^+ marqué.

Nous avons donc la réaction suivante, avec un rendement de 80 % :

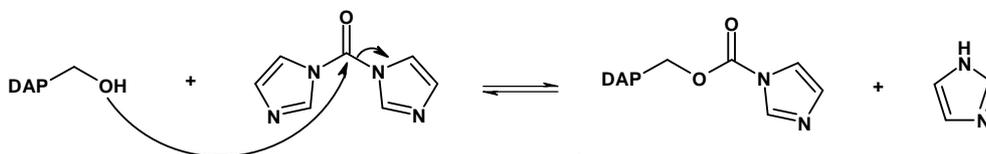


En plus de poser problème lors de notre synthèse, ceci est un frein à la généralisation de la méthode, un nombre important de médicaments étant pourvu de cycles ou d'hétérocycles dans leurs squelettes.

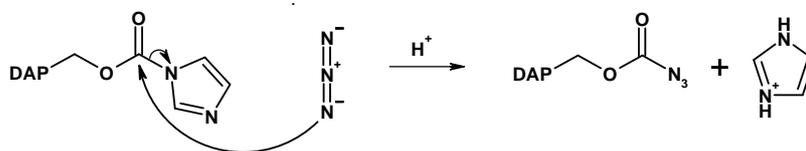
Suite à ces essais, nous nous sommes en conséquence orientés vers une activation plus « douce » de l'alcool pour éviter ce type de réaction.

b) Préactivation par le carbonyldiimidazole

La réaction de type attaque nucléophile sur le carbonyldiimidazole est bien connue, et se déroule selon le mécanisme suivant en milieu basique avec libération d'imidazole :



Cette réaction se fait très bien à température ambiante, et le produit obtenu est stable. Après un lavage aqueux, le dérivé de diarylpyrazole carbonylimidazolé est remis en réaction avec l'azide de sodium (Yuan P. et al, 1995) :



L'utilisation d'un milieu acide va permettre de faciliter la réaction et de déplacer l'équilibre par neutralisation de l'imidazolium libéré, son pK_A se situant autour de 7. Nous nous sommes donc placés aux alentours d'un pH de 4 pour réaliser cette seconde étape.

Il est intéressant de constater ici qu'un lavage aqueux rapide permet d'éliminer tous les produits secondaires de la réaction, ainsi que l'azidure de sodium en excès. La réaction étant totale, nous obtenons le produit pur, dont les analyses classiques confirment ici la structure. A l'air, ce produit est stable, ce qui permet d'éviter les inconvénients d'un schéma de synthèse

nécessitant trop de réactions *in situ* dues aux intermédiaires instables. De plus, les conditions particulièrement douces de cette synthèse suggèrent une généralisation aisée de la méthode.

4. Synthèse d'aminothioacides

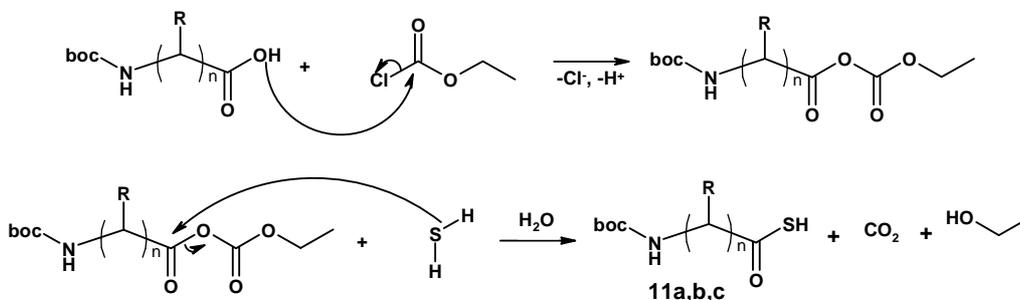
Il nous a semblé judicieux, lors de nos synthèses, de commencer par procéder à des essais de synthèse de thioacide sur des acides aminés protégés par un groupement tertbutyloxycarbonyle (BOC) en C-terminal pour les raisons suivantes :

- évaluer les conditions de synthèses choisies pour la thioacidification ;
- procéder à des essais de synthèse et mise au point des conditions de formation de l'espaceur sur des composés moins onéreux ;
- pouvoir ensuite, en déprotégeant, étudier le réarrangement intramoléculaire.

Puis l'élargissement de la méthode aux peptides que nous avons choisis et le couplage avec l'inhibiteur de cyclooxygénase ont été réalisés.

a) *Thioacidification d'acides aminés protégés par un BOC en N-terminal (11)*

A température ambiante et avec un temps de réaction très court, il est possible de former un thioacide à partir d'un acide carboxylique (Le H.-T. et al., 1996 ; Zhu X. et al., 2004). L'activation de l'acide carboxylique par le chloroformiate d'éthyle en milieu basique conduit à un anhydride disymétrique très réactif, qui va pouvoir être libéré par l'action du sulfure d'hydrogène :



Lors de cette réaction, le milieu réactionnel prend une teinte jaune, et il se forme une quantité de bulles importante à cause de la libération de dioxyde de carbone gazeux notamment. Cette réaction se fait avec des rendements de l'ordre de 90% après un simple lavage aqueux suivi d'une évaporation sous vide, permettant d'isoler le produit final pur.

Ces composés thioacides sont assez stables et peuvent être conservés, même s'ils présentent une certaine sensibilité à l'eau conduisant à la dégradation en acide carboxylique.

b) *Thioacidification des peptides (12)*

Nous avons voulu utiliser la même méthode de synthèse de thioacides sur les peptides. Cependant, l'activation de la fonction acide carboxylique par le chloroformiate à température ambiante conduit à la dégradation de la séquence peptidique, ce qui a été résolu par une

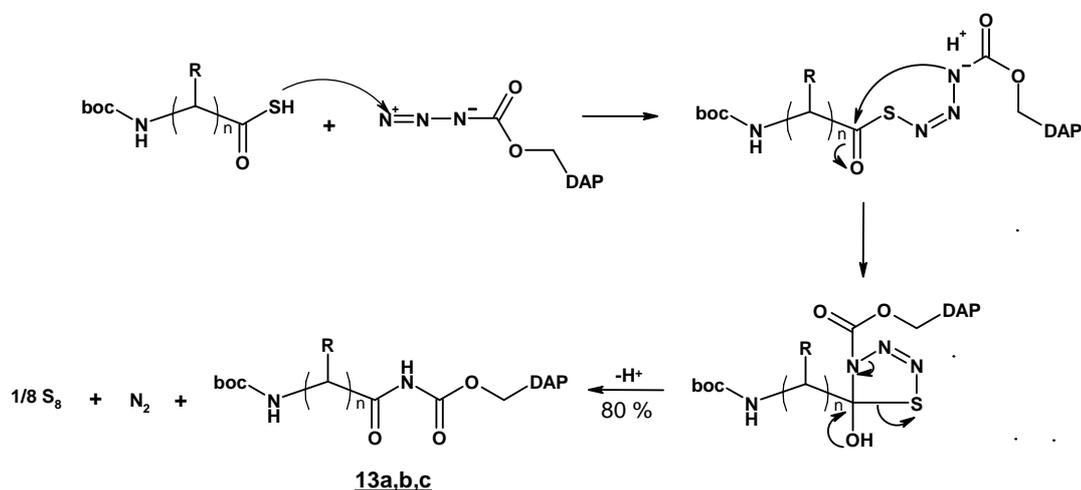
diminution de la température. En effet, nous avons constaté une quantité moindre de produits secondaires en réalisant cette réaction à -45°C . Nous pouvons alors, après quelques minutes, laisser le mélange remonter à température ambiante avec un barbotage de sulfure d'hydrogène. La réaction suit le même mécanisme que celui présenté pour les acides aminés simples.

L'apparition de plusieurs produits secondaires, résultant probablement en partie du clivage de la chaîne peptidique mais également de la non réaction de l'acide carboxylique, nécessite de réaliser une CLHP préparative pour essayer d'obtenir le thioacide pur. Cependant, nous avons constaté une hydrolyse rapide de cette fonction, ce qui interdit l'utilisation de cette technique. La réalisation d'une chromatographie flash sur nos composés est également problématique. Nous avons donc décidé d'utiliser ces composés bruts pour le couplage avec l'inhibiteur de cyclooxygénase activé, ce qui conduit à un produit bien plus stable et donc potentiellement purifiable.

5. Couplage des thioacides et des azidoformates : synthèse de l'espaceur

a) *Couplage avec les acides aminés activés (13)*

Au vu des propriétés physico-chimiques des composés à faire réagir, nous nous sommes placés en milieu basique pour faciliter le couplage entre un thioacide d'acide aminé et l'azidoformate de diarylpyrazole, ceci afin de piéger le proton libéré au cours de la réaction. Le mécanisme est encore non élucidé, toutefois nous pouvons proposer le schéma suivant, en nous inspirant de travaux réalisés sur des composés similaires (Kolakowski, R. V. et al., 2006 ; Shangguan, N. et al., 2003) :

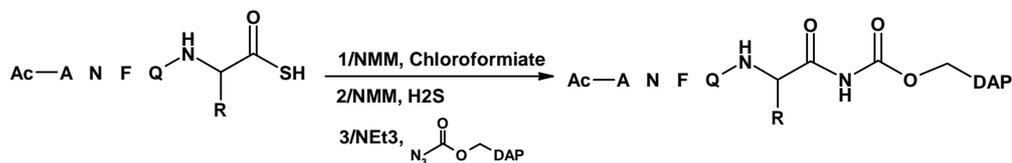


On constate expérimentalement que cette réaction se fait facilement, avec des rendements après CLHP préparative supérieurs à 80%.

Pour déprotéger le N-terminal, on utilise communément un mélange d'acide trifluoroacétique et de dichlorométhane. Ici, la déprotection se fait très facilement. En prenant garde à rester en milieu très acide afin de conserver l'amine protonée, un lavage aqueux permet de purifier le produit de cette déprotection.

b) *Couplage avec les peptides (14)*

Nous avons voulu nous inspirer des essais réalisés avec les acides aminés simples, ce qui n'a pas été entièrement possible à cause de la formation de produits secondaires lors de la synthèse du thioacide. Nous avons donc remis en réaction avec le DAP activé le peptide thioacide sans purification préalable pour obtenir un mélange contenant l'inhibiteur vectorisé par un peptide, selon la réaction bilan suivante :

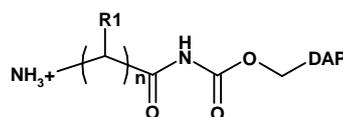


Il est nécessaire de purifier ce mélange en CLHP préparative. Ces purifications sont délicates, plusieurs produits présentant des capacités d'éluion assez proches. Afin d'obtenir des puretés exploitables dans les évaluations biochimiques prévues, nous avons dû procéder à deux purifications successives sur deux types de résines différentes (C18 et C4), ce qui conduit à un rendement plus faible, de l'ordre de 40%.

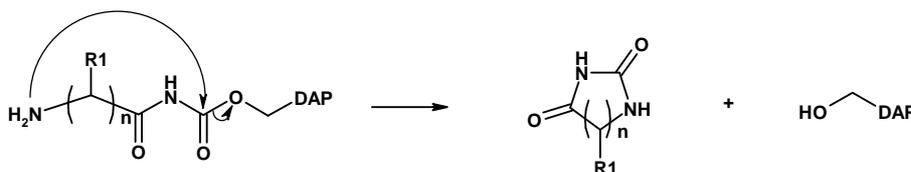
E - EVALUATIONS PHARMACO-CHIMIQUES

1. Réarrangement après déprotection dans le cas des acides aminés simples

Nous avons vu comment obtenir l'inhibiteur de cyclooxygénase couplé à un acide aminé dont le N-terminal est protégé par une fonction BOC. Nous avons également vu sa déprotection par un mélange contenant l'acide trifluoroacétique en grande quantité, qui va conduire à :



On constate ici que l'amine est protoné, ce qui est normal et voulu à pH acide. Si l'on place le composé en milieu présentant un pH physiologique (soit 7,4), l'amine va se trouver déprotonée de façon non négligeable (1% environ), et donc avec un doublet non liant sur l'atome d'azote. On peut alors avoir la réaction intramoléculaire suivante, qui est irréversible et entropiquement favorable :



Nous avons voulu étudier différents aspects de cette réaction : sa cinétique, l'influence de R1 ainsi que la variation de vitesse de cyclisation entre $n=1$ et $n=0$, et comparer les produits en milieu tamponné à $\text{pH} = 7,4$ et à $\text{pH} = 2,5$ (donc amine libre présente et amine protonée presque exclusivement).

Nous avons réalisé par CLHP plusieurs suivis du milieu d'incubation des différentes molécules, en identifiant les composés formés par leur profil d'absorption UV, leurs temps de rétention ainsi que leurs masses détectées par la méthode electrospray.

Les chromatogrammes (détection à 265 nm) normalisés sont présentés sur les figures 37 et 38. On peut proposer les premières conclusions suivantes :

- Les 3 composés étudiés sont stables à $\text{pH} 2,5$ pendant plusieurs heures sans présenter de dégradation notable (les chromatogrammes obtenus après 4h d'incubation ne sont pas présentés ici).
- Pour les composés cyclisant en « cycle à 5 » (Fig. 37) leur temps de demi-vie à $\text{pH} = 7,4$ est trop court pour être mesuré. Les injections supposant symboliser le mélange initial présentent déjà une cyclisation presque totale des produits (en réalité, le temps de manipulation nécessaire entre le mélange, l'injection effective et l'arrivée sur la tête de la colonne est d'environ 5 minutes). L'influence d'un groupement $-\text{CH}_3$

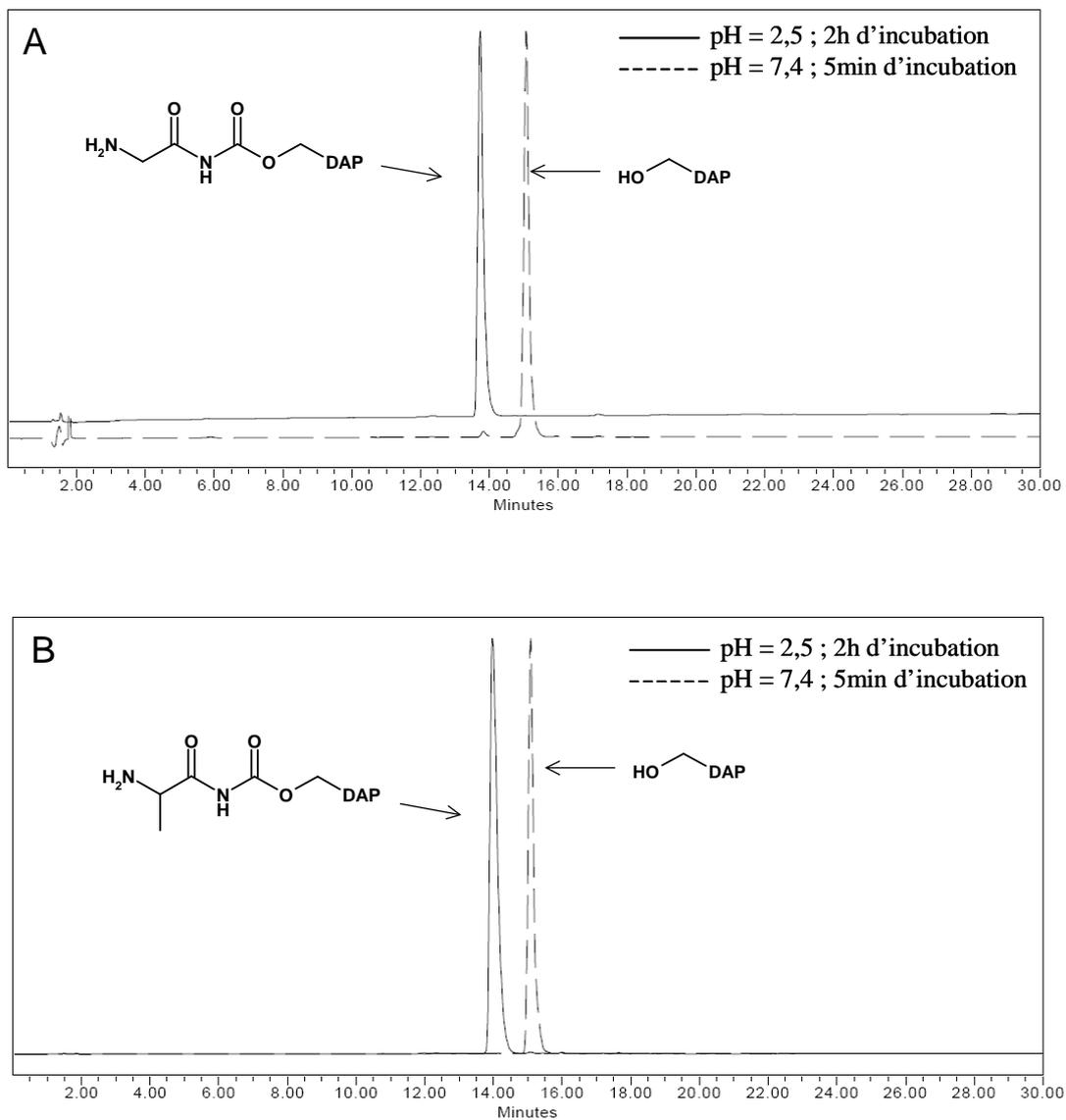


Fig. 37 : Profils chromatographiques obtenus après incubation de l'inhibiteur de cyclooxygénase couplé à une glycine (A) ou à une alanine (B) via l'espaceur ($\lambda = 265$ nm)
 (Les conditions chromatographiques sont données en annexe, l'identification des pics ayant été faite par LC/MS)

supplémentaire en position α de l'acide aminé (donc la différence entre une glycine et une alanine) sur la vitesse de cyclisation n'est pas mesurable dans nos conditions expérimentales.

- Concernant la cyclisation du dérivé pourvu d'une β -Ala (Fig. 38), son temps de demi-vie à pH = 7,4 est d'environ 1h. Ceci conforte l'idée de poursuivre ce travail sur des acides aminés et peptides naturels pour conserver la formation d'un cycle un peu plus tendu, cyclisant plus rapidement.

A 265 nm, on ne voit que les dérivés portant un cycle aromatique, dont le diarylpyrazole. Si on se place à une longueur d'onde plus faible comme 215 nm pour pouvoir détecter les composés linéaires, on constate que l'acide aminé ainsi que l'hydantoïne sortent dans l'injection, car ils sont polaires et très solubles.

Parmi toutes les informations obtenues concernant l'importance du pH, du temps d'incubation..., la possibilité que nous avons acquise d'obtenir et de contrôler une rapidité maximale de cyclisation est très intéressante à la fois dans le cadre d'une étude de digestion enzymatique sur un peptide complet *in vitro*, et sur l'utilisation de ce type de composés *in vivo*.

Dans le cadre des études utilisant la PSA purifiée, ceci va nous permettre de pouvoir suivre directement la cinétique de clivage de notre peptide, la vitesse de la deuxième étape de métabolisation qu'est la cyclisation rendant sa durée négligeable par rapport au temps nécessaire à la digestion du peptide.

De plus, en cas d'utilisation dans un organisme dans un but de thérapie ciblée, ce type de structure chimique va permettre d'amener la molécule sur le site, de cliver le peptide vecteur, et de conduire immédiatement à la cyclisation puis à la libération du principe actif sans laisser le temps à l'intermédiaire de se propager dans l'organisme, ce qui invaliderait l'objectif final de ce type de thérapie.

2. Etude de la vectorisation de l'inhibiteur de cyclooxygénase par un peptide

Les résultats obtenus lors des essais de cyclisations avec les acides aminés simples présentés dans la partie 1. nous ont permis d'envisager l'étude de la métabolisation de notre peptide portant un inhibiteur de cyclooxygénase.

Nous avons donc procédé dans un premier temps par comparaison entre la dégradation / métabolisation du composé Ac-ANFQG-COX dans un milieu contenant du PSA, et dans le même milieu dépourvu de PSA. Les conditions choisies sont les suivantes :

- Concentration en composé Ac-ANFQG-COX = 40 μ M
- Concentration en PSA (si applicable) = 10 μ g/mL, soit 1% de celle du peptide vecteur
- Milieu tamponné à pH = 7,8 (tampon Tris / NaCl)
- Température d'incubation = 37°C
- Temps d'incubation = 15h

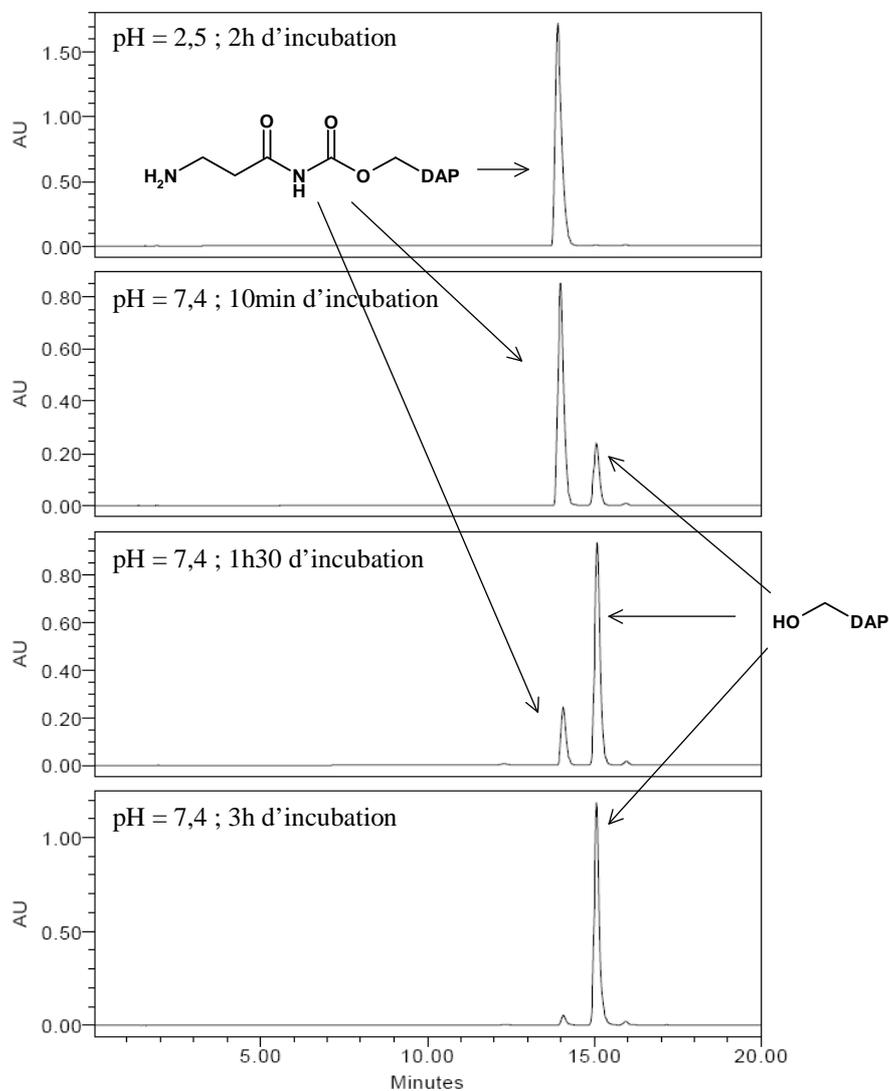
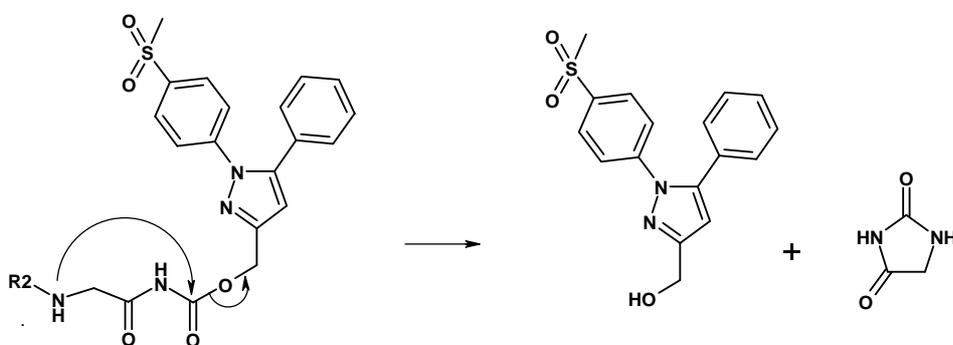


Fig. 38 : Profils chromatographiques obtenus après incubation de l'inhibiteur de cyclooxygénase couplé à une β -alanine via l'espaceur ($\lambda = 265$ nm)

Nous avons ainsi obtenu après 15 heures d'incubation les chromatogrammes présentés figure 39.

Nous pouvons constater une nette différence entre les deux milieux. En présence de PSA, la quasi-totalité du composé initial est métabolisée, pour libérer principalement le diarylpyrazole, ainsi qu'un produit encore non déterminé présentant une $MH^+ = 352 \text{ g.mol}^{-1}$. Dans le milieu témoin, il reste encore majoritairement le composé de départ, malgré la présence à la fois du diarylpyrazole et du produit non identifié.

Il est probable que le peptide lié à l'espaceur puisse se décomposer par une réaction de cyclisation intramoléculaire mettant en jeu l'azote d'une liaison peptidique et l'espaceur selon ce mécanisme :



Bien que cette réaction ne soit pas favorisée du point de vue énergétique ainsi que stérique, la présence intramoléculaire de centres réactifs la rend vraisemblable.

Ces premiers résultats sont donc encourageants. Notre peptide semble reconnu par l'antigène spécifique prostatique, et son clivage va permettre le réarrangement intramoléculaire tel que nous l'avions prévu. Il subsiste néanmoins une réaction de dégradation secondaire, qui reste encore à expliciter dans les manipulations futures, en commençant par l'identification du produit qu'elle génère. Toutefois, dans l'ensemble, nos objectifs ont été atteints.

Plusieurs expériences sont maintenant prévues, en particulier pour effectuer un suivi cinétique précis de la digestion de nos vecteurs par l'enzyme. Les connaissances ainsi accumulées devraient permettre de continuer l'optimisation de ce type de vectorisation, en essayant de généraliser la méthode à d'autres cibles.

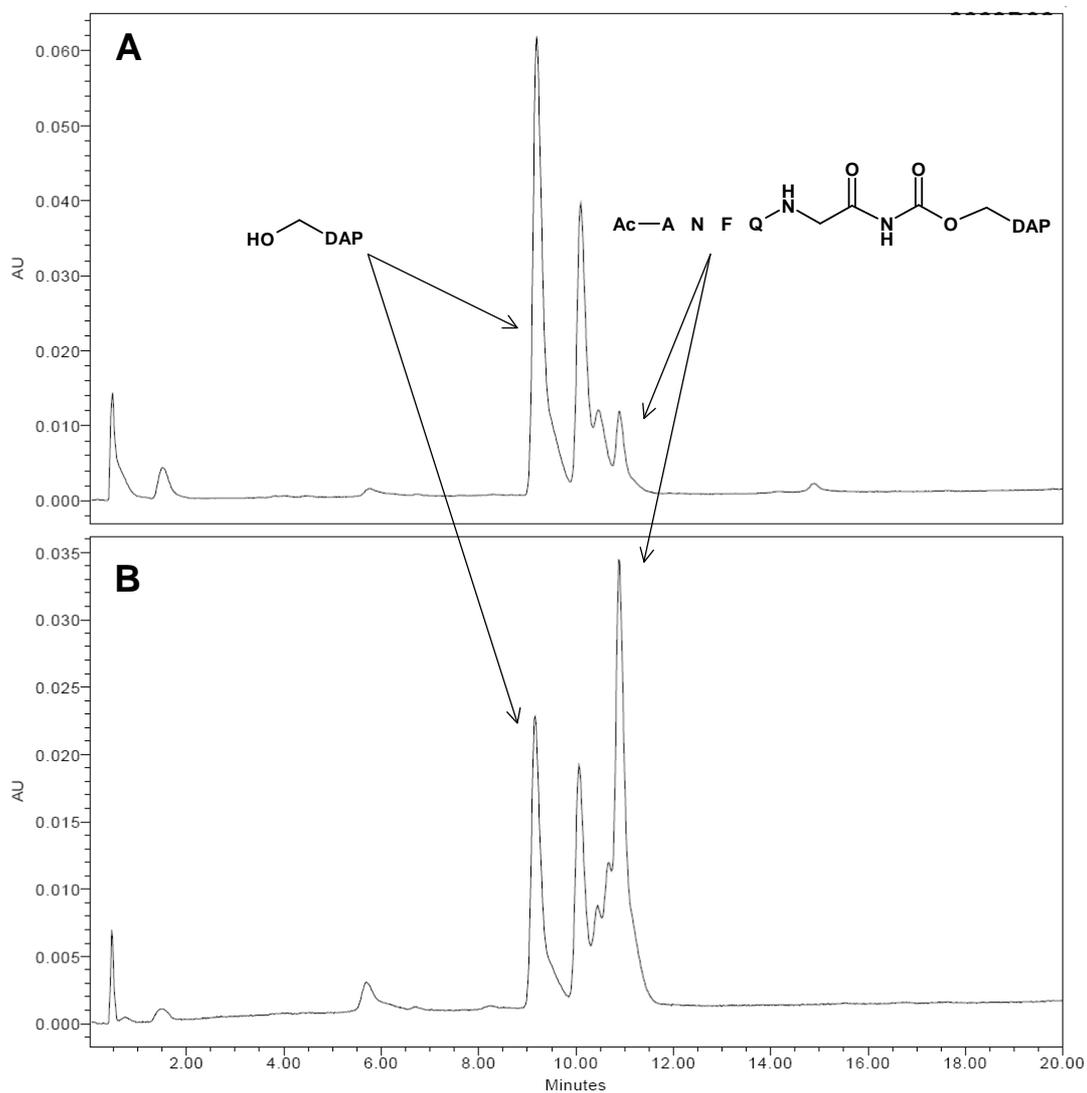


Fig. 39 : Profils chromatographiques obtenus après 15h d'incubation de l'inhibiteur de cyclooxygénase couplé au peptide Ac-ANFQG ($\lambda = 265 \text{ nm}$) en présence de 1% de PSA (A) ou dans le milieu témoin tamponné (B)

F - CONCLUSION DU TRAVAIL DE VECTORISATION

La conception de stratégies thérapeutiques permettant de cibler les cellules tumorales est la priorité actuelle de la recherche contre le cancer. Amener une molécule possédant des propriétés anticancéreuses sur le site de la tumeur est le meilleur moyen de diminuer les effets secondaires qui restent la limitation majeure des chimiothérapies.

Le travail réalisé au niveau bibliographique a permis d'aboutir à la conception d'un espaceur novateur permettant de lier un principe actif pharmacologiquement (dans notre cas un inhibiteur de cyclooxygénase) à un peptide pouvant être reconnu puis clivé par la PSA. Ceci va ensuite entraîner, comme nous l'avons montré par l'étude de dérivés possédant un unique acide aminé, un réarrangement intramoléculaire extrêmement rapide de l'espaceur libérant ainsi le diarylpyrazole vectorisé. Ceci a été confirmé par la métabolisation par la PSA de notre peptide couplé à un dérivé de diarylpyrazole.

Dans la suite, d'autres études de digestion enzymatiques doivent être menées afin de confirmer nos résultats et d'en apprendre d'avantage sur ce nouvel espaceur et les nombreuses possibilités d'utilisation qu'il comporte, que ce soit dans le cas d'un cancer ou d'autres maladies présentant une hyperactivité enzymatique spécifique. En parallèle, l'étude de l'effet antiprolifératif de notre composé sur des cellules issues du cancer de la prostate produisant de la PSA (type LNCaP) est envisagée. Si les résultats s'avèrent concluants, d'autres études *in vitro* et *in vivo* permettrait de confirmer le potentiel de ciblage de la molécule en donnant une idée de la sélectivité du clivage par la PSA *versus* d'autres protéases.

Bien que ce ciblage des cellules tumorales reste une priorité, la conception de nouvelles entités chimiques dotées d'une plus grande activité et d'effets secondaires plus restreints reste un objectif important de la recherche. En considérant les effets secondaires des inhibiteurs de cyclooxygénase, la libération par le biais d'une *prodrug* d'une seconde entité active permettant à la fois de limiter ces effets indésirables tout en augmentant l'activité de nos inhibiteurs est intéressante. C'est un messenger ubiquitaire de nature radicalaire, ayant fait l'objet de nombreuses études et d'un prix Nobel depuis sa découverte dans les années 1980, qui a suscité notre intérêt : le monoxyde d'azote, ou NO. Bien que son utilisation la plus répandue soit celle de vasodilatateur, il présente des caractéristiques d'intérêt dans le cadre de la lutte contre le cancer. Après avoir étudié son incorporation dans nos molécules, un large panel d'études pharmacochimiques va pouvoir être conduit pour tenter d'en comprendre l'intérêt antiprolifératif à travers l'étude des mécanismes de sa libération.

Chapitre IV :

***La conception de composés mixtes
inhibiteurs COX / donneurs de NO***

Le monoxyde d'azote, également appelé « oxyde nitrique » (NO) est un radical libre très réactif. De charge neutre, il possède un électron non apparié qui lui permet de jouer le rôle d'oxydant radicalaire (donneur d'e⁻) ou d'anti-oxydant (accepteur d'e⁻). Son spin électronique total vaut 1/2. En milieu biologique, son temps de demi-vie est estimé entre 1 et 5 secondes, voire 30 secondes dans certaines conditions, durée pendant laquelle ce médiateur ubiquitaire peut assumer un grand nombre de rôles, allant de la vasodilatation à la neuromédiation. Son intérêt dans la pathologie cancéreuse est maintenant bien argumenté et nous insisterons bien sûr ici sur cet aspect. Coupler un « donneur de NO » à des inhibiteurs de cyclooxygénase, en premier lieu pour contrer les effets secondaires des AINS, repose sur le principe d'une *prodrug* : la partie comportant une fonction capable de libérer le NO va reposer sur une métabolisation ou une décomposition du composé initial, qui devra déboucher sur la libération de l'inhibiteur parent. C'est sur ce principe que seront construits nos composés, et sur ces aspects qu'ils seront évalués.

A - NO : DECOUVERTE, ORIGINE ENDOGENE ET ROLE PHYSIOLOGIQUE

C'est au cours d'expériences sur la relaxation vasculaire que la capacité de l'endothélium à libérer un composé vasodilatateur a été découverte (Furchgott R. F., Zawadzki J. V., 1980). En l'absence de connaissances quant à la nature de ce médiateur, il a été nommé « Endothelium-Derived Relaxing Factor » (EDRF). Il a fallu plus de sept ans pour que deux équipes arrivent à la conclusion qu'un polluant typique tel que le NO était à l'origine de ces effets. (Ignarro L. J. et al., 1987a,b ; Palmer R. M. et al., 1987).

1. Biosynthèse de NO

Assez rapidement après la découverte de ce médiateur, la L-arginine a été identifiée comme la source de sa biosynthèse (Palmer R. M. et al., 1988). Cet acide aminé est présent dans le sang, dans le liquide extracellulaire mais également, et à haute concentration, dans les cellules. La réaction à 5 électrons (passage de l'état -3 à +2) est catalysée par une « Nitric Oxide Synthase » (NOS) et présente une équation bilan simple, cachant un grand nombre de cofacteurs tels que la tétrahydrobioptérine (BH₄), un hème ou encore la calmoduline (CAM) qui se couple à l'enzyme (d'où une certaine forme de dépendance vis à vis du taux de calcium), et dont la quantité à disposition joue un rôle important. Cette réaction se déroule en 2 étapes principales, la transformation de la L-arginine en N-hydroxyarginine, puis en NO et citrulline (Fig. 40). Ces deux oxydations passent par l'hème du site catalytique, seuls les substrats sont différents.

Les NOS ont des structures complexes, et trois isoformes ont été découvertes à ce jour (Papapetropoulos A. et al., 1999), associées chacune au tissu dans lequel elles ont été découvertes :

- la NOS neuronale (nNOS, ou NOS I), exprimée de manière constitutive dans les neurones et les poumons ; elle intervient dans le maintien du niveau basal en NO et comme source de NO neuromédiateur, et est dépendante de la voie Ca²⁺/CaM

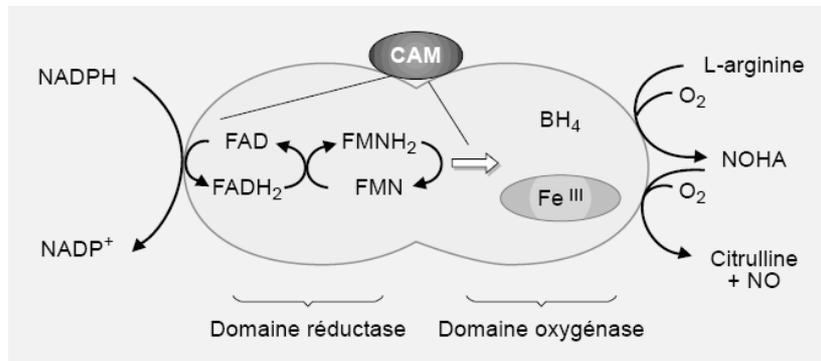


Fig. 40 : Biosynthèse de NO
 (adapté de Sennequier N. et Vadon-Le Goff S., 1994)

- la NOS inductible (iNOS ou NOS II), indépendante de la voie Ca^{2+}/CaM , principalement exprimée par les macrophages mais aussi dans les cellules cancéreuses (Blaise G. A. et al., 2005) ; elle est induite par l'effet des cytokines (TNF α , IL) sur la synthèse et la stabilité de l'ARNm ;
- la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III), qui est exprimée de manière constitutive dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires du cœur et les neurones pyramidaux de l'hippocampe, est simulée par la voie Ca^{2+}/CaM ; c'est la seule qui peut s'accrocher à la membrane cellulaire car celle-ci possède des résidus acides gras liés de façon covalente à sa séquence.

Même si ces appellations et localisations associées semblent restrictives, il est fréquent qu'une cellule exprime plus d'une isoforme, chacune pouvant se retrouver dans un grand nombre de tissus (Fig. 41). L'existence d'une quatrième isoforme présente dans les mitochondries a été évoquée mais la quantité d'informations à disposition n'est pas encore suffisante. Ces isoformes ont une similarité de plus de 50% entre elles, qui présentent également une similitude structurelle avec les cytochromes P450 qui sont également des enzymes d'oxydation. Il est important de préciser que les niveaux de NO produits par NOS I et NOS III sont environ 100 fois inférieurs à ceux dont NOS II est responsable après induction par des stimuli extérieurs, et que NO lui-même est capable d'inhiber les NOS en se fixant transitoirement à l'atome de fer.

Nous allons donc aborder les principaux rôles physiologiques du monoxyde d'azote produit par les NOS, et les applications pharmacologiques qui en découlent.

2. Principaux effets physiologiques

Ces différentes isoformes possèdent chacune plusieurs rôles physiologiques, qui peuvent nécessiter des intermédiaires différents ou le déclenchement de diverses cascades de signalisation :

NOS I	NOS II	NOS III
Neurotransmetteur Protection du tractus gastrointestinal Correction de la dysfonction de l'érection Relaxation des sphincters	Réponse immunitaire non spécifique Réponse inflammatoire	Régulation de la pression sanguine Inhibition de l'agrégation plaquettaire

Le messager le plus important qui médie le plus souvent les effets du NO est le 3'-5'-guanylate monophosphate cyclique ou GMPc : NO active la guanylate cyclase (par liaison entre le NO et le noyau hème de cet enzyme) et permet ainsi la synthèse de GMPc à partir de guanosine triphosphate (GTP) (Ma X. et al., 2007). GMPc joue surtout un rôle dans la relaxation des muscles lisses, l'agrégation plaquettaire ainsi que la neurotransmission ; cependant, il n'est pas systématiquement impliqué dans chacune des fonctions reportées ci-dessus.

Isoforme	Organe / Tissu	Cellules
NOS-I	Cerveau, système nerveux périphérique Rétine Poumon Pancréas Rein Endomètre Estomac	Neurones Cellules photoréceptrices Cellules épithéliales Ilôts de Langerhans Macula Densa Epithélium colonnaire Muqueuse gastrique
NOS-II	Système immunitaire Os Foie Vaisseaux sanguins Cerveau Sang	Macrophages, lymphocytes, neutrophiles Ostéoblastes Cellules de Küpffer, hépatocytes Cellules musculaires lisses Cellules macrogliales et microgliales Plaquettes
NOS III	Vaisseaux sanguins Cerveau : hippocampe, cervelet, bulbe olfactif Sang Coeur Poumon (pendant 15 jours après la naissance) Rein	Endothélium Cellules pyramidales Plaquettes Myocytes Cellules épithéliales alvéolaires Cellules épithéliales tubulaires

Fig. 41 : Localisation des isoformes de NOS
(adapté de Sennequier N. et Vadon-Le Goff S., 1994)

a) Rôle au niveau de la circulation sanguine

Le NO a été découvert par son action sur la relaxation artérielle, et NOS III est aujourd'hui reconnue comme la principale enzyme intervenant dans la régulation de la pression sanguine. Le NO produit à ce niveau va avoir principalement deux actions : l'inhibition de l'activation des plaquettes et des leucocytes, ainsi qu'une vasorelaxation par l'intermédiaire du GMPc (Fig. 42).

(a) Effet de NO sur les cellules musculaires lisses

Il n'y a pas à proprement parler de récepteur pour le NO. Il va exercer son action directement sur la guanylate cyclase.

Il existe plusieurs mécanismes d'activation pour NOS III (oestrogènes, ATP...) mais le plus important est la simple activation par stress mécanique dû au flux sanguin, qui fait pression sur les cellules endothéliales. Il en résulte qu'à chaque battement cardiaque, une faible quantité de NO va être libérée et va exercer son action vasodilatatrice (Boo Y. C., Jo H., 2003) par catalyse de la guanylate cyclase produisant le GMPc.

Dans le cas des mécanismes de vasodilatation, ce médiateur peut avoir plusieurs fonctions. Tout d'abord, l'induction de la protéine kinase G, qui va phosphoryler les résidus tyrosine et sérine de certaines protéines et ainsi modifier leurs activités (Münzel T. et al., 2003) : elle inhibe en particulier la protéine kinase Rho A dont le rôle est la phosphorylation de la myosine, elle même favorisant l'action de l'actine qui va permettre la contraction musculaire (Fig. 43). De plus, NO va favoriser la phosphorylation des canaux calciques (BK_{Ca}) ce qui va avoir un important effet décontractant pour les cellules musculaires lisses. Ce sont les deux principales voies d'action par lesquelles NO va pouvoir exercer son effet vasodilatateur.

(b) Effet sur les plaquettes

NO est capable de diffuser à courte distance dans la circulation sanguine et peut donc avoir une influence sur les plaquettes situées en surface du vaisseau, qui expriment elles-mêmes NOS III.

Il semble que l'action de NO sur les plaquettes passe par la phosphoprotéine sensible à la vasodilatation (Vasodilator Sensitive Phosphoprotein, VASP), qui est indispensable à l'adhésion via la polymérisation de l'actine. Ceci passe probablement par GMPc (Wanstall J. C. et al., 2005). Lors des phases d'agrégation plaquettaire, un grand nombre de médiateurs, dont le NO, sont libérés pour moduler cette phase : ici le rôle de NO semble être de limiter cet agrégat à la taille suffisante pour couvrir les dégâts aux vaisseaux sans se propager de manière extensive sur les cellules saines (Radomski M. W. et al., 1990).

b) Effet sur le tractus gastro-intestinal

L'importance de NO dans la protection du TGI est bien établie (Wallace J. L. et al., 2000). Il est intéressant de constater que l'influence de NO à ce niveau recoupe celle des prostaglandines, ce que la recherche thérapeutique s'est empressé d'utiliser : modulation de l'activité des immunocytes des muqueuses, réduction des interactions d'adhérence entre les leucocytes et l'endothélium, augmentation du flux sanguin, diminution de la perméabilité, stimulation de la production de mucus et de bicarbonate particulièrement (Boughton-Smith N. K. et al., 1990). De plus, NO participe à la défense de la muqueuse gastrique par son action cytotoxique que nous développerons plus tard.

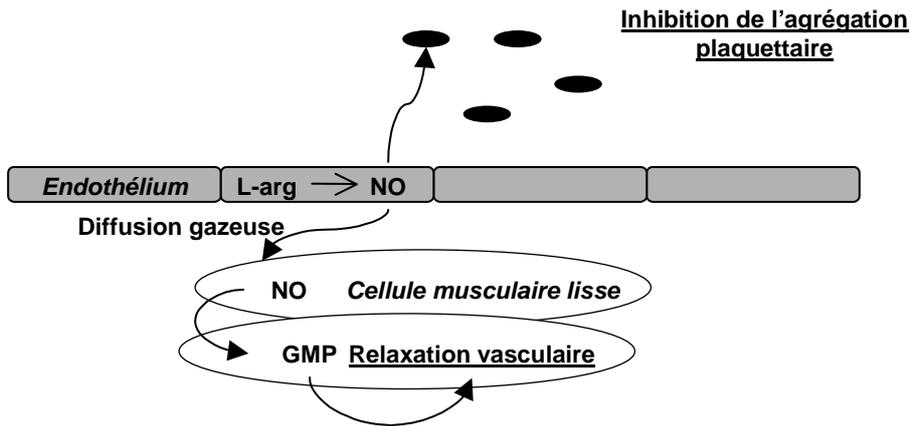


Fig. 42 : Action du NO produit par les cellules endothéliales

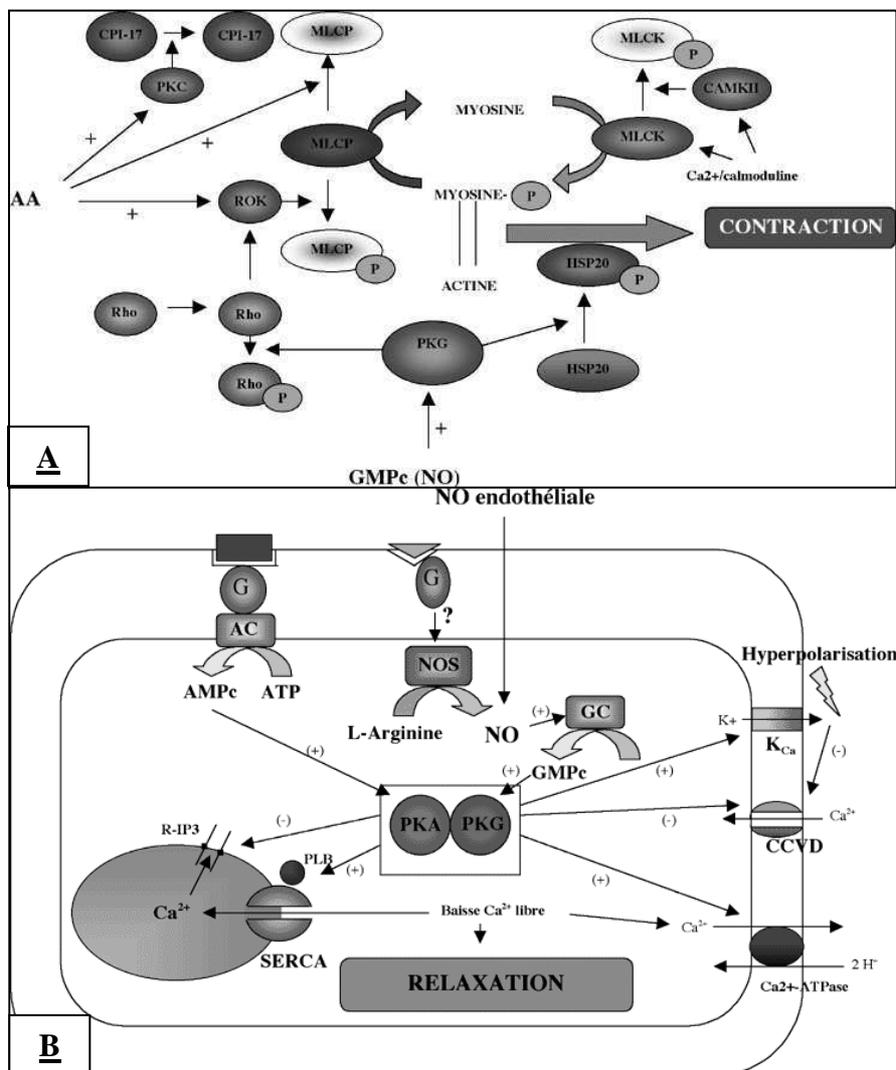


Fig 43 : Contraction (A) / Relaxation (B) de la cellule musculaire lisse et rôle du NO (adapté de Frayon S. et al., 2005)

Dans le cas d'une inflammation de la muqueuse gastrique, les rôles de NO sont plus débattus, principalement à cause des réactions possibles avec l'oxygène pour former des peroxynitrites, qui ont un fort pouvoir inflammatoire. Cependant, il a été montré que la libération progressive et prolongée de monoxyde d'azote en cas d'inflammation du TGI permet de réduire de manière importante l'étendue du dérèglement (Wallace J. L. et al., 1999).

Il est important de noter ici qu'en cas de blocage de l'action de NO, les NOS sont capables de produire d'autres espèces réactives telles que l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ engendrant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Vasquez-Vivar J., 2003) qui peuvent selon la quantité avoir des effets similaires ou non à la production de NO classique.

c) *NO et ses réactions in vivo*

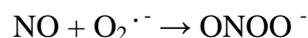
(a) NO et les protéines

Comme nous l'avons abordé précédemment, NO est capable de réagir sur les protéines, comme par exemple se lier avec l'hème qu'elles peuvent contenir. Dans certains cas, NO peut également se lier de façon covalente avec les thiols en faible quantité : sur un récepteur ou un canal calcique par exemple, ceci peut conduire à son activation (Fig. 44). Le mécanisme réactionnel est encore discuté (bien qu'on suppose des réactions préalables du NO engendrant l'apparition des différents intermédiaires de réactivités variables), tout comme l'importance de la présence (physiologique ou pathologique) de ces intermédiaires. Il est néanmoins vraisemblable que cette réaction ait un impact sur l'activité des protéines touchées, en particulier sur le transport de l'oxygène par l'hémoglobine (Gow A. J., Stamler J. S., 1998). En effet, de plus en plus de données semblent indiquer que la S-nitrosylation des protéines constitue une voie de signalisation à part entière, basée sur des réactions redox, dont la dérégulation pourrait conduire à des dysfonctionnements cellulaires importants (Foster M. W. et al., 2003). C'est le type de mécanisme impliqué dans la relaxation des cellules musculaires lisses induite par l'acétylcholine. De plus, dans la relaxation endothélium-dépendante, un grand nombre de protéines des différentes cellules influant sur la circulation peuvent voir leur activité modifiée par addition de NO sur une cystéine (Gow A. J. et al., 2002). Ceci n'est qu'une partie des rôles que peut avoir la nitrosylation des protéines.

A une plus grande échelle, la S-nitrosylation de certaines protéines circulantes permet le relargage de NO dans différents organes et tissus en complément d'une production locale, ou comme apport unique si le tissu ou compartiment ne dispose pas de NOS, permettant à NO d'agir comme messenger à distance ou encore comme contrôle de l'activité des dites protéines.

(b) Espèces réactives de l'oxygène, espèces réactives de l'azote

La formation et la présence d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules sont bien connues, et comme elles sont potentiellement toxiques, l'organisme peut et doit les prendre en charge et les dégrader en particulier par l'action de la superoxyde dismutase (SOD). La cinétique de cette métabolisation est cependant environ quatre fois plus lente que la réaction de $O_2^{\cdot-}$ avec NO qui va donner un produit extrêmement toxique et responsable d'un grand nombre d'effets attribués au NO, le peroxynitrite (Beckman J. S. et al., 1990).



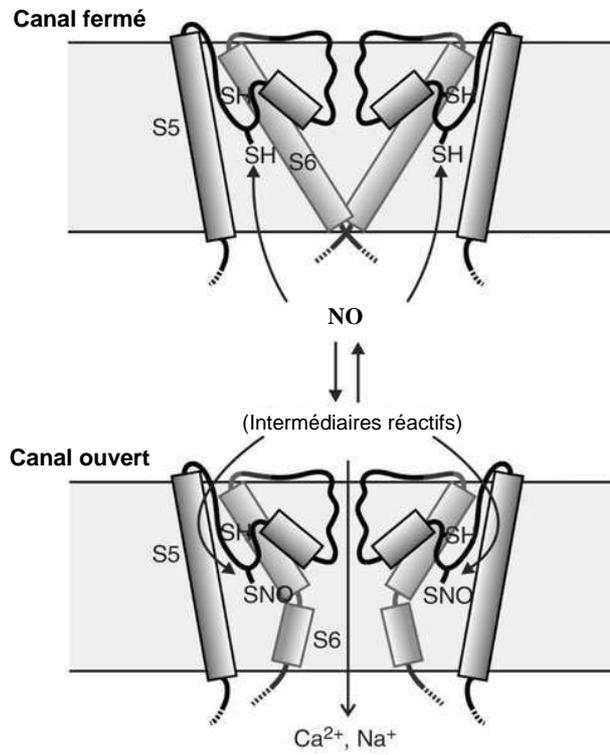
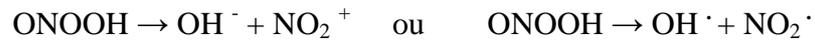


Fig. 44 : Activation d'un canal calcique par fixation de NO sur une cystéine du canal
 (adapté de Yoshida T. et al., 2006)

Cette espèce peut se dégrader très rapidement en deux composés très différents mais potentiellement dangereux.



d) Activité de la NOS II présente dans les macrophages

L'exposition des macrophages, des cellules NK et des neutrophiles à des microorganismes d'origine extérieure conduit à la réaction immunitaire. Une part de cette réaction consiste en l'activation de la NOS II, qui va produire une grande quantité de NO, ce qui va en parallèle engendrer une importante quantité d'anions superoxydes. Parmi les mécanismes d'action proposés, on retrouve la S-nitrosylation conduisant à une désactivation des enzymes de réparation ou de réplication, ou encore la formation de peroxy-nitrites qui vont pouvoir détruire les cellules cibles, même si certains organismes, comme la Salmonelle ont développé des résistances à ce type de défense (Nathan C. F., Shiloh M. U., 2000 ; Tripathi P. et al., 2007). Il faut noter que différents systèmes de feedback existent pour NOS II : en particulier, un faible taux de NO à proximité des macrophages [typiquement induit par les cytokines (Liew F. Y. et al., 1997)] va stimuler NOS II ; des quantités trop importantes pouvant quant à elles conduire à l'inhibition de cette enzyme (Green S. J. et al., 1994 ; Appleton I. et al., 1996).

En plus de ces effets sur les corps étrangers, le NO a une action sur les cellules du système immunitaire, en particulier en recrutant des leucocytes tout en favorisant la production d'anticorps (Bogdan C., 1997).

Il faut noter qu'une réaction exagérée à ce niveau provoque en plus une vasodilatation pouvant faciliter l'apparition de pathologies plus graves comme les septicémies.

e) Effet du NO produit par nNOS

NO peut être libéré dans la fente synaptique par NOS I pour véhiculer l'information, et possède un intérêt certain par rapport à d'autres neurotransmetteurs : de par sa nature, il peut diffuser et toucher plusieurs neurones voisins simultanément, voire même différents tissus (vaisseaux, ...) et ainsi accélérer le transfert d'informations. Il est également responsable de la plasticité des neurones (Bicker G. 2005). Cependant, NOS I n'est exprimé que par quelques pourcents de neurones, et est généralement activée consécutivement à l'activation du récepteur NMDA (Garthwaite J., Boulton C. L., 1995). La relation entre les concentrations en NO et en glutamate est extrêmement importante, NO semblant avoir un effet dose dépendant sur la libération de ce transmetteur (Sequeira S. M. et al., 1997). Ceci pourrait avoir une influence notamment sur le fonctionnement de la mémoire (O'Dell T. J. et al., 1994).

Le NO ainsi produit exercera une très vaste influence sur quasiment tous les types de neurotransmetteurs (voir la review de Guix F. X. et al., 2005) : effet dose dépendant pour GABA et le glutamate (Getting S. J. et al., 1996), libération de noradrénaline (Feldman S., Weidenfeld J., 2004), de sérotonine (Kaehler S. T. et al., 1999), d'adénosine [également par activation du récepteur NMDA (Saransaari P., Oja S. S., 2004)], diminution de la libération d'histamine dans l'hypothalamus (Prast H. et al., 1996)

En plus, il semble que NO soit capable d'augmenter la survie neuronale, notamment en cas d'ischémie temporaire (Thippeswamy T., Morris R., 1997). Ceci a permis de s'apercevoir que moduler l'action de NOS I permettait d'influencer l'apoptose des cellules neuronales. Par la suite, le rôle de NO dans de nombreuses maladies neuro-dégénératives a été mis en évidence. En effet, une surproduction locale de ce radical [par exemple à cause d'une

suractivation de nNOS (Chabrier P. E. et al., 1999)] pourrait le faire passer de neuromédiateur à neurotoxique rapidement. Dans ce cas, le plus grand danger proviendrait de la production engendrée d'espèces radicalaires réactives du type peroxynitrites, et conduirait à des pathologies telles que les maladies d'Alzheimer (Tran M. H. et al., 2003), de Parkinson (Torreilles F. et al., 1999) ou encore la sclérose en plaques dans laquelle la iNOS jouerait également un rôle (Kahl K. G. et al., 2003).

B - ROLE DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LE CANCER

L'influence de NO sur la progression tumorale a d'abord été constaté sur l'apoptose cellulaire, mais des études plus poussées ont pu mettre en avant le rôle de ce médiateur dans plusieurs aspects du processus tels que la survie, la prolifération cellulaire et l'invasion : sur les cellules saines, l'oxyde nitrique peut avoir une action cancérogène. Une fois la tumorigenèse enclenchée, ce radical peut avoir une influence sur l'angiogenèse mais également sur les cellules cancéreuses comme modulateur de l'apoptose.

Il est doré et déjà important de noter l'importance du taux de NO à proximité de ces cellules. La quantité grandissante de littérature à disposition sur ces sujets fait de plus en plus état d'un impact dose dépendant de cette molécule sur tous les facteurs qu'elle peut toucher ; ceci n'étant pas uniquement dû à sa nature particulière.

1. NO et cancérogenèse (Fig. 45)

Nous avons vu que lors de la réponse immunitaire, une quantité importante de NO peut être libérée. En cas de présence de grandes quantités d'oxygène, ces espèces réactives type peroxynitrites peuvent se former in situ et endommager les cellules saines voisines, en endommageant leur ADN et leur ARN (Xu W. et al., 2002). Par exemple, les peroxynitrites peuvent s'attaquer au squelette du simple brin d'ADN, ou encore oxyder et nitrer ses bases. Une des plus fréquentes modifications est la modification d'une paire G : C vers une paire A : T (Zhuang J. C. et al., 2000). L'oxydation particulière d'une guanine en C8 provoque la transversion G : T qui est fréquemment retrouvée dans un certain nombre de différents cancers (Fig. 46) (Klaunig J. E., Kamendulis L. M., 2004). Ceci est fréquemment appelé le stress oxydant.

Dans une situation normale, ces altérations de l'ADN devraient être reconnues et prises en charge par l'enzyme Poly-ADP Ribose Polymérase (PARP) qui doit arrêter la réplication lors des phases de mitoses en présence d'ADN modifié, et déclencher la cascade de réparation des bases modifiées. Le NO est capable de désactiver de façon irréversible les enzymes impliqués dans ces deux étapes, en particulier les enzymes de réparation de type « doigt de zinc » (Wink D. A., Laval J., 1994) principalement par S-nitrosylation des cystéines.

Une voie indirecte de dégradation du patrimoine génétique cellulaire est la réaction des espèces activées de l'azote avec les thiols, amines et lipides présents naturellement dans les cellules. La réaction de N_2O_3 avec les amines par exemple débouche sur la formation de nitrosamines qui sont des cancérogènes connus, en particulier à cause de leur métabolisation en alkylants électrophiles qui peuvent réagir avec l'ADN et induire des transitions G : A (Marnett L. J., Burcham P. C., 1994).

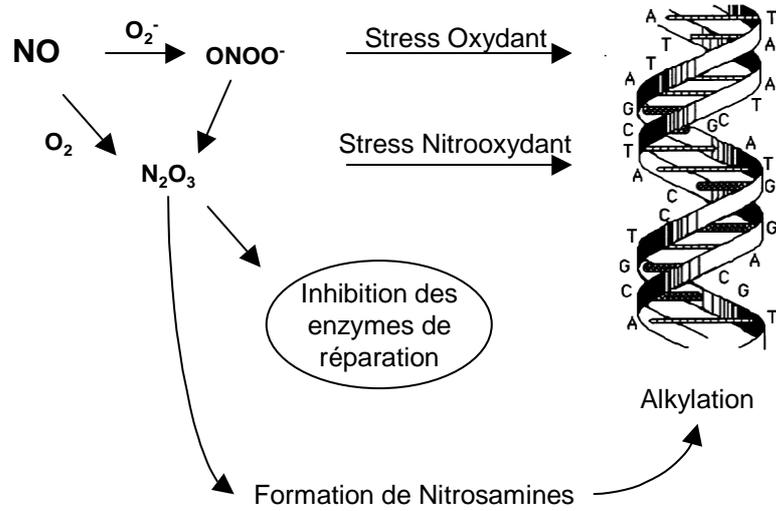


Fig. 45 : NO et cancérogenèse
 (adapté de Wink D. A. et al., 1998)

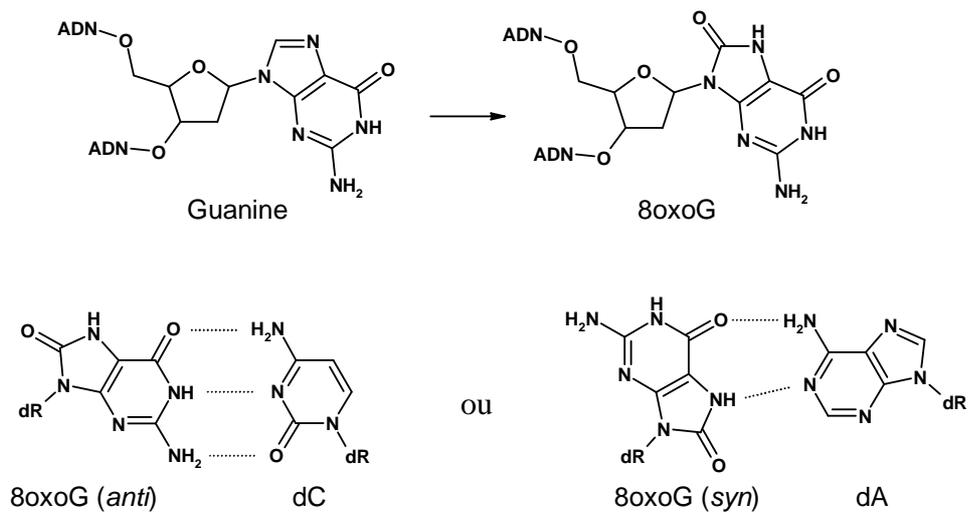


Fig. 46 : Transversion des bases de l'ADN par modification de leurs interactions

2. NO et angiogenèse

Le VEGF est un des principaux médiateurs du processus d'angiogenèse tumoral, et sa cascade de signalisation peut déboucher sur le NO qui joue alors le rôle de promoteur de croissance des néovaisseaux, en particulier par les propriétés sur les cellules endothéliales (prolifération et mobilité) du NO produit par NOS III, à taux basal (soit environ 10 nmol/L). En revanche, une forte concentration de NO produite par les macrophages (>300 nmol/L) va conduire à la phosphorylation de p53 des cellules endothéliales, et donc à l'arrêt de leur prolifération. C'est par exemple le cas lors d'épisodes inflammatoires importants (Roberts D. D. et al., 2007). On peut donc constater un effet dose dépendant du NO déjà au niveau de l'angiogenèse.

Il est important de noter que les cellules cancéreuses elles-même peuvent produire du NO dans le but de conserver un taux basal à proximité de la tumeur pour y « attirer » ces cellules endothéliales et ainsi entamer un processus de croissance de néovaisseaux.

3. NO et apoptose (Fig. 47)

C'est à ce niveau que le NO exerce son rôle le plus important, mais également le plus controversé. En effet, NO est à la fois pro- et anti-apoptotique, avec un effet dose dépendant marqué et fluctuant selon son environnement redox.

Nous ne mentionnerons pas ici tous les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sur l'ADN abordés précédemment, bien qu'il soit évident qu'ils jouent un rôle dans la mort cellulaire.

a) NO et la mitochondrie

La production cellulaire de NO par les NOS se fait généralement dans le cytoplasme (NOS I et II) ou sur la face interne de la membrane plasmique. Lorsque la diffusion de ce gaz le permet, il arrive qu'une partie du NO ainsi produit atteigne la mitochondrie où il va avoir plusieurs effets.

Nous avons déjà abordé la liaison facile entre NO et le fer d'un hème, et les protéines de la mitochondrie ne font pas exception. Dans ce cas, cette liaison va aboutir à une inhibition de ces enzymes servant principalement à la respiration et à la fabrication d'ATP : un afflux important de NO dans la mitochondrie conduirait donc potentiellement à l'asphyxie de la cellule.

De plus, NO et le peroxy-nitrite sont capables d'inhiber la SOD : ceci va conduire, à l'intérieur de la mitochondrie, à une accumulation d'espèces radicalaires et à l'auto-entretien de leur formation.

En parallèle de ces actions directes sur le métabolisme de la mitochondrie, le NO est capable de procéder à l'ouverture du mégacanal mitochondrial et de libérer par cette voie certaines molécules impliquées dans l'apoptose comme le cytochrome c. Ceci débouche sur l'activation de certaines caspases, dont la caspase 3 qui est pro-apoptotique. De plus, l'ouverture du canal déclenche une libération de calcium, ce qui va faire s'effondrer le potentiel membranaire de la mitochondrie et déclencher l'apoptose (Hortelano S. et al., 1997).

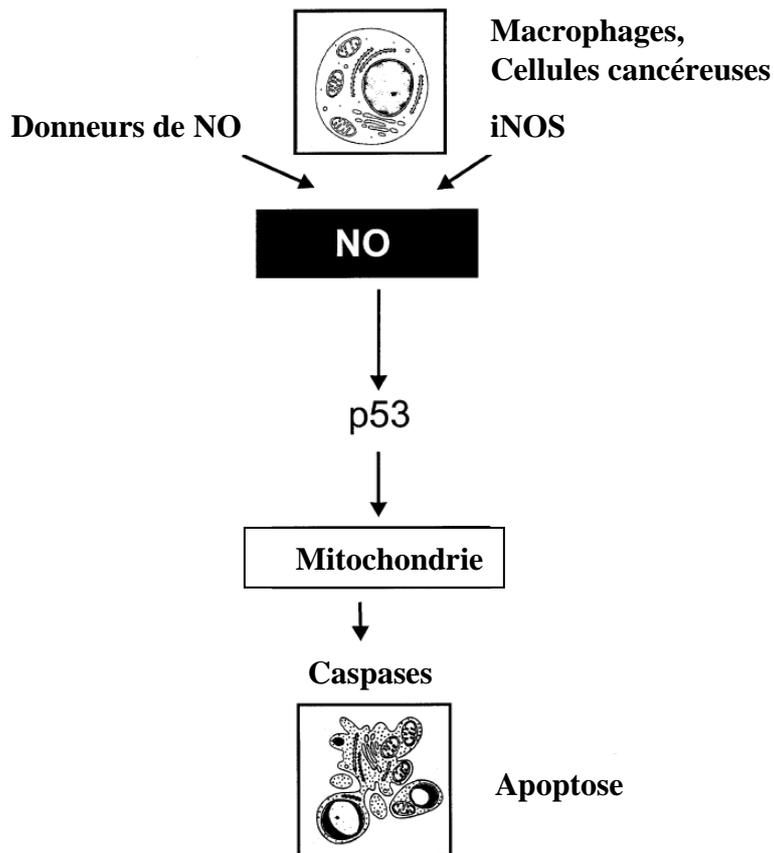


Fig. 47 : Condensé des voies d'actions du NO dans l'apoptose

L'effet sur le mégacanal est dose dépendant : certaines études ont montré qu'à doses physiologiques, NO inhibait cette même ouverture (Brooke P. S. et al., 2000).

b) NO et la p53

NO conduit dans divers cas à une expression précoce du gène suppresseur de tumeur p53, qui sera potentiellement entretenue car le gène promoteur de eNOS possède un domaine de liaison pour p53. Cette expression résulte en partie des dégâts causés à l'ADN par ce radical.

Il a été montré que l'influx de p53 déclenché par NO a pour conséquence une diminution de la production de Bcl-2, la libération de cytochrome c et l'activation des caspases (Brockhaus F., Brune B., 1999) ainsi qu'une augmentation de l'expression de Bax. En revanche, dans le cas d'une p53 mutée, il semble que la production de NO par iNOS favorise la prolifération cellulaire (Ambs S. et al., 1998).

c) NO et la voie PI-3 kinase / Akt (Fig. 48)

Il est important de noter que concernant l'apoptose, NO joue également sur la voie PI-3K/Akt, et ce de deux façons. Tout d'abord, certains suggèrent une activité de NO sur NF- κ B avec ici aussi un effet dépendant de la concentration (Glockzin S., et al., 1999). De plus, Akt peut phosphoryler NOS III et ainsi stimuler son activité catalytique (Dimmeler S. et al., 1999). On peut donc conclure que la voie Akt peut agir sur les concentrations de NO, et ainsi utiliser cette voie pour moduler les signaux apoptotiques.

d) NO et les caspases (Kim P. K. et al., 2002)

Ici encore, NO et ses « dérivés » peuvent avoir deux rôles dans la voie de signalisation des caspases et en modifier les propriétés enzymatiques, de façon directe ou indirecte. Ceci dépend en grande partie des tissus et des types de cellules étudiés.

La plus grande partie des travaux justifiant une activité de stimulation des caspases a été réalisée avec des composés chimiques pouvant libérer du NO, ce qui résulte en une quantité bien supérieure à celle pouvant être présente physiologiquement. Par exemple, sur des cellules HL-60, l'apport de NO conduit à une augmentation de l'activité des caspases-3 pro-apoptotiques (Yabuki M. et al., 2000). Il faut noter que l'activation des caspases par NO conduisant à l'apoptose est indirecte, NO ne semblant pas se lier à l'enzyme.

Concernant l'inhibition des caspases, il semble ici que NO exerce un effet direct qui serait un des modes d'action anti-apoptotique majeurs de ce radical. Utilisé seul sur des caspases isolées, NO a déclenché une diminution voire une inactivation de leur activité enzymatique (Li J. et al., 1997) ce qui est probablement dû à une S-nitrosylation d'un ou plusieurs acides aminés, en particulier la ¹⁶³Cys dans le cas de la caspase-3 (Maejima Y. et al., 2005). Cette nitrosylation serait fréquente avec un taux basal de NO, alors qu'une plus forte concentration (typiquement due à iNOS) dans certaines lignées cellulaires conduirait à la dénitrosylation par activation d'autres enzymes de réparation (Petit J. F. et al., 1996).

e) Mécanismes GMP dépendant ?

Nous avons évoqué précédemment la grande affinité de NO pour le fer des noyaux hème, en particulier celui des guanylates cyclases. Dans plusieurs types de cellules, la production de GMPc va avoir un effet anti-apoptotique par plusieurs voies de signalisation dont la voie des caspases. L'importance de la voie du GMPc dans la modulation de l'apoptose par NO a été montrée par l'étude de modèles comportant un donneur/bloqueur de NO et un

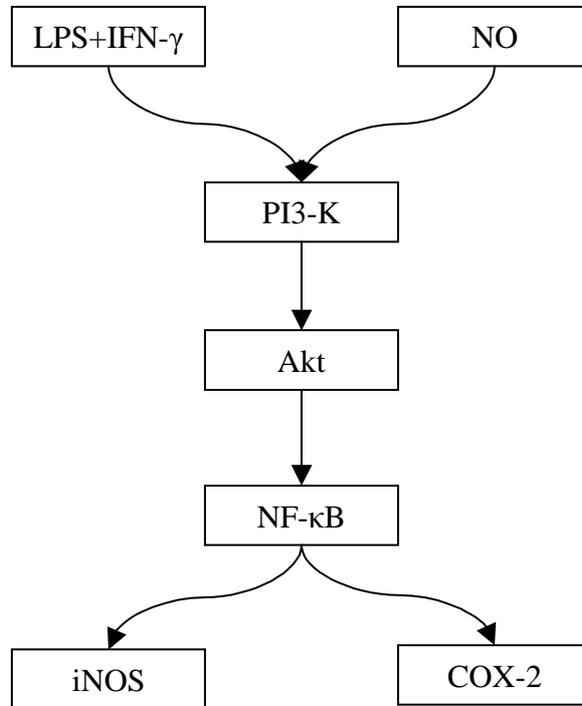


Fig. 48 : NO et la voie PI3-K / Akt
(adapté de Sheu M. L. et al., 2005)

bloqueur/analogue de GMPc (Kim Y. M. et al., 1999). La production de GMPc va notamment avoir une action sur la voie PI3K/Akt (Ha K. S. et al., 2003).

D'autres médiateurs sont néanmoins possibles et ont été trouvés de la même manière (Shen Y. H. et al., 1998). En particulier, la voie céramide – caspase peut être régulée par NO (Lièvremon J. P. et al., 1999) ce qui va déboucher sur la modulation de l'apoptose induite par le TNF- α .

4. NO et invasion (Xie K., Huang S., 2003)

Le rôle de NO dans la formation des nouveaux vaisseaux évoqué précédemment est déjà une part de son influence dans le phénomène métastatique lié au développement de la pathologie cancéreuse, les néovaisseaux étant plus « poreux ». D'autre part, l'activité de NOS II dans les macrophages constitue un frein à la progression de la pathologie, en particulier à la formation de métastases par utilisation du système immunitaire lorsque cela est possible. De même, le NO produit par les cellules endothéliales est suspecté avoir une action cytotoxique sur les cellules tumorales qui se seraient échappées dans la circulation sanguine, même si les mécanismes ne sont pas encore entièrement élucidés (Li L. M. et al., 1991). Il s'agirait ici de diffusion chimique depuis la paroi endothéliale jusqu'à la circulation, pour toucher les cellules cancéreuses s'échappant dans la circulation sanguine. Enfin, certaines études (Lala P. K., Orucevic A., 1998) montrent que NOS III est fortement exprimé dans les cellules métastatiques : un taux basal en NO semble donc jouer un rôle dans la survenue et la survie de ces nouveaux foyers.

Tous ces points montrent bien que NO est un médiateur bivalent dans les mécanismes du cancer, et en particulier dans l'apoptose cellulaire. Bien que les efforts concernant l'élucidation de toutes les voies d'action du NO sur le cycle cellulaire et la progression tumorale doivent se poursuivre, il semble acquis que les effets de cette entité radicalaire seraient doses-dépendants. Ceci conduit à penser que l'utilisation pharmacologique de NO dans le cas d'une pathologie cancéreuse est envisageable, dans la mesure où les doses apportées seront bien supérieures au taux basal qui peut être promoteur de tumeurs. Dans ce cas, une étude sur les effets antiprolifératifs « ponctuels » ainsi qu'une étude sur la pharmacocinétique, si possible en cas de prises répétées, devront être menées de front.

C - INTEGRATION DANS UN CONTEXTE D'INHIBITEUR ENZYMATIQUE : NO ET COX

1. Intérêt pharmacologique

D'après les données présentées ci dessus, il apparaît que le concept de molécules mixtes « inhibiteurs COX / donneurs de NO » peut en fait être considéré dans différentes pathologies et avec différents objectifs. C'est pour cette raison qu'il est important de noter en préambule que ces deux entités peuvent influencer l'une sur l'autre. Il existe un cross-talk entre les métabolites produits par les enzymes NOS et COX (Uno K. et al., 2004 ; Borda E. et al., 2007) mais les résultats des études menées sur ce cross talk sont bien souvent contradictoires.

a) Influence de NO sur la cyclooxygénase

In vitro, il a été montré que l'inhibition sélective de iNOS par l'aminoguanidine diminue la quantité de NO produite sur le site inflammatoire ainsi que celle de PGE₂ (Salvemini D. et al., 1993). Cet effet est réversible par simple addition de L-arginine dans le milieu de culture, reconduisant à la production de NO ainsi qu'à la production de PGE₂, ce qui suggère que la production de cette prostaglandine est dépendante de celle de NO. Si l'on cherche à augmenter la production de PGE₂, l'ajout d'un simple donneur de NO tel que le nitroprussiate de sodium ou la trinitrine dans le milieu semble efficace que ce soit sur cellule entière ou sur enzyme recombinante (COX-1) ce qui suggère un effet direct du radical sur l'enzyme sans passer par le GMPc : NO augmenterait la formation des prostaglandines par activation directe de PGHS. En revanche, il semble que NO soit capable de diminuer la formation de PGI₂ des cellules endothéliales (Doni M. G. et al., 1988).

Au niveau moléculaire, la modification de l'activité de la cyclooxygénase par la présence de NO semblerait due à la liaison du radical sur le fer de l'hème du site peroxidase de l'enzyme, de façon similaire à l'activation de la guanylate cyclase par NO. Cependant, plusieurs équipes avancent d'autres explications, comme la protection de l'enzyme par réaction de NO avec les radicaux libres pouvant être produits par l'activité enzymatique de COX ou une influence allostérique de NO sur l'enzyme (Stamler J. S., 1994) (Fig. 49).

Sur COX-2 particulièrement, NO apparaît comme ayant un effet dose dépendant : l'inhibition de la NOS résultant en l'absence de taux basal en NO dans le milieu, tout comme l'ajout en doses contrôlées (largement supérieures à ce taux basal) ont conduit à une nette diminution de l'activité de l'enzyme (Stadler J. et al., 1991). Ces observations *in vitro* ont été confirmées sur plusieurs modèles de l'inflammation *in vivo* (Sautebin L. et al., 1995a et b).

b) Influence des prostanoides sur les voies de signalisation du NO

Ici encore, les données sont assez vagues et contradictoires concernant l'influence des produits de métabolisation de la cyclooxygénase sur la cascade de signalisation de l'oxyde nitrique. Il semble néanmoins se dégager une action inhibitrice des prostaglandines sur la iNOS (Tetsuka T. et al., 1994). La raison invoquée est le plus souvent une modulation de la NOS par l'AMPC (Mullet D. et al., 1997 ; Galea E. et Feinstein D. L., 1999) (Fig. 50).

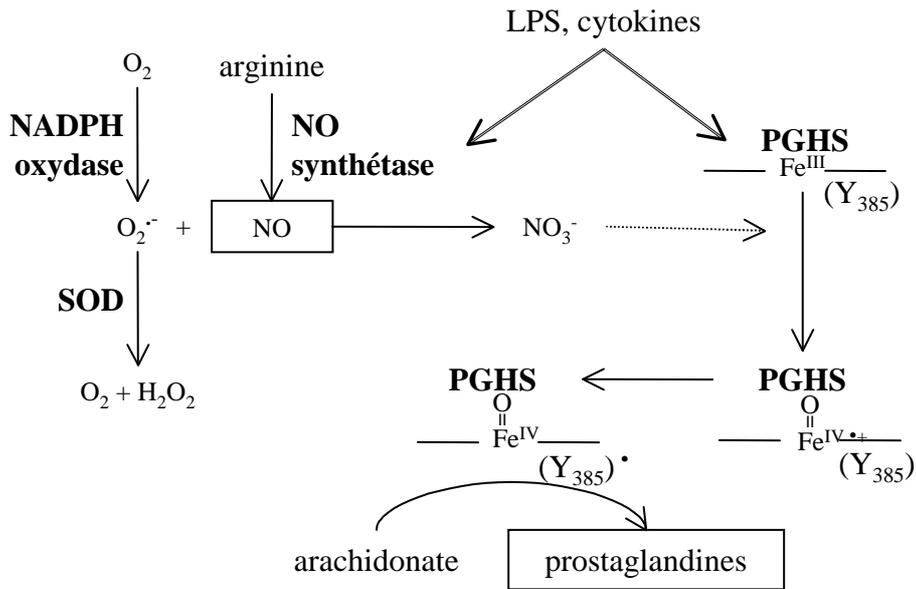


Fig. 49 : Rôle du NO dans la biosynthèse des prostaglandines
(adapté de Goodwin D. C. et al., 1999)

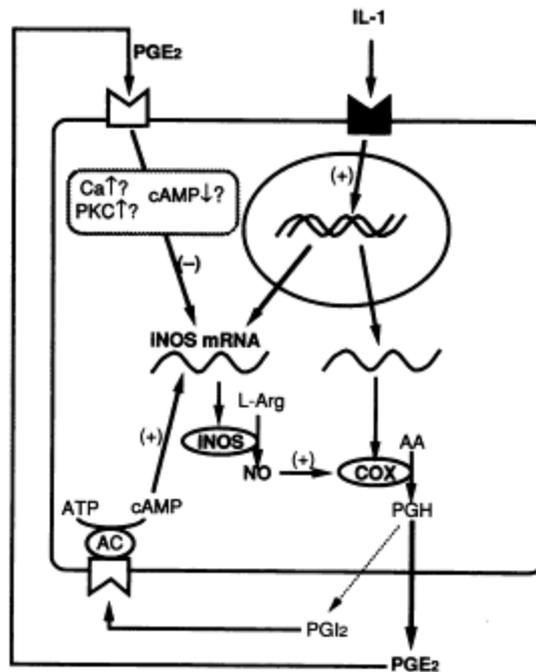


Fig. 50 : Implication de COX dans l'expression de iNOS
(adapté de Tetsuka T. et al., 1994)

En parallèle de l'action des prostanoïdes sur la voie de signalisation de NO, il est intéressant de rappeler que l'autre voie de métabolisation de l'acide arachidonique (par la lipoxigénase) conduit à des métabolites exerçant également une action sur cette cascade de signalisation (Hashimoto T. et al., 2003).

c) Inhibiteurs de cyclooxygénase, donneurs de NO et tractus gastro-intestinal

Dans un premier temps et suite aux effets secondaires importants des AINS sur le TGI, la recherche s'est orientée vers l'adjonction d'un composé permettant de pallier ces effets néfastes (Fig. 51). Les larges études menées sur les modèles animaux portant sur la protection des muqueuses du TGI lors de l'administration de composés mixtes donneurs de NO / AINS (NO-AINS) ont montré que bien que les propriétés anti-inflammatoires soient conservées, l'apparition d'ulcères est retardée voire inexistante. Ceci est dû au rôle que peut jouer NO dans la protection de ces muqueuses, à la fois comme régulateur de la perméabilité épithéliale et comme régulateur de l'adhésion des leucocytes (Kubes P., McCafferty D. M., 2000). Ces deux propriétés s'ajoutent bien sûr à la propriété fondamentale de vasodilatation de NO.

Etant des *prodrugs*, ces composés possèdent une cinétique de libération, qui va éviter l'afflux massif de l'inhibiteur de COX dans l'estomac. Ceci a été montré pour différentes doses d'administration chez le rat avec des dérivés de l'Aspirine et du Naproxène et contribue à la diminution des effets secondaires (Fiorucci S. et al., 1999).

d) Utilisation dans le cancer

Les NO-AINS développés dans le cadre de la recherche contre les effets secondaires gastriques des anti-inflammatoires ont vu leur intérêt renouvelé après que des essais aient montré leurs effets sur la prolifération de lignées cellulaires du cancer du côlon (Williams J. L. et al., 2001). En effet, bien que les effets des deux entités soient connus, les résultats obtenus laissent penser qu'une synergie d'action existe dans le cadre de cette pathologie. Par la suite, plusieurs équipes ont pu constater que l'influence de ces composés sur la prolifération n'était pas limitée aux seuls cancers du côlon, mais également à d'autres lignées cellulaires telles que celles issues de cancers du pancréas, de la prostate, du poumon et de la langue (Kashfi K. et al., 2002) ; certains composés donneurs de NO étant plus de 10 fois plus actifs que leur équivalent dépourvu du radical.

Ces données expérimentales, en plus des hypothèses pharmacologiques, montrent l'intérêt que le développement de ce type de thérapie peut revêtir dans le traitement de différents cancers.

2. Les inhibiteurs de cyclooxygénase / donneurs de NO ou CINOD (COX-Inhibiting Nitric Oxide Donor)

Comme nous l'avons reporté dans la partie du mémoire dédiée à la cyclooxygénase, cette enzyme présente deux isoformes d'intérêt pharmacologique. Les effets secondaires d'une inhibition non sélective de COX par les AINS conduit à des effets secondaires importants, dont la diminution a été le souci de la recherche anti-inflammatoire pendant longtemps. Une des méthodes envisagées a été l'obtention d'une sélectivité COX-2, qui a présenté ses avantages et ses inconvénients ; une autre méthode a été l'ajout d'une seconde entité

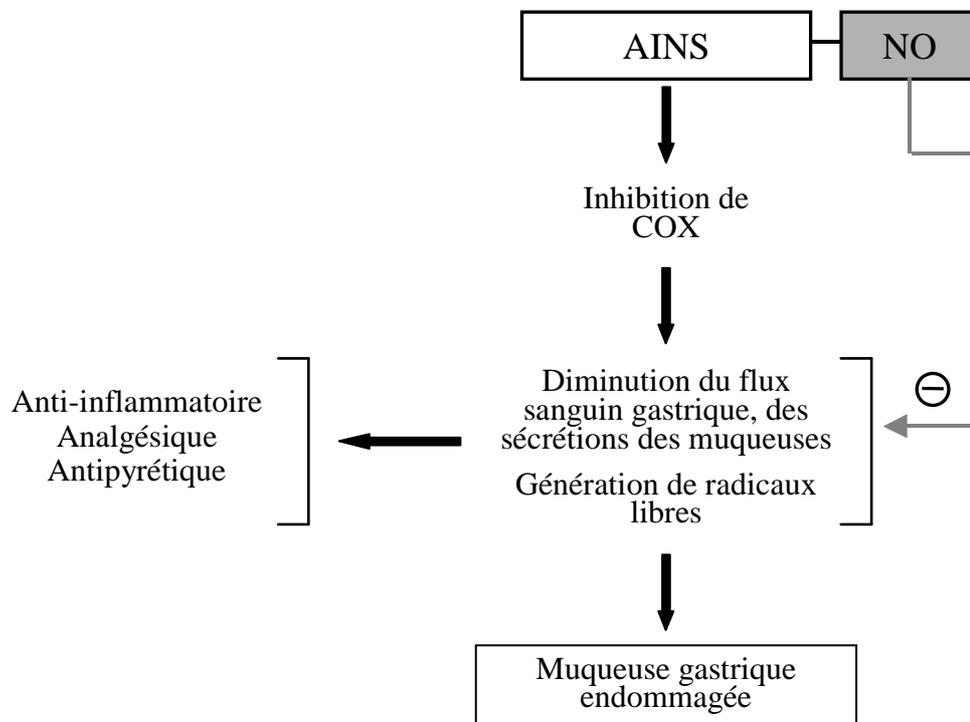


Fig. 51 : Rationalisation des NO-AINS

pharmacologiquement active à l'AINS (ou à l'inhibiteur sélectif COX-2) aboutissant à une molécule de type *prodrug*. Dans cette optique, le monoxyde d'azote a semblé dès le départ intéressant pour la protection de la muqueuse gastrique pendant la prise d'AINS. Ensuite, la recherche contre le cancer a pu s'apercevoir de la synergie d'action entre l'inhibition de COX et la libération de NO sur la croissance tumorale et ainsi se joindre à la recherche d'inhibiteurs sélectifs COX-2 / donneurs de NO.

a) *Association AINS et NO*

(c) NO-AINS : développement (Fig. 52)

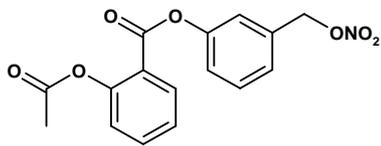
Les premiers développements de ces composés ont consisté en la fonctionnalisation des inhibiteurs de COX les plus connus, tels que l'aspirine, le diclofénac et le naproxène, par des groupements chimiques capables de libérer du NO. En dehors de la différence structurale évidente qu'entraîne cette modulation, une des premières modifications constatée entre le composé parent et celui modulé est la différence dans la pharmacocinétique : en effet, comme ces molécules nécessitent une ou plusieurs étapes de métabolisation, on peut constater un délai dans l'apparition du pic de concentration plasmatique. Ceci va participer à la différence d'activité (Wallace J. L. et al., 2002) en particulier dans la protection de la muqueuse gastrique. Encore maintenant, l'immense majorité des produits issus de cette recherche est au stade de l'évaluation clinique.

Type de composé mixte	Inconvénients *	Avancée des recherches et essais dans l'inflammation	Références
AINS avec ester nitrique	Effets à long terme non prouvés	Naproxcinod en phase 3 ; HCT1026 en phase 2	Schnitzer T. et al., 68 th ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, 2004
AINS avec nitrosothiol	Composés instables	Préclinique	Bandarage U.K. et al., 2000
AINS et furoxanes	Effets secondaires des furoxanes à évaluer	Préclinique	Lolli M.L. et al., 2001
AINS avec diazeniumdiolate (NONOates)	Libération spontanée in vivo de NO, effets secondaires des diazenium à évaluer	Préclinique	Velàsquez C. et al., 2007

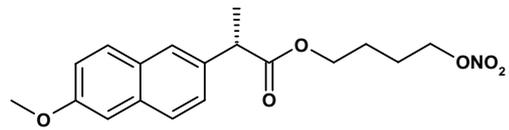
* Les avantages et les inconvénients respectifs des groupements donneurs de NO seront exposés en détail dans le chapitre présentant la conception de nos molécules.

Deux études cliniques de phase I ont pu d'ores et déjà confirmer que les NO-AINS (le NO-Aspirine et le Naproxcinod) (Fiorucci S. et al., 2003 ; Hawkey C. J. et al., 2003) étaient dénués d'effets gastriques, voire même dotés d'un effet gastroprotecteur malgré la conversion quasi-totale de la *prodrug* en AINS.

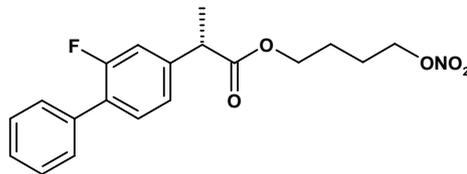
En phase II, dans le cadre du traitement de l'arthrite, la comparaison Naproxcinod et Naproxène n'a montré aucune différence dans le traitement de la pathologie. En revanche, le composé pourvu d'un groupement donneur de NO a ici encore épargné le tractus gastro-intestinal (Lohmander L. S. et al., 2005). Ceci a pu conduire le Naprox-CINOD en phase III, où ses effets sur les systèmes cardiovasculaire et rénal sont évalués (Drugs R&D, 2006). Les premiers résultats tendent à montrer un certain effet hypotenseur du composé 2 heures après



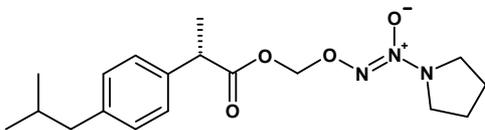
NO-Aspirine (NCX 4016)



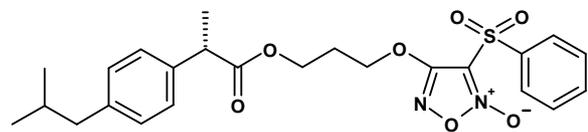
Naproxcinod (HCT 3012)



NO-Flurbiprofen
(HCT 1026)



NO-NO-ibuprofène



Ibuprofène-furoxane

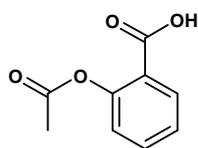
Fig. 52 : Exemples de NO-AINS en développement

la prise, résultat auquel on pouvait s'attendre au vu des propriétés du NO (Lohmander L. S. et al., 2005). Au niveau rénal, aucune vasodilatation ne devrait être constatée aux doses efficaces, la concentration dans cet organe devant logiquement être très faible (Huledal G. et al., 2005). De même, au niveau analgésique, une étude a pu confirmer l'efficacité du composé fonctionnalisé (Schnitzer T. J. et al., 20005).

(d) NO-AINS et cancer

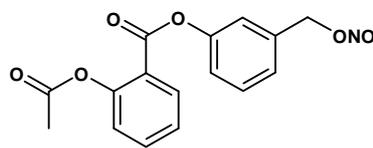
Les AINS donneurs de NO ont montré un certain potentiel dans la chimioprévention du cancer. Leurs effets en chimiothérapie sur des lignées cellulaires de plusieurs cancers (côlon, prostate, poumon, pancréas, langue) ont été montrés (Kashfi K. et al., 2002 ; Rigas B et Kashfi K., 2004).

Une étude plus poussée a été réalisée sur l'aspirine donneur de NO (NO-ASA) (Kashfi K., Rigas B., 2005a).



Aspirine : CI_{50} (LNCaP) = 4825 μ M

LNCaP : cellules cancéreuses prostatiques hormonodépendantes



NO-Aspirine : CI_{50} (LNCaP) = 0,7 μ M

Ce composé mixte a montré des propriétés anti-prolifératives sur des lignées cellulaires du cancer du côlon, pancréas, prostate, poumon, peau, sein et sur la leucémie, de l'ordre de 6000 fois plus importantes que celles de l'aspirine seule. Ces effets sont dus à l'influence du composé sur plusieurs aspects du cancer :

- progression tumorale : ce composé inhibe la prolifération cellulaire, induit l'apoptose, et bloque le cycle cellulaire à la transition G1 \rightarrow S
- signalisation cellulaire : en inhibant l'activation de NF κ B, et l'expression de NOS II (Fig. 48).

Tout ceci revient à cumuler, sur le plan de la prolifération aussi bien que sur celui de l'angiogenèse, les aspects bénéfiques des deux groupements composant la molécule dans la pathologie qui nous intéresse (Parinandi N. L. et al., 2007) : expérimentalement, on démontre un fort potentiel pour de futurs NO-AINS dans la chimioprévention et la chimiothérapie du cancer, en particulier celui de la prostate (Huguenin S. et al., 2004).

Il existe toutefois une polémique importante concernant ce type de composé, polémique se basant principalement sur des études poussées du rôle de chaque entité chimique composant ces aspirines donneurs de NO. En effet, plusieurs publications présentent des résultats opposés, et suggèrent des raisons différentes pour l'activité anti-proliférative exacerbée du composé mixte *versus* l'aspirine :

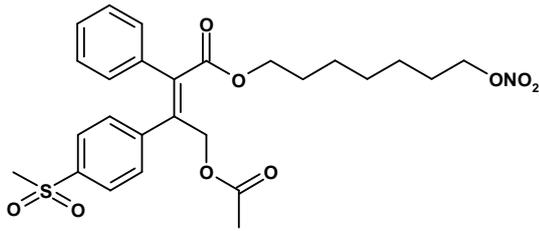
- voie différente de la voie COX-2 (Kashfi K., Rigas B., 2005b ; Hulsman N. et al, 2007)
- rôle prédominant de l'espèceur, qui serait un principe actif en lui-même (Kashfi K., Rigas B., 2007) par métabolisation en dérivé de quinone, générateur de radicaux libres en milieu biologique.

Dans ce contexte, il est évident qu'exemplifier les composés afin de disposer d'un champ d'étude plus large, et ainsi recouper des résultats négatifs comme positifs, est primordial pour la bonne compréhension de l'intérêt des NO-AINS dans la pathologie cancéreuse.

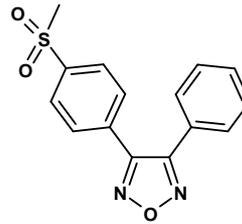
b) Sélectivité COX-2 et donneur de NO (Fig. 53)

Le Rofécoxib a été le premier inhibiteur sélectif COX-2 à être doté d'un groupement donneur de NO. Après de bons résultats (Engelhardt F. C. et al., 2006), le contexte (la mauvaise presse des Coxibs) a contraint les équipes travaillant sur le sujet à arrêter les recherches et à abandonner les évaluations cliniques en cours. Cependant, ces composés semblent prometteurs et certaines équipes continuent d'entreprendre la synthèse et l'évaluation de certains dérivés, principalement encore au stade de l'*in vitro* / modèle animal, certains possédant des groupements donneurs de NO novateurs (del Grosso E. et al., 2005 ; Velázquez C. et al., 2005). Il est envisageable que la vasodilatation que ce type de produits entraîne contrebalancerait les risques thrombotiques soupçonnés des inhibiteurs sélectifs COX-2.

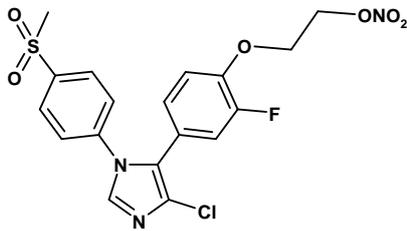
Il faut noter qu'au cours de la dernière année de notre travail, ce type de composés a fait l'objet d'un nombre important de publications, ce qui montre l'espoir suscité par leurs applications dont les plus importantes (Abdellatif K. et al., 2008 ; Wey S. J. et al., 2007 ; Chegaev K. et al., 2007) montrent la validité du concept dans le cadre de la conception d'anti-inflammatoires dénués d'effets secondaires.



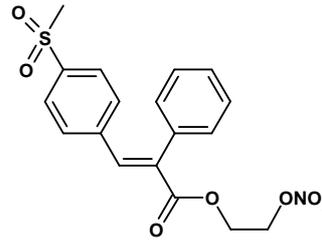
Prodrogue du Rofécoxib



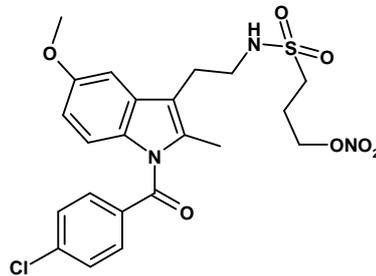
3-[4-(méthylsulfonyl)phényl]-4-phényl-1,2,5-oxadiazole
(Velázquez C. et al., 2005)



1,5-Diarylimidazole substitué par un nitrooxy
(Chegaev K. et al., 2007)



Biphényl d'acide acrylique portant une fonction nitrooxy
(Abdellatif K. et al., 2008)

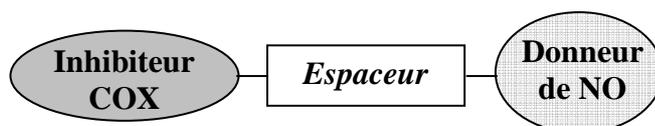


Dérivé sélectif COX-2 / Donneur de NO de l'indométhacine
(Wey S.-J. et al., 2007)

Fig. 53 : Principaux inhibiteurs sélectifs COX-2 donneurs de NO

D - CONCEPTION DE COMPOSES ORIGINAUX **INHIBITEURS DE CYCLOOXYGENASE DONNEURS DE NO**

L'objectif de ces travaux consiste donc en la conception, la synthèse et l'étude de molécules mixtes possédant deux parties fonctionnelles, l'une inhibitrice de COX et l'autre donneuse de NO. Il est nécessaire d'envisager un panel de composés important rendant possible à la fois l'étude de chacun de ces paramètres de manière la plus indépendante possible et d'évaluer leurs effets synergiques. Les deux parties « efficaces » de la molécule sont connectées par une liaison chimique appelée espaceur qui préserve la structure de base et l'activité de l'inhibiteur COX. Ceci conduit à une molécule tripartite du type :



Une structure de type mixte apporte plusieurs avantages notables observables dès les premiers tests pharmacologiques. Il est ainsi possible de tester les deux activités biologiques simultanément à des doses voisines, et d'étudier une éventuelle synergie. De la même manière, ceci rend l'étude des effets secondaires plus facile en la limitant à un seul composé. De plus, lors des essais cliniques, l'approche d'une molécule mixte apporte un confort certain pour les patients en diminuant la quantité de médicaments à prendre lors de chimiothérapies déjà lourdes.

Nous nous sommes basés sur les squelettes inhibiteurs de la COX que nous avons abordés dans les parties précédentes, en tentant de les moduler pour obtenir un composé final capable d'être métabolisé et de libérer ses deux entités actives que sont l'inhibiteur COX et le NO, tout en optant pour un espaceur le plus inactif possible au point de vue biologique. Il est important également dès cette étape de conception d'envisager les méthodes pour l'évaluation pharmacologiques, les *prodrugs* nécessitant souvent des procédures spécifiques de suivi de métabolisation.

Afin d'orienter nos synthèses, nous avons soigneusement relevé dans la littérature les différents groupements donneurs de NO et les différents espaceurs utilisés pour en connaître les principaux avantages et inconvénients. Cette étude préalable a également inclus les moyens (techniques analytiques, enzymatiques...) indispensables pour suivre la métabolisation nécessaire des composés mixtes synthétisés.

1. Les différents donneurs de NO

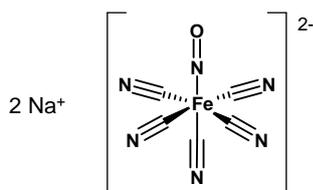
Il existe plusieurs groupements chimiques capables de libérer soit spontanément du NO, soit après une réaction chimique pouvant se produire *in vitro* / *in vivo* (Wang P. G. et al, 2002) soit après une dégradation spontanée en solution.

De par sa forme gazeuse instable, le traitement par le gaz NO n'est pas utilisé en dehors d'une hypertension localisée aux bronches (Griffiths M. J., Evans T. W., 2005) et chez les

nouveaux nés dans certains cas (Greenough A., 2000). Le grand problème est ici le temps de demi-vie du radical (quelques secondes) qui rend son utilisation par inhalation impossible au delà de la circulation sanguine des bronches. C'est pour cette raison que des donneurs de NO chimiques, dont le principe est de stabiliser le radical dans le temps, ont été développés.

a) Complexation du NO

Le meilleur exemple de complexation de NO à visée thérapeutique est le nitroprussiate de sodium (SNP) :



Ce complexe d'un ion ferreux avec 5 CN⁻ et un NO⁺ nécessite une réaction de réduction avant de pouvoir libérer le NO, réaction qui se déroule généralement avec un thiol avoisinant le site d'action (Bates J. N. et al., 1991 ; Grossi L., D'Angelo S., 2005), ou qui peut également résulter d'une action de la lumière (Harrison D. G., Bates J. N., 1993). Bien que la libération de NO entraîne celle de cyanure avec ce composé, celui-ci est très rapidement pris en charge par le système enzymatique et éliminé. De plus, le SNP est efficace à des doses où CN n'est en aucun cas un problème.

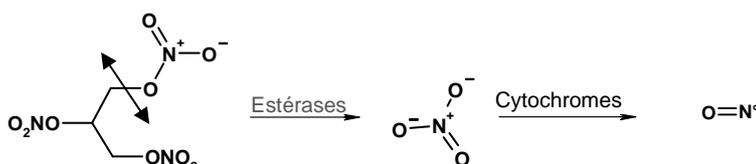
Ce produit n'est généralement utilisé qu'en milieu hospitalier pour contrôler une hyperconstriction artérielle en application locale. En revanche son utilisation est quasi-universelle dans les laboratoires, où il fait figure de vasodilatateur de référence pour les expériences *in vitro* et *ex vivo*.

b) Groupement nitrooxy

C'est ce type de produit qui fut l'un des premiers utilisés dans les cas d'hypertension, avec la triglycérine ou trinitrine :



Il est évident que la libération de NO doit passer par des étapes de métabolisation enzymatiques avant d'être complète (Torfgård K. E., Ahlner J., 1994). Prenons ici pour exemple la métabolisation d'un groupement ester nitrique de la trinitrine :



On note qu'elle se fait en deux étapes : l'action des estérasés sur une liaison oxygène – carbone permettant la libération de ONO₂⁻ puis la prise en charge de cet anion par des cytochromes avec formation de NO°. Lors des essais pharmacologiques, il sera donc nécessaire de s'assurer que les deux équipements enzymatiques sont présents. Il n'est

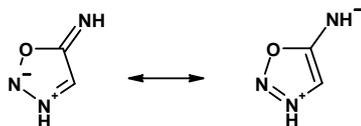
cependant pas encore connu de sous-groupes d'estérases ni de cytochromes responsables particulièrement de la métabolisation d'esters nitriques : il est possible que certains soient intra- et d'autres extra-membranaires. On peut supposer que l'encombrement autour des esters nitriques a une influence non négligeable sur la vitesse de métabolisation du groupement, qui est généralement d'une cinétique acceptable en pharmacologie (quelques heures).

Le principal inconvénient des esters nitriques comme donneurs de NO est le développement d'une accoutumance, dans le cadre d'une utilisation comme vasodilatateur, due à la diminution de la quantité de thiols à disposition sur le site de libération du NO, ces thiols participant au mécanisme d'action (Ignarro L. J., 2002). Cette accoutumance peut être résolue par des pauses de fréquences variables dans le traitement, ce qui peut être un problème dans le cas d'hypertension chronique. De par sa nature de « triple donneur » à temps de demi-vie très court (15 minutes environ), cette tolérance est bien plus marquée chez les patients utilisant de la Trinitrine. L'augmentation des doses n'est pas une solution, les autres effets des donneurs de NO n'étant peu ou pas touchés par cette accoutumance.

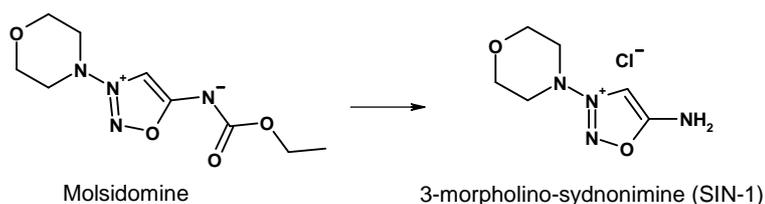
Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, c'est un groupement fréquent dans la conception de molécules hybrides.

c) Groupement sydnonimine

Le zwitterion suivant, présent sous deux formes mésomères, est l'entité active des donneurs de NO fonctionnalisés par la sydnonimine :



Lors de la prise de composés médicamenteux tels que la Molsidomine, la métabolisation hépatique conduit à l'intermédiaire suivant qui est en fait le véritable donneur de NO, la Molsidomine étant une *prodrug* :



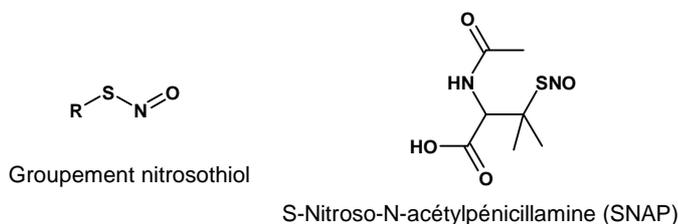
Une fois cet intermédiaire obtenu, il doit passer par trois étapes avant de pouvoir aboutir à l'oxyde nitrique (Singh R. J. et al., 1999) : hydrolyse enzymatique, oxydation et enfin décomposition spontanée.

Un important inconvénient de ce type de donneur de NO est la possibilité de synthèse d'autres composés à partir de SIN-1 tels que les nitrites et nitrates, mais surtout les ions peroxydes connus depuis longtemps (Feelisch M. et al., 1989). En plus des dommages directs aux cellules, ceci va perturber les voies de signalisation directes de NO. La faible concentration de O₂ circulant dans le corps limite toutefois cette éventualité, qui peut être problématique dans les cas d'ischémie/reperfusion. De plus, les réactions permettant de

libérer du NO à partir de SIN-1 peuvent potentiellement se dérouler en solution, ce qui rend la synthèse et la conservation de ce type de molécule difficile.

d) Groupement nitrosothiol (SNO)

Cette fonction donneuse de NO est basée sur la liaison covalente entre le NO et un atome de soufre, comme on peut le voir dans des molécules telles que le SNAP :



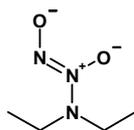
L'activité de ce type de composés est grandement influencée par leur environnement biologique et chimique. Il existe plusieurs mécanismes d'action pour libérer le NO à partir d'un nitrosothiol, mais le plus répandu semble être la libération en premier lieu de NO^+ (Zai A. et al., 1999) par une chimie relativement complexe (voir la revue de Al-Sa'doni H., Ferro A., 2000a). Cette libération peut être causée par un nombre important de facteurs, que ce soit la lumière, la chaleur, la complexation avec des métaux de transition, la réaction avec des thiols, et bien évidemment, la réaction avec différents enzymes. Ceci est en fait le plus grand avantage de SNO : la multitude de voies de libération du principe actif induit une accoutumance bien plus faible qu'avec des composés tels que les esters nitriques (Miller M. R. et al., 2000). Il faut noter également que les nitrosothiols sont de très bons antiagrégants plaquettaires à des doses extrêmement faibles (de Belder A. J. et al., 1994).

Malgré ces avantages, les SNO n'ont pas encore d'applications cliniques et restent pour le moment des outils pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*, tout en présentant des résultats prometteurs, dans les modèles animaux, pour les pathologies cardiovasculaires « classiques » type angine de poitrine et hypertension ainsi que dans la prévention de l'athérosclérose (Krieger M. H. et al., 2006) et la neuroprotection (Rauhala P. et al., 2005).

La recherche actuelle sur ce type de composés s'attelle à leur étude dans le cadre d'une utilisation clinique, en particulier en s'intéressant à différentes formes de libération contrôlée. On peut citer ici une forme de libération rapide sur support de polyéthylène (Katsumi H. et al., 2005), ou encore l'incorporation de nitrosothiols à l'intérieur de couches de polymères permettant la libération du radical NO mais pas des autres produits de dégradation (Frost M. C. et al., 2005).

e) Groupement diazenium diolate (NONOates)

Un des premiers composés décrits portant cette fonction est le diéthylamine NONOate (DEA/NO) (Drago R. S., Paulik F. E., 1960) qui est un adduit formé par la DEA et 2 équivalents de NO :



Diéthylamine NONOate (DEA/NO)

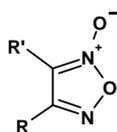
Il est relativement aisé de diversifier les structures portant la fonction NONOate, la réaction y conduisant se faisant par condensation de diolate $[N(O^-)N=O]$ sur un nucléophile, typiquement une amine primaire ou secondaire.

La décomposition des NONOates est spontanée à pH et température physiologique, et sa cinétique dépend de la structure de l'amine portant la fonction réactive (Hrabie J. A et al., 1993), ce qui a conduit à la synthèse d'une importante collection de NONOates dont les temps de demi-vie varient de quelques secondes à plusieurs heures (Morley D., Keefer L. K., 1993).

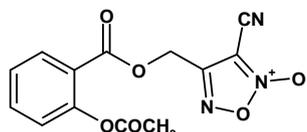
Un des avantages de cette classe de composés est que la libération de NO se fait avec une cinétique de premier ordre sans nécessiter de réaction enzymatique, ce qui rend la vitesse de libération facilement prévisible (Kavdia M., Lewis R. S., 2003) tout en évitant une partie des phénomènes d'accoutumance. La corrélation entre les expériences *in vitro* et les applications *in vivo* de ce type de composé est ainsi plus prévisible.

A l'heure actuelle, les NONOates n'ont pas d'utilisation pharmacologique approuvée chez l'homme malgré des résultats prometteurs sur différents modèles de troubles cardiovasculaires (Pluta R. M. et al., 1997 ; Miller M. R. et al., 2004). Des études de vectorisation chimique et physique similaires à celles effectuées sur les nitrosothiols sont également en cours sur ces composés (Mowery K. A. et al., 2000).

f) *Groupe ment furoxane*



Fonction furoxane



Exemple d'Aspirine-Furoxane

Le groupement furoxane intéresse les chimistes depuis de nombreuses années, mais la complexité de sa chimie a rendu son utilisation par les biologistes assez rare jusqu'à présent (Gasco A. et al., 2005). Cependant, et dans le contexte récent de recherche de NO-AINS plus efficaces, certains composés sont synthétisés et présentent un certain intérêt, que ce soit des dérivés de l'aspirine (Turnbull C. M. et al., 2006) ou encore des dérivés d'inhibiteurs COX-2 (del Grosso E. et al., 2005). Le principal obstacle à une utilisation plus large des furoxanes est le grand manque d'informations concernant leur comportement en milieu biologique, qui suscite actuellement un certain nombre de recherches. Il semble cependant qu'un équipement enzymatique important soit nécessaire à la libération de NO, et que le furoxane soit stable en milieu aqueux tamponné (Turnbull C. M. et al., 2006).

g) *Utilisation de l'ester nitrique dans le cadre de nos synthèses*

Après avoir fait le bilan des différents groupements capables, en condition physiologique, de libérer un ou plusieurs équivalents de NO, nous avons choisi de nous orienter vers les esters nitriques. Chimiquement, plusieurs voies de synthèse sont possibles pour obtenir cette

fonction, ce qui permet de modifier suffisamment les conditions opératoires pour pouvoir moduler des structures assez disparates en évitant un nombre trop important de réactions secondaires.

Mais ce sont surtout les perspectives biologiques qui nous paraissent attrayantes : un temps de demi-vie modulable par encombrement, la possibilité de modifier le nombre d'équivalents relargués, et surtout les multiples possibilités de suivre la cinétique de métabolisation. En effet, cette métabolisation se fait en deux étapes qui permettent chacune de suivre la progression de la libération des principes actifs. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes également penchés sur cette libération des principes actifs (donc de l'inhibiteur de cyclooxygénase et du NO).

(e) Cinétique de libération de l'inhibiteur de cyclooxygénase

En milieu biologique, une analyse quantitative relativement simple à mettre en place et permettant une bonne reproductibilité avec un fonctionnement en routine est la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Nous allons donc synthétiser à la fois l'inhibiteur COX donneur de NO et l'inhibiteur COX tel qu'il doit se retrouver après clivage du groupement portant le NO, afin de disposer d'une référence pour pouvoir ensuite estimer les quantités relarguées en plus du pourcentage de métabolisation. Ce type d'analyse est réalisable à la fois en milieu sanguin et en milieu de culture cellulaire.

(f) Cinétique de métabolisation de l'ester nitrique

La libération de NO à partir de l'ester nitrique passe par deux étapes. Pour chacune, il existe plusieurs moyens de mesurer la vitesse (de façon quantitative ou non, destructrice ou non) de la métabolisation.

- Libération des nitrates et nitrites

Lors de la métabolisation, la production de NO_3^- peut conduire à la génération de NO_2^- en solution (les deux pouvant être pris en charge par les cytochromes pour donner NO), et il est donc nécessaire pour être précis de mesurer la libération de ces deux entités simultanément. Une méthode classique pour y arriver est la méthode de Greiss qui est en fait un dosage colorimétrique (virant au rouge) de la présence de ces ions (Young D. V. et al., 2005). En milieu « chimique » simple type solution aqueuse, c'est une excellente méthode pour accéder aux informations concernant l'action des estérases sur l'ester nitrique. Néanmoins, nous n'utiliserons pas cette méthode car elle ne permet pas d'accéder à la cinétique de formation des produits actifs, nécessite de sacrifier le milieu d'incubation pour effectuer les mesures, et enfin l'utilisation d'un test de coloration rouge dans un milieu sanguin nous paraît peu pertinente.

Il existe d'autres protocoles permettant la mesure des nitrates et nitrites circulants, principalement colorimétriques, mais qui sont bien plus adaptés à des milieux simples (type mesure de polluant) qu'à des milieux biologiques.

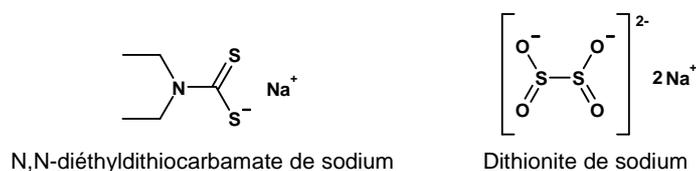
- Libération du radical NO

De par sa nature, il existe plusieurs moyens de mesurer la libération de NO. Tout d'abord, la spectroscopie UV / Visible permet de détecter, par un pic d'absorption caractéristique, toute

libération de NO. Cette mesure n'est toutefois pas quantitative, et la comparaison entre deux mesures (par exemple dans le cas d'un suivi cinétique) est impossible, ce qui rend cette méthode totalement inadéquate pour nos exigences.

Une méthode assez spécifique et présentant de l'intérêt est « l'électrode à NO », une électrode spécifique permettant de suivre les variations de quantités de ce radical présentes en solution après étalonnage (Wink D. A. et al., 1995). Il y a deux façons d'accéder à ces données : une électrode réduisant ou oxydant le NO. Ces deux méthodes de mesure présentent des interférences avec d'autres espèces potentiellement présentes dans le milieu biologique comme l'acide ascorbique ou l'oxygène ce qui les rend difficilement exploitables en milieu sanguin.

Nous avons mentionné précédemment que, de par sa nature de radical, le NO présente un électron non apparié et a donc un spin électronique non nul. La méthode de résonance paramagnétique électronique (RPE) permet de détecter ce type de composés dans des milieux extrêmement complexes et sans interférences notables si la température de mesure est suffisamment basse. Dans le cas d'un milieu sanguin cependant, l'oxyde nitrique se complexe très facilement avec le fer présent dans l'hème de certaines protéines et change ainsi son état de transition, ce qui va aboutir à la disparition du signal présenté par le NO. L'utilisation de piègeurs (« scavengers ») de radicaux libres permet de piéger les radicaux formés, ce qui dans notre cas peut permettre de conserver le signal du NO sans perturbations par l'hème. Concernant le NO, une étude détaillée (Samouilov A., Zweier J. L., 2002) a montré que l'utilisation de N,N-diéthylthiocarbamate de sodium (stabilisé par addition de dithionite) permettait d'obtenir une complexation suffisamment stable avec le NO et visible en RPE, pour être utilisée en milieu biologique.



Les spectres obtenus en RPE peuvent, après traitement mathématique, aboutir à des équivalences de quantité de façon reproductible. On peut donc ainsi suivre une libération.

C'est cette méthode que nous avons choisie, car en plus de permettre le suivi efficace de la libération de NO dans le sang, elle est assez novatrice dans le cadre de l'utilisation de *prodrugs* du type inhibiteurs COX / donneurs de NO.

2. Choix des espaceurs

Dans certains cas il est possible de greffer directement un ester nitrique sur un inhibiteur de cyclooxygénase et de retrouver un alcool après métabolisation par les estérases. Dans d'autres cas, il est nécessaire d'adjoindre, entre l'inhibiteur de cyclooxygénase et l'ester nitrique, un espaceur. Il existe plusieurs types d'espaceurs, certains étant de simples molécules qui seront prises en charge très rapidement par l'organisme afin d'être éliminées (type alcool), et d'autres plus complexes (souvent de type peptidique) nécessitant encore plusieurs étapes de métabolisation avant d'être expulsées.

Dans un souci de simplicité, et pour se focaliser sur les cibles pharmacologiques que nous nous sommes imposées dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi d'approcher les

espaceurs comme de simples supports chimiques. Logiquement, nous avons pu séparer les espaceurs qui nous intéressaient en deux familles : espaceurs aliphatiques et aromatiques.

a) Espaceurs aliphatiques

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à un espaceur de type aliphatique possédant un nombre limité de carbones. Celui-ci doit permettre un encombrement minimal, donc favoriser la métabolisation de l'ester nitrique, tout en possédant un minimum d'effets biologiques. Un espaceur de type alcool ou diol linéaire semble permettre ce type d'approche et a déjà été envisagé dans d'autres composés, comme le NO-Naproxen ou AZD3582 et le NO-flurbiprofène (Fig. 54) où il a donné des résultats intéressants. Dans le cas des profènes, la fonction chimique pouvant être utilisée pour lier l'espaceur à l'entité inhibitrice de COX peut être un ester réalisé sur l'acide carboxylique de la molécule parent : ceci a l'avantage de permettre une métabolisation simple et relativement rapide du composé pour restituer le profène initial.

Concernant le NO-flurbiprofène, sur lequel repose cette approche, une étude de la cinétique de métabolisation a été effectuée (Santini G. et al., 1996) et a fait ressortir les points suivants :

- 1 h d'incubation dans le sang total humain conduit à environ 35 % de libération de flurbiprofène à partir du NO-flurbiprofène ;
- 24 h d'incubation sont nécessaires à la restitution de la totalité du flurbiprofène engagé.

Il semble donc que cette approche puisse être retenue dans la conception d'inhibiteurs mixtes COX / donneurs de NO.

En parallèle, l'encombrement autour de l'ester nitrique a, comme nous le verrons par la suite, une influence sur sa cinétique de métabolisation. Il semble alors intéressant de comparer les propriétés chimiques et biologiques de composés possédant des esters nitriques « primaires » et leurs équivalents « secondaires » selon ce schéma :



Nous allons donc retenir ces deux approches et les comparer dans les évaluations pharmacologiques réalisées. Les espaceurs employés seront donc les 1-nitrooxyéthane et 2-nitrooxypropane.

L'étude sur les dérivés du naproxène donneurs de NO (Young D.V. et al., 2005) et les données récoltées concernant l'influence dose dépendant de NO sur le cancer conduisent à envisager des composés capables de donner plusieurs équivalents de NO, de manière similaire au NMI-1182 (Fig. 54). Les résultats de cette évaluation mettent en avant une augmentation presque deux fois supérieure du taux de GMPc lors de l'utilisation du NMI-1182 en comparaison à celle obtenue avec l'utilisation de l'AZD 3582.

On peut envisager d'effectuer des modulations similaires pour obtenir des doubles donneurs de NO : on peut se baser sur des espaceurs de type glycérol, qui pourront être

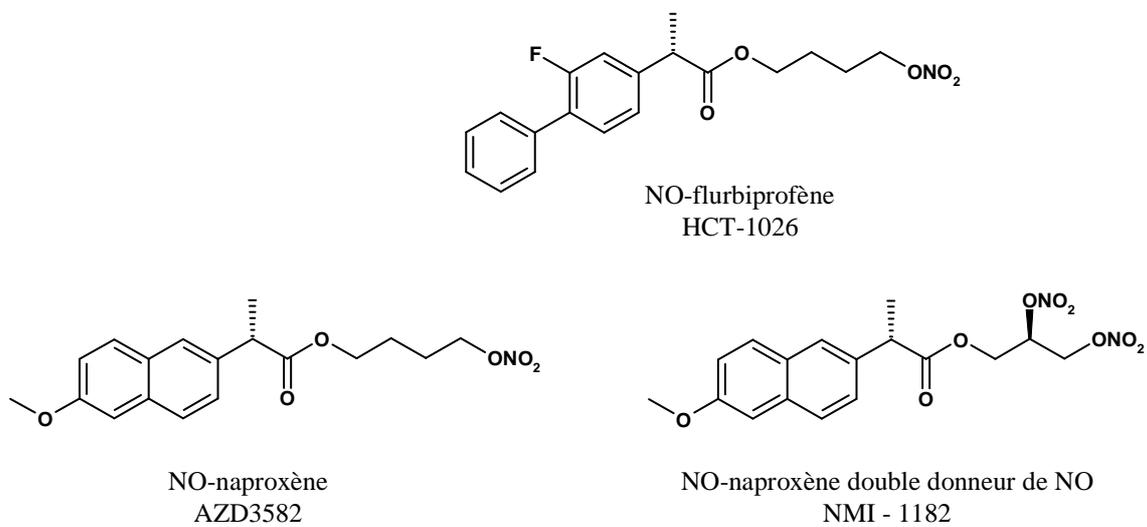
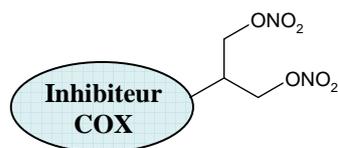
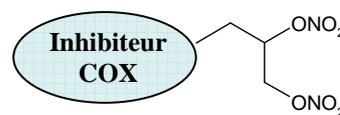


Fig. 54 : Exemples d'espaceurs aliphatiques

modulés pour donner à la fois un ester nitrique primaire et un secondaire, ou deux esters nitriques primaires :



Double donneur
de NO "primaire"

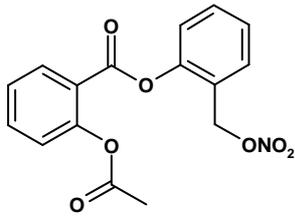


Double donneur de NO
"primaire + secondaire"

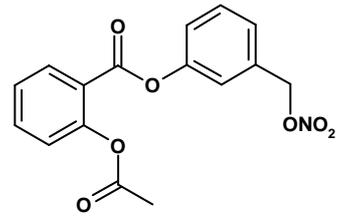
b) Espaceur aromatique

Dans le cas des γ -carbolines, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'utiliser un espaceur de nature aromatique, en s'inspirant de travaux effectués sur l'aspirine et ayant conduit à plusieurs composés dont certains sont en étude clinique dans le cancer du côlon comme la série des NCX (Fig. 55).

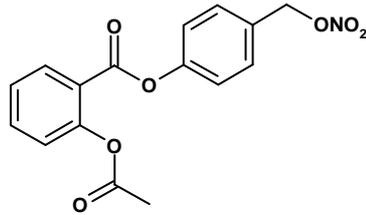
La différence dans ces espaceurs réside dans la position de l'ester nitrique : ortho (NCX 4060), méta (NCX 4016) ou para (NCX 4040). Les conséquences de ces variations ont fait l'objet de deux publications, une concernant les effets sur l'inhibition de la prolifération cellulaire (Kashfi K. et Rigas B., 2005a), et une portant sur l'influence de l'espaceur sur la métabolisation (Gao J. et al., 2005). Il en ressort que la métabolisation la plus rapide est de loin celle de l'isomère en para (30 minutes) devant celles des ortho (2 h) et méta (incomplète au bout de 5 h), ce qui justifie de considérer l'isomérisation de position comme facteur influençant fortement la cinétique de métabolisation. De plus, ceci peut être corrélé à l'activité de ces molécules sur les cellules cancéreuses du côlon.



NCX 4060
 $CI_{50} = 4,8 \mu\text{M}$



NCX 4016
 $CI_{50} = 500 \mu\text{M}$



NCX 4040
 $CI_{50} = 5,0 \mu\text{M}$

Les valeurs d'inhibition de prolifération cellulaire sont déterminées à partir d'expériences sur cellules isolées du cancer du côlon HT-29.

Fig. 55 : Modulation de l'aspirine avec espaceur aromatique
(adapté de Kashfi K. et al., 2004)

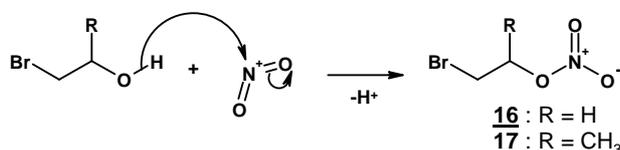
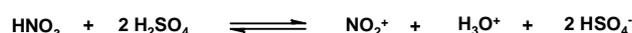
E - STRATEGIE DE SYNTHÈSE : INHIBITEURS DE COX / DONNEURS DE NO

Nous allons présenter les stratégies de synthèse des différentes séries de produits telles que nous les avons abordées au laboratoire. Elles sont, pour la plupart, de type convergent : ceci permet d'utiliser des synthons qui sont plus facilement modifiables, et permet une modulation plus rapide des composés. En début de paragraphe, le schéma de synthèse sera présenté et les équivalents pour les différents groupements « R » y seront explicités.

1. Synthèse des espaceurs et de l'ester nitrique

L'ester nitrique peut être obtenu principalement par réaction sur deux centres réactifs différents que sont les alcools et les halogènes, réactions relativement sélectives et présentant des conditions assez différentes pour pouvoir être exploitées indépendamment. L'utilisation de synthons est ici favorisée quand c'est possible, la synthèse de l'ester nitrique se faisant dans des conditions soit très dures (sur un alcool) soit modérément dures (sur un halogène).

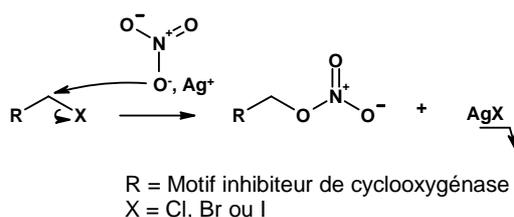
a) Synthèse d'un ester nitrique à partir d'un alcool



On commence ici par former un ion nitronium par réaction acide – base entre l'acide nitrique et l'acide sulfurique. Son azote électrophile va ensuite être le lieu privilégié pour une attaque par un doublet de l'oxygène pour conduire à l'ester nitrique. Le risque encouru dans ces conditions est la substitution d'un cycle aromatique adjacent par un groupement nitro, c'est pour cette raison que cette réaction sera utilisée pratiquement uniquement sur un synthon simple (1-bromoéthan-2-ol ou 1-bromopropan-2-ol). La réaction a lieu à froid ($T = 0\text{ }^\circ\text{C}$) ou à température ambiante selon la réactivité en milieu acide des autres fonctions de la molécule. Elle est quantitative et, dans ces conditions, l'halogène n'a pas de caractère nucléofuge suffisant.

Nous avons cependant rencontré à cette étape une difficulté dans l'identification du produit. En effet, bien qu'ayant visualisé en infra-rouge la formation d'un produit comportant un groupement $-\text{ONO}_2$ et vérifié sa structure par RMN, celui-ci n'est détecté en LC/MS que dans l'UV. La technique APCI⁺ (ionisation chimique à pression atmosphérique) comme la technique électrospray en spectrométrie de masse n'ont pas permis d'identifier le produit nitré, celui-ci étant probablement trop instable pour ce type d'analyse.

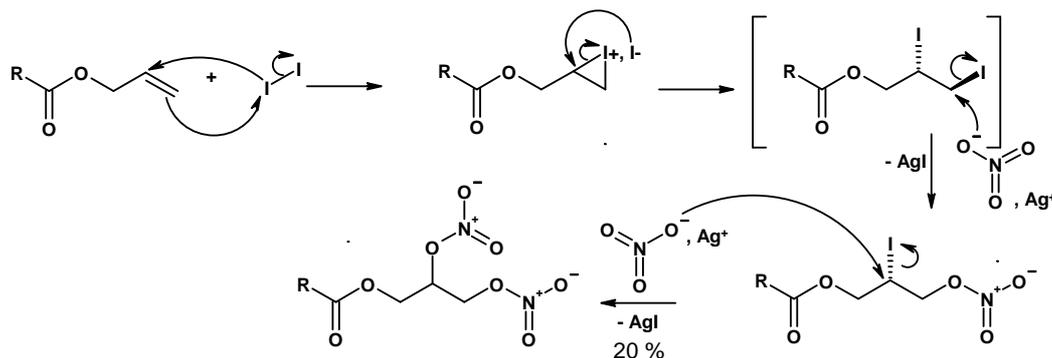
b) Synthèse d'un ester nitrique à partir d'un halogène



Une substitution de l'halogène par le nitrate d'argent est possible sans toucher la fonction alcool. La précipitation de l'halogénure d'argent au cours de la réaction permet de déplacer l'équilibre et explique les bons rendements. Ils dépendent cependant de l'encombrement du carbone sur lequel la substitution est effectuée (rendement de 50 % pour un carbone secondaire, 80 % pour un carbone primaire environ, ce qui est attendu pour une substitution nucléophile). Les conditions opératoires sont décrites sur différents composés aliphatiques (Shan R. et al., 2004). Un reflux dans un solvant polaire aprotique tel que l'acétonitrile pendant plusieurs heures facilite la réaction, en particulier dans le cas de carbones encombrés (20 h environ de reflux dans l'acétonitrile).

c) Synthèse d'un double donneur de NO à partir d'un ester d'allyle

La dihalogénéation d'un ester d'allyle par l'iode permet, quant à elle, de préparer les composés porteurs de deux esters nitriques :



R = Motif inhibiteur de cyclooxygénase

Nous procédons ici sur des composés « inhibiteurs COX » déjà fonctionnalisés par un ester allylique, pour pouvoir purifier directement un produit fonctionnalisé « encombré », ce qui est généralement plus aisé que de purifier un composé saturé linéaire.

Il est possible d'ioder in situ car cette réaction se fait très bien à froid, le diiode étant introduit goutte à goutte sur le composé allylique pour donner tout d'abord un ion ponté iodonium, puis le dérivé diiodé. Cet halogène étant un bon groupement partant, la première nitration (sur le carbone primaire) se fait quasi instantanément, même à 0 °C. En revanche, la seconde nitration (sur le carbone secondaire) se fait plus difficilement comme nous l'avons abordé précédemment et nécessite un chauffage à reflux pendant plus de 24 h. Nous avons ainsi pu isoler et identifier certains composés monoiodés, mononitrés ainsi que dinitrés, et ainsi justifier le mécanisme de la réaction.

Il faut noter ici que cette synthèse conduit à un composé présentant un carbone asymétrique. N'ayant pas d'information sur l'ordre de la réaction de substitution par le nitrate, nous ne pouvons conclure quant à la stéréochimie.

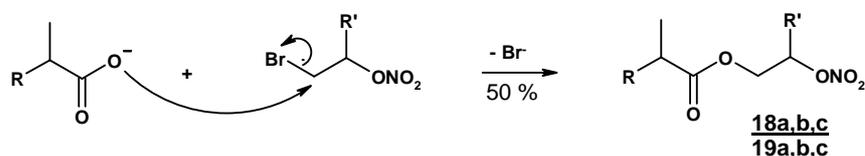
Ce type de réaction marche très bien sur la plupart de nos composés, mis à part le carprofène sur lequel la réaction de l'iode donne un grand nombre de produits secondaires ayant des caractéristiques d'élution CCM proches, ce qui rend leur purification impossible.

2. Synthèse des profènes donneurs de NO

Ayant à disposition les profènes (kétoprofène, suprofène et carprofène) commerciaux, la principale réaction utilisée ici est l'estérification de l'acide propionique du profène.

a) Profènes « monodonneurs » de NO (Fig. 56) (18, 19)

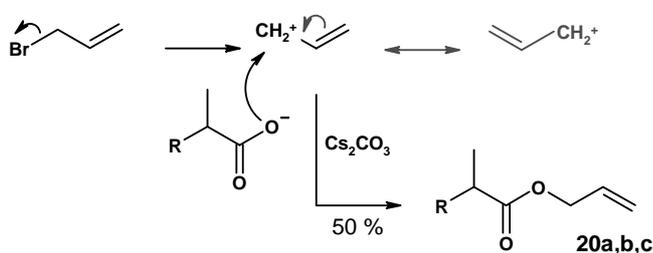
Les synthons utilisés, le 1-bromo-2-nitrooxyéthane et le 1-bromo-2-nitrooxypropane, sont relativement stables. La fonction acide carboxylique des profènes réagit par substitution nucléophile en milieu basique avec les dérivés bromés :



Le brome étant un bon groupement partant, la substitution par un carboxylate est possible à température ambiante en 24 h environ, la base utilisée étant le carbonate de césium. Elle présente un double avantage : le césium est un contre-ion assez volumineux qui facilite la formation du carboxylate, tout en piégeant correctement le brome. L'utilisation d'une base possédant OH⁻ (type soude) est déconseillée puisqu'elle pourrait donner une réaction de substitution directe de l'hydroxyle sur le carbone bromé. Le bromonitrooxyalcane est mis en défaut, un lavage aqueux acido-basique suffit pour purifier le milieu réactionnel. La réaction présente de très bons rendements et une bonne pureté.

b) Profènes « doubles donneurs » de NO (Fig. 57) (22)

Une voie analogue d'obtention d'un ester a été utilisée pour obtenir les esters allyliques des profènes, avec l'utilisation du bromure d'allyle. Il existe cependant une différence dans le mécanisme, la stabilisation du carbocation formé contribuant fortement à une substitution d'ordre 1 :



Cette réaction présente de très bons rendements, et la purification par chromatographie sur gel de silice se fait facilement, les écarts de temps de rétention des quelques produits obtenus étant suffisamment différents.

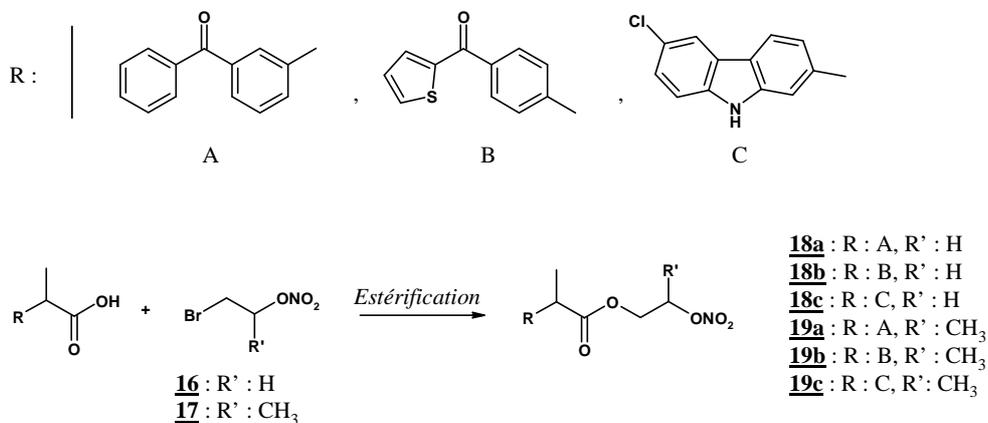


Fig. 56 : Stratégie de synthèse des profènes mono-donneurs de NO

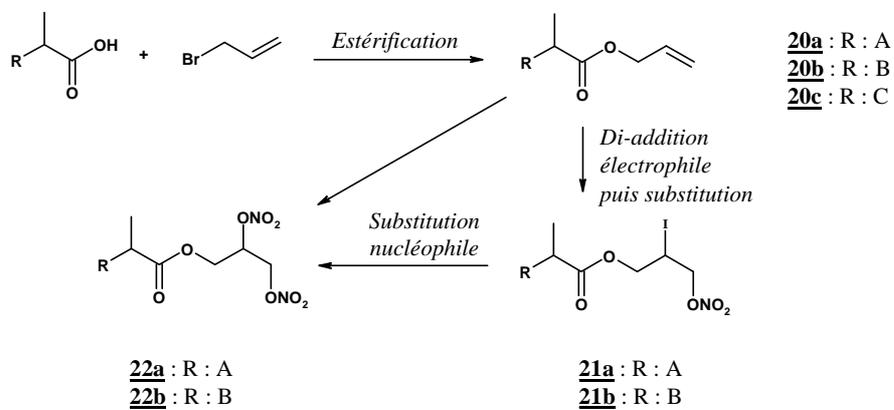
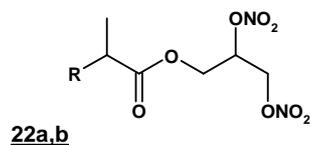


Fig. 57 : Stratégie de synthèse des profènes double-donneurs de NO

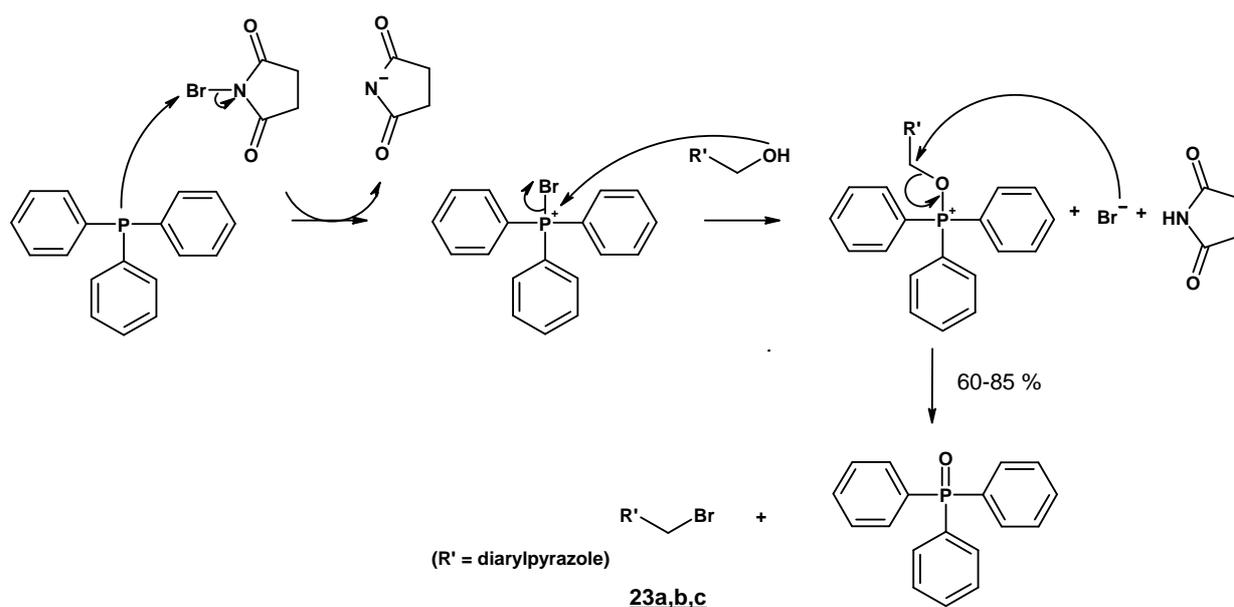
Ensuite, l'utilisation de diiode et de nitrate d'argent comme expliqué précédemment va permettre l'obtention des doubles donneurs de NO attendus concernant le suprofène et le kétoprofène, la réaction avec le carprofène présentant trop de produits secondaires.



3. Synthèse des diarylpyrazoles (DAP) donneurs de NO (Fig. 58)

Dans la partie sur la cyclooxygénase, nous avons vu d'une part la synthèse des squelettes type diarylpyrazoles en tant qu'archétypes d'inhibiteurs sélectifs COX-2, et d'autre part les voies de synthèses visant une fonction alcool ou acide en position 3 de l'hétérocycle. Nous allons donc pouvoir fonctionnaliser ces groupements de manière à obtenir un composé donneur de NO capable de libérer l'entité inhibitrice de cyclooxygénase après métabolisation.

a) *Bromation des alcools de diarylpyrazole* (Montalbetti C., Falque V., 2005) (**23**)



Le mécanisme d'obtention supposé des dérivés bromés est présenté ci-dessus et met en jeu la triphénylphosphine et son affinité pour le brome. Nous avons obtenu lors de cette réaction un produit secondaire que nous n'avons pas isolé : il est probable qu'il soit dû à la réaction de PPh₃ sur le proton aromatique du cycle pyrazolique.

L'obtention de ces composés bromés permet d'obtenir les dérivés nitrooxy **24a, b, c** par la méthode décrite préalablement et dans des conditions assez douces. Cette réaction se fait bien car le dérivé bromé est primaire, ce qui permet une attaque facile par l'ester nitrique.

b) *Dérivés esters des DAP portant des donneurs de NO*

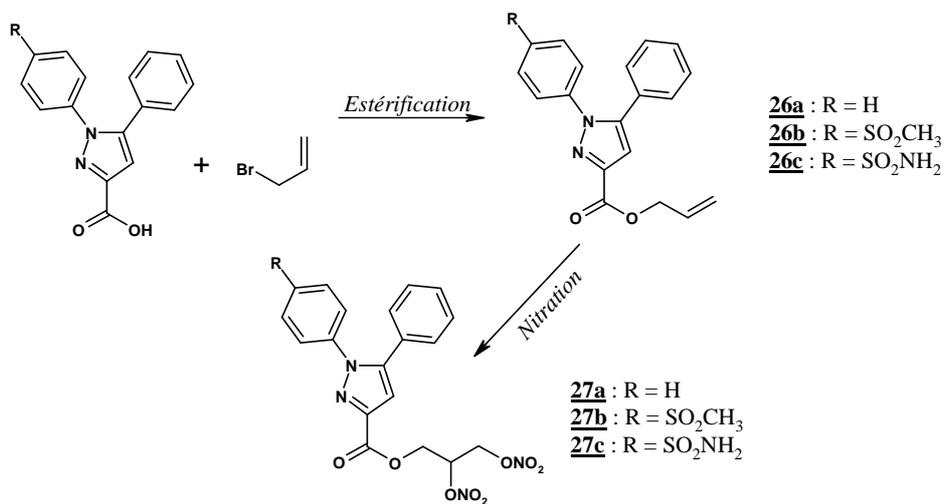
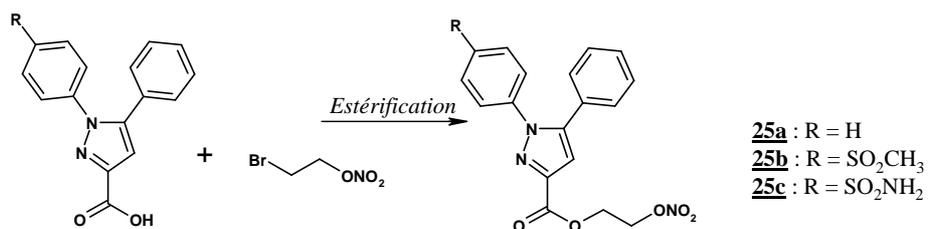
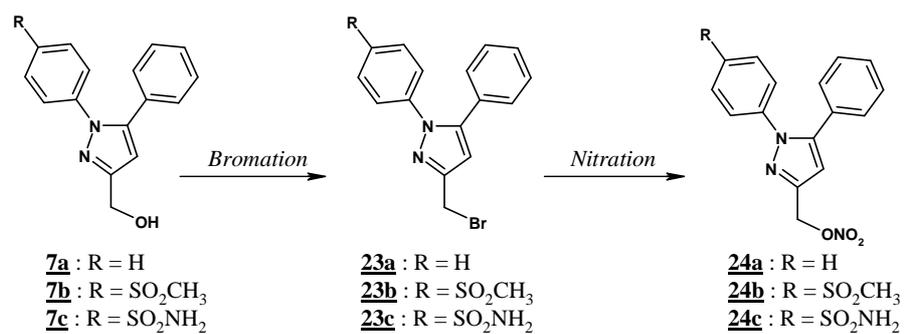
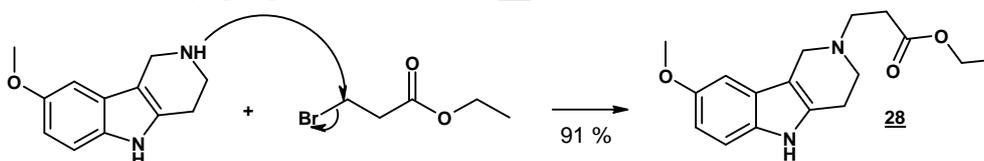


Fig. 58 : Stratégie de synthèse des composés de type diarylpyrazole donneurs de NO

Suite aux synthèses réalisées sur les profènes, nous avons choisi de nous orienter vers le même type de réaction sur les dérivés acides des diarylpyrazole, avec les mêmes conditions opératoires légèrement basiques permettant l'attaque du carboxylate sur l'halogène porté par l'espaceur. Dans le cas des dérivés monodonneurs **25a,b,c** aussi bien que dans le cas des dérivés doubles donneurs **27a,b,c**, cette substitution nucléophile se fait facilement et proprement.

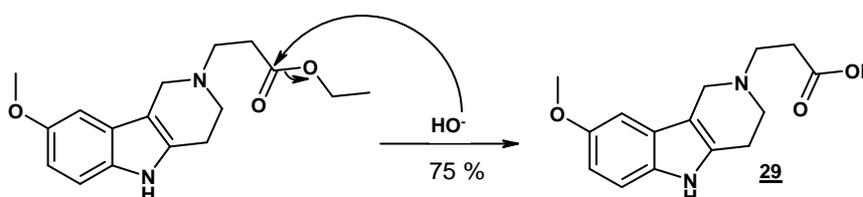
4. Synthèse des γ -carbolines donneurs de NO à espaceur aliphatique (Fig. 59)

a) Synthèse du 3-(8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionate d'éthyle (**28**)



On utilise la même méthode pour obtenir cet éther que celle utilisée précédemment. On utilise l'ester bromopropionique et non pas l'acide correspondant pour éviter toute réaction conduisant à une condensation par réaction du brome sur l'acide. De plus, les réactifs sont introduits en quantité stoechiométrique pour éviter une réaction d'amidification. On peut donc effectuer la réaction à une température élevée : on obtient ici de très bons rendements, de l'ordre de 75 %.

b) Synthèse de l'acide 3-(8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionique (**29**)



Cette saponification se fait très bien car la seule liaison sensible à un milieu basique est la liaison ester. Il suffit ensuite de concentrer le milieu réactionnel, de reprendre à l'eau et de laver par un solvant organique pour effectuer la purification. L'acide carboxylique précipite lors de la neutralisation de la phase aqueuse.

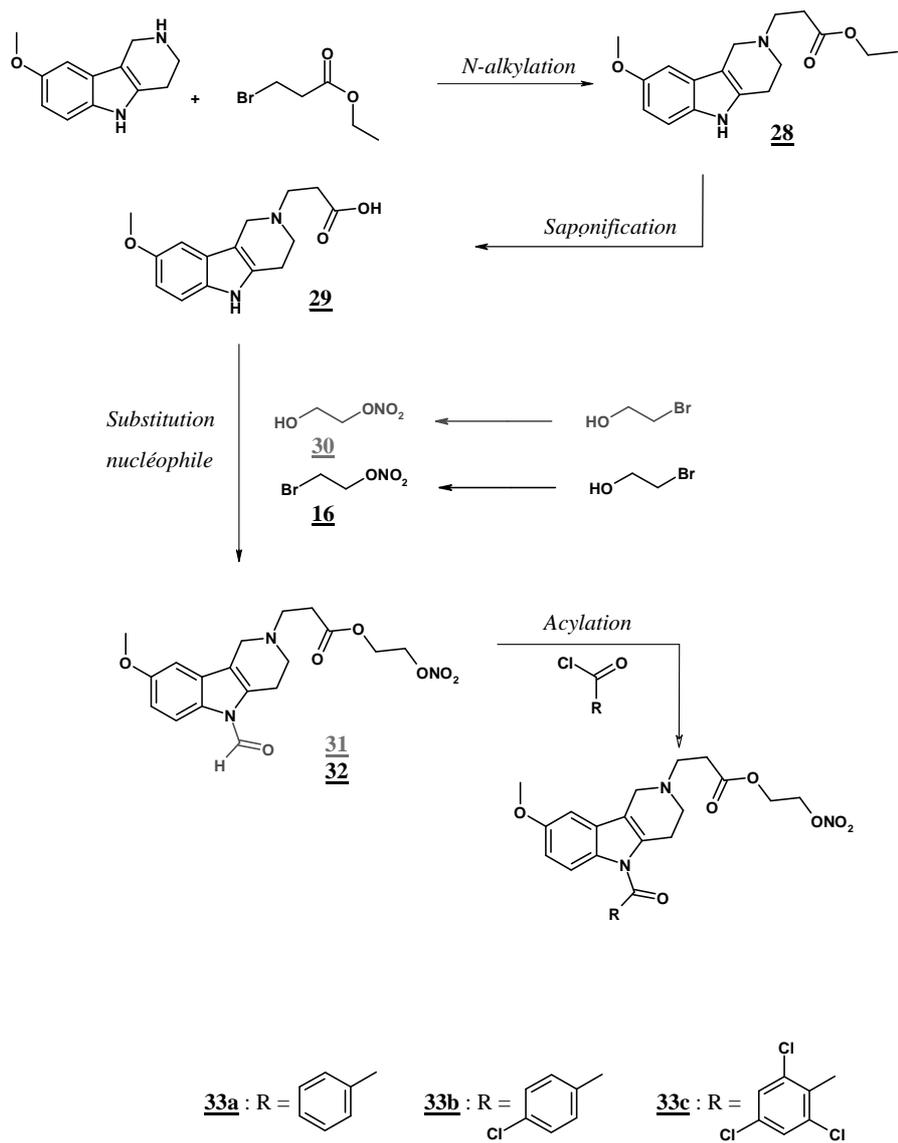
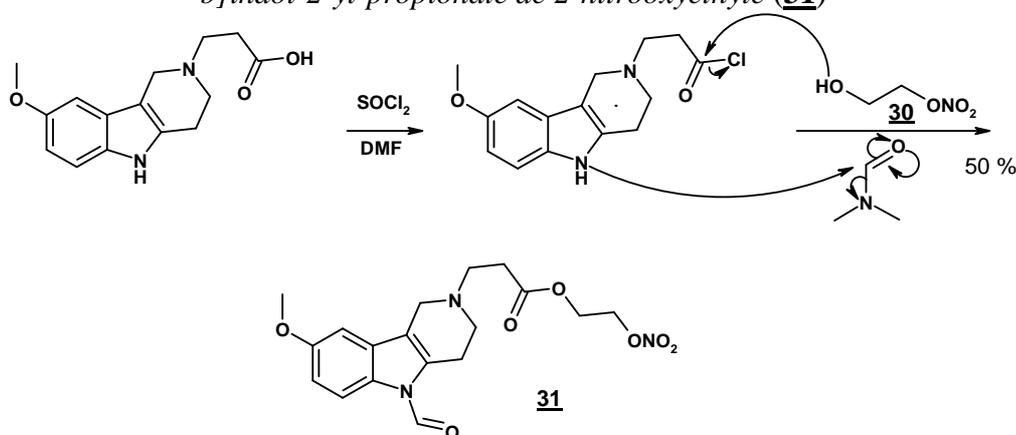


Fig. 59 : Stratégie de synthèse de γ -carbolines donneurs de NO à espaceur aliphatique

c) Synthèse du 3-(5-formyl-8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)-propionate de 2-nitrooxyéthyle (**31**)



L'estérification se fait en passant par le chlorure d'acide que l'on obtient par réaction sur le chlorure de thionyle. Deux essais ont été réalisés : en isolant ou non le chlorure d'acide. L'ester attendu n'a été caractérisé dans aucun des deux cas. Il est possible que ces échecs soient dus soit à la dégradation de l'ester nitrique, soit à l'hydrolyse accidentelle du chlorure d'acide.

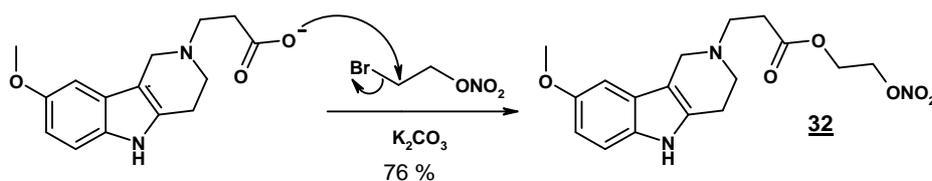
Après lavage basique et séparation par chromatographie sur gel de silice, le produit majoritaire de la réaction d'estérification a été isolé et analysé.

Le spectre IR présente les bandes caractéristiques du groupement NO ainsi que celles du groupement C=O de l'ester. Le spectre de RMN quant à lui correspond à la structure du produit attendu mis à part la présence d'un signal à une valeur correspondant à un atome d'hydrogène porté par un carbone aldéhydique, et l'absence de signal correspondant à l'hydrogène indolique, ce que confirme l'analyse LC/MS. L'analyse RMN 2D de type HSQC a confirmé la présence d'un atome d'hydrogène porté par un carbone aldéhydique.

La substitution de l'azote « indolique » par le groupement formyle devrait faire intervenir le DMF utilisé comme solvant : une réaction analogue effectuée dans un autre solvant permettra de confirmer cette hypothèse avant de pouvoir proposer un mécanisme réactionnel.

Cette méthode de synthèse ne permet donc pas d'accéder au produit attendu. Il a alors été décidé de s'orienter vers la préparation d'un ester par une réaction de substitution plutôt que par une réaction d'estérification.

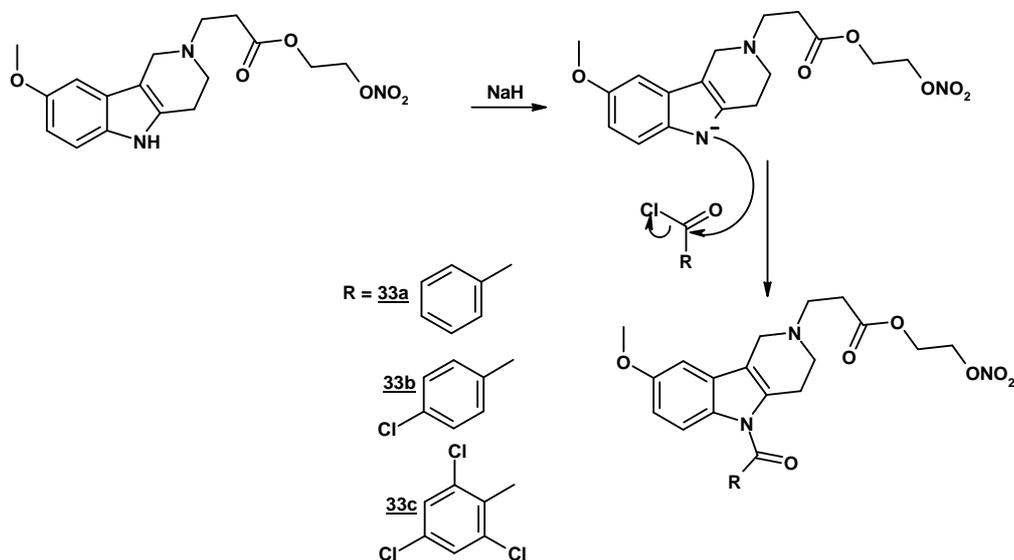
d) Synthèse du 3-(8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)-propionate de 2-nitrooxyéthyle (**32**)



On utilise ici le bromonitrooxyéthane dont la synthèse a été décrite précédemment pour réaliser l'estérification par la méthode utilisée pour les esters nitriques de profènes. Cette

estérification a été réalisée en milieu légèrement basique et, après lavage aqueux, le produit unique de cette réaction a été isolé avec de bons rendements.

e) *Synthèse du 3-(5-benzoyl-8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionate de 2-nitrooxyéthyle et ses dérivés (33)*



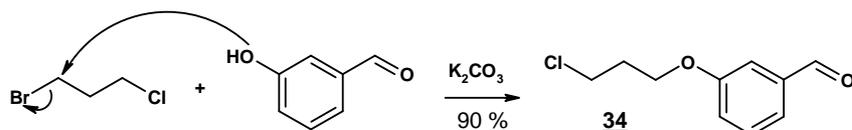
Ces composés seront obtenus par l'utilisation d'hydrure de sodium suivie d'une acylation par des chlorures de benzoyle substitués.

Les essais réalisés pour le moment sur les faibles quantités d'esters obtenus ont conduit à des mélanges de plusieurs composés en quantités équivalentes. Une diminution de température ou l'utilisation d'un autre solvant sont des paramètres qui pourraient permettre de favoriser la seule réaction de benzoylation attendue.

5. Synthèse des γ -carbolines donneurs de NO à espaceur aromatique
(Fig. 60)

Le schéma général de cette synthèse comporte 6 étapes, qui sont détaillées ci-après. L'option prise d'utiliser un schéma de synthèse de type convergent plutôt qu'un schéma de synthèse linéaire (avec tout d'abord la N-alkylation, puis substitution sur le motif méthoxy- γ -carboline alkylé) résulte d'essais préliminaires. En effet, les produits formés lors de la réaction de N-alkylation risquent d'être plus nombreux, et la possibilité de double substitution (deux motifs méthoxy- γ -carboline substituant la chaîne propyle) est accentuée.

a) *Synthèse du 3-(3-chloropropoxy)benzaldéhyde (34)*



Cette substitution nucléophile fait intervenir l'acidité de l'hydrogène phénolique du 3-hydroxybenzaldéhyde et s'effectue sur le brome du 1-bromo-3-chloropropane. Le bromure

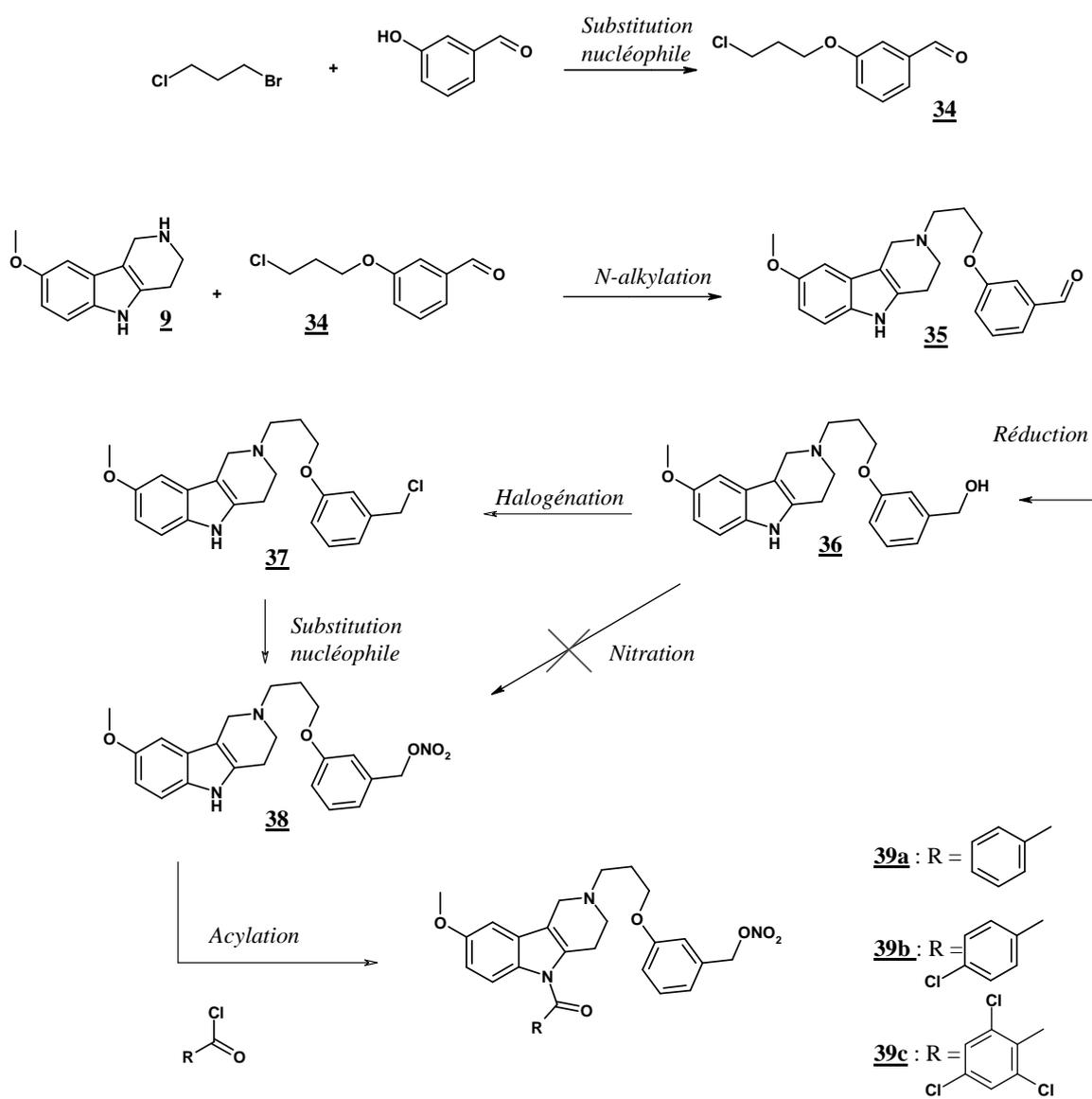
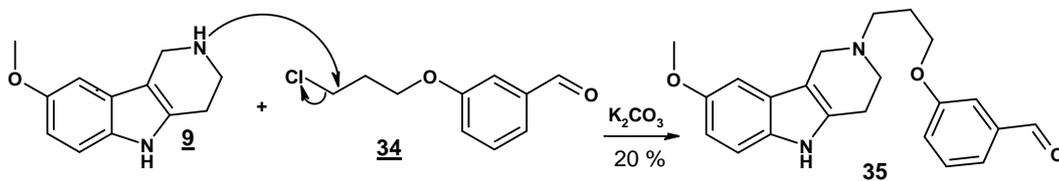


Fig. 60 : Stratégie de synthèse de γ -carbolines donneurs de NO à espaceur aromatique

étant un meilleur groupement partant, la réaction se fait dissymétriquement. Le chlorure interviendra dans l'étape suivante de N-alkylation.

L'excès de 3-hydroxybenzaldéhyde est éliminé par des lavages successifs à la soude.

b) Synthèse du 3-[3-(8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)propyloxybenzaldéhyde] (**35**)

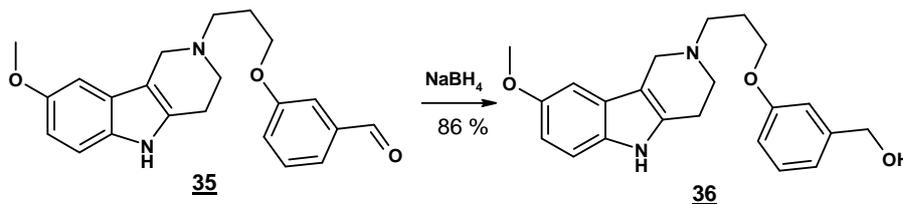


L'alkylation de la carboline par le dérivé chloré s'effectue par le centre nucléophile qu'est l'amine secondaire. On utilise K_2CO_3 , base assez faible, pour favoriser une réaction chimiosélective.

La méthoxy- γ -carboline est soluble uniquement dans le DMF, ce qui rend l'isolement plus difficile car ce solvant est plus difficile à éliminer. Nous avons réalisé de nombreux essais dans d'autres solvants plus ou moins polaires comme l'acétonitrile, le toluène ou le dichlorométhane, sans succès, en raison d'un manque de solubilité de la carboline.

Le rendement est assez faible car il se forme un produit secondaire de masse molaire supérieure de 44 à celle du produit attendu. Ceci correspond à la masse d'un motif O-C=O. Nous avons donc envisagé la formation du carbamate après analyse des spectres IR et de RMN, mais sans pouvoir le justifier. Il est également possible que soit impliquée l'attaque par l'amine sur le carbone aldéhydique qui est également un centre électro-attracteur.

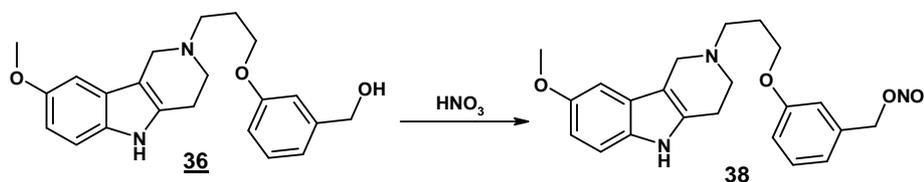
c) Synthèse du 3-[3-(8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)propyloxy]phényl)méthanol (**36**)



La réduction d'un aldéhyde par un hydrure ($NaBH_4$) peut se faire dans un solvant polaire anhydre tel que le THF fraîchement distillé ou encore l'éthanol. L'alcool primaire en résultant est obtenu avec un très bon rendement.

Des essais préalables ont été réalisés pour réduire l'aldéhyde par la voie classique de l'hydrogénation catalytique sur palladium / charbon 10%. Ils ont conduit à l'alcool, non seulement avec un rendement moindre, mais également avec un temps de réaction plus important (72 heures contre 1 heure pour la réduction par l'hydrure).

d) Synthèse du 8-méthoxy-2-(3-{3-[(nitroxy)méthyl]phénoxy}propyl)-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (**38**)

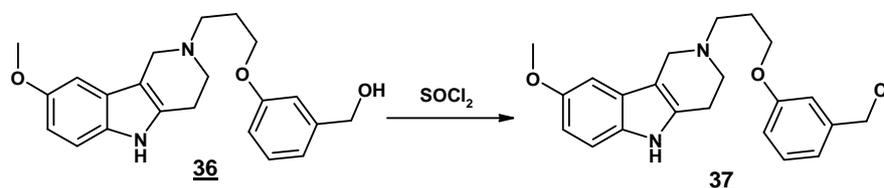


La nitration d'un alcool par l'acide nitrique est décrite dans la littérature (Rigas B., Williams J. L., 2002) avec de très bons rendements. Dans notre cas, plusieurs essais ont été réalisés.

Le premier a été réalisé à -10°C . Après une heure de réaction, l'analyse par chromatographie LC/MS a identifié des composés de masse $M+46$ et $M+92 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ par rapport au composé mononitré attendu. Ceci peut s'expliquer par la nitration du cycle aromatique dans une réaction de substitution électrophile. A une température plus basse, -20°C , les produits obtenus sont similaires à ceux obtenus à -10°C .

Cette voie de synthèse amenant à la formation de produits secondaires difficilement purifiables, il a été envisagé de former le dérivé chloré pour ensuite effectuer la substitution par le nitrate d'argent. Ces conditions sont donc moins favorables à la formation de produits secondaires résultant de la nitration du cycle aromatique.

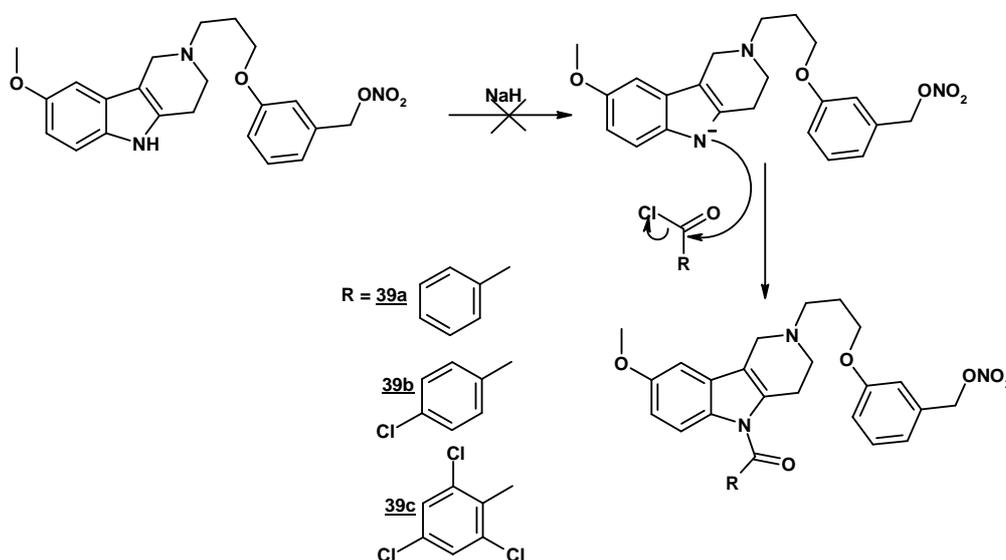
e) Synthèse du 2-[3-(3-chlorométhylphénoxy)propyl]-8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (**37**)



La chloration de l'alcool par le chlorure de thionyle peut se faire, même à faible température. Dans ce cas, nous n'avons pu isoler le produit attendu dont la présence en fin de réaction a néanmoins été vérifiée par LC/MS, et les conditions d'accès au chlorure de benzyle sont en cours de mise au point.

Après purification, cette réaction serait suivie de la substitution nucléophile grâce à AgNO_3 afin d'obtenir le produit nitré (Sheng H. et al., 1997).

f) Synthèse des dérivés du 5-benzoyl-8-méthoxy-2-[3-(3-nitroxyméthylphénoxy)-propyl]-2,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indole (**39**)



L'utilisation de l'hydrure de sodium pour créer l'anion sur l'atome d'azote indolique devrait favoriser l'attaque *in situ* du chlorure de benzoyle.

Nous n'avons pas réalisé ces réactions, la carboline de départ devant être purifiée. En revanche, des réactions de benzylation sur des γ -carboline ont déjà été réalisées au laboratoire dans ces conditions. Cependant, les composés possédant un ester nitrique assez instable n'ont pas encore été soumis à ces conditions réactionnelles et nous ne pouvons prévoir l'issue de cette réaction. De manière générale, la benzylation de l'azote indolique donne un composé très sensible au pH : la liaison azote indolique-carbonyle est susceptible de se cliver dès pH 9. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'effectuer cette réaction le plus tard possible dans le schéma de synthèse.

F - EVALUATIONS CHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DES COMPOSES MIXTES

1. Les Profènes

La synthèse de profènes donneurs de NO a constitué pour nous une première étape dans la synthèse de composés novateurs fonctionnels, en nous apportant des données essentielles autant sur le plan chimique que pharmacologique.

Nous avons donc procédé sur ces composés à une série de tests, à savoir la mesure de :

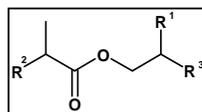
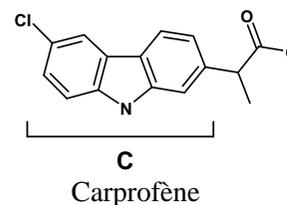
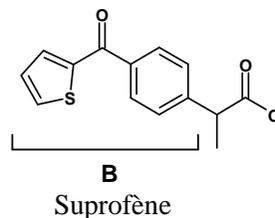
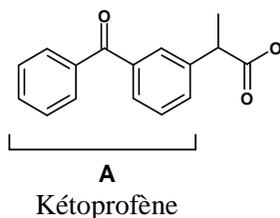
- inhibition enzymatique des deux isoformes COX-1 et COX-2, sur sang total. Les résultats sont exprimés sous forme de CI_{50} (μM) (le protocole figure en annexe)
- taux de clivage de l'ester dans ce même milieu physiologique à la fin de l'incubation avec concentration initiale en inhibiteur de $10 \mu M$ (la technique CLHP est donnée en annexe).
- inhibition de prolifération cellulaire sur lignée PC3 (issue de métastases osseuses du cancer de la prostate au stade hormono-indépendant). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage d'inhibition à $100 \mu M$, ou de CI_{50} .

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

a) Evaluations sur sang total

Tout d'abord, les valeurs d'inhibition enzymatique obtenues pour les profènes parents sont conformes à celles présentées dans la littérature, au niveau sub-micromolaire pour le kétoprofène et le suprofène, et de l'ordre de $50 \mu M$ pour le carprofène. Ceci permet de valider notre modèle pour la suite du travail.

Ensuite, si on s'intéresse au pourcentage de libération du profène parent à partir des composés fonctionnalisés, on peut constater que les valeurs obtenues sont presque toutes supérieures à 70% (mis à part une valeur pouvant sembler aberrante pour le composé **18b**). Ceci confirme que le clivage de l'espaceur portant l'ester nitrique par les estérases se fait correctement, ce qui permet au profène d'exercer son action inhibitrice. Dans la plupart des cas cependant, on ne retrouve pas l'intégralité du profène attendu. Plusieurs raisons sont possibles : tout d'abord, le sang possède un équipement enzymatique important. Il est probable que, pendant les 22 heures que dure l'expérience, une partie du profène soit dégradé par métabolisation et donc ne se retrouve pas tel quel en fin de manipulation. Ensuite, une marge d'erreur relativement importante est intrinsèque à notre protocole : le calcul d'une quantité après étalonnage dans un milieu aussi complexe que le sang comporte une part de variabilité conséquente. Il est également possible qu'il existe un effet de dose limite dans la métabolisation : l'équipement enzymatique présent dans le sang ne serait pas capable de cliver l'intégralité des produits présents, et au dessus d'une certaine quantité d'esters nitriques ne serait plus efficace. Ce type de problème pourrait être résolu dans un modèle plus proche de l'*in vivo*, et/ou sur un temps d'expérience plus long, malheureusement non compatible avec les mesures d'inhibition enzymatique de la cyclooxygénase.



Composé	R ¹	R ²	R ³	Inhibition de COX-1	Inhibition de COX-2	Libération du profène %, 10µM ^b	Prolifération PC3 (% inhibition à 100 µM) ^c
				CI ₅₀ , µM ^a	CI ₅₀ , µM ^a		
Ketoprofène	-	-	-	0,33	0,69	100	0
18a	H	A	-ONO ₂	0,45	0,77	73	26
19a	CH ₃	A	-ONO ₂	0,60	0,73	70	26
22a	-ONO ₂	A	-CH ₂ ONO ₂	0,58	0,74	79	21
Suprofène	-	-	-	0,56	2,75	100	0
18b	H	B	-ONO ₂	0,58	5,80	46	7
19b	CH ₃	B	-ONO ₂	0,57	4,56	86	13
22b	-ONO ₂	B	-CH ₂ ONO ₂	0,48	2,70	73	33
Carprofène	-	-	-	59	38	100	5
18c	H	C	-ONO ₂	110	65	88	CI ₅₀ = 48 µM
19c	CH ₃	C	-ONO ₂	123	45	100	CI ₅₀ = 48 µM

^aLes valeurs de CI₅₀ présentées sont la moyenne d'au moins quatre expériences.

^bLes pourcentages de libération sont mesurés après 22 h d'incubation, en utilisant les mêmes échantillons de sang que pour l'inhibition enzymatique.

^cMoyenne de trois expériences, temps d'incubation de 72 h.

Tableau 2 : Métabolisation et activités des dérivés des profènes

Ces bons résultats de libération conduisent à s'intéresser à l'inhibition de la cyclooxygénase par les composés fonctionnalisés. On peut constater que leurs valeurs de CI_{50} d'inhibition sur les deux isoformes sont extrêmement proches de celles obtenues avec les profènes commerciaux dans le cas du kétoprofène et du suprofène : ceci confirme à la fois la bonne libération, et le fait que NO n'influence pas aux concentrations qui nous intéressent la cyclooxygénase exprimée. Dans le cas du carprofène, les modulations par estérification conduisent à une baisse des capacités d'inhibition de la cyclooxygénase par un facteur 2, qu'il paraît difficile d'expliquer sans une étude mécanistique poussée, à moins de prendre ici en compte une influence de NO sur l'expression de l'enzyme. De plus, il faut rappeler que les valeurs de libérations sont mesurées à une concentration initiale en donneur de NO de 10 μM bien supérieure à la CI_{50} à cause des contraintes de sensibilité de détection en CLHP, ce qui a probablement une influence sur la vitesse et la quantité de métabolisation possible dans le laps de temps qui nous intéresse ici.

Enfin, il faut noter que ces expériences sont réalisées sur du sang *in vitro* : on peut donc mesurer l'influence directe de nos composés sur la cascade enzymatique, mais pas leur influence quantitative sur l'expression de ces enzymes. Une éventuelle synergie des fonctions que présentent nos molécules ne peut être mesurée avec notre protocole, alors qu'elle est attendue *in vivo* dans le cadre de composés mixtes inhibiteurs de cyclooxygénase / donneurs de NO.

b) Inhibition de la prolifération des cellules PC3

(a) Mesures effectuées après 72h d'incubation

Lors de nos essais de prolifération cellulaire, nous nous sommes basés en premier lieu sur un temps d'incubation de 72 heures, classiquement utilisé en pharmacologie cellulaire.

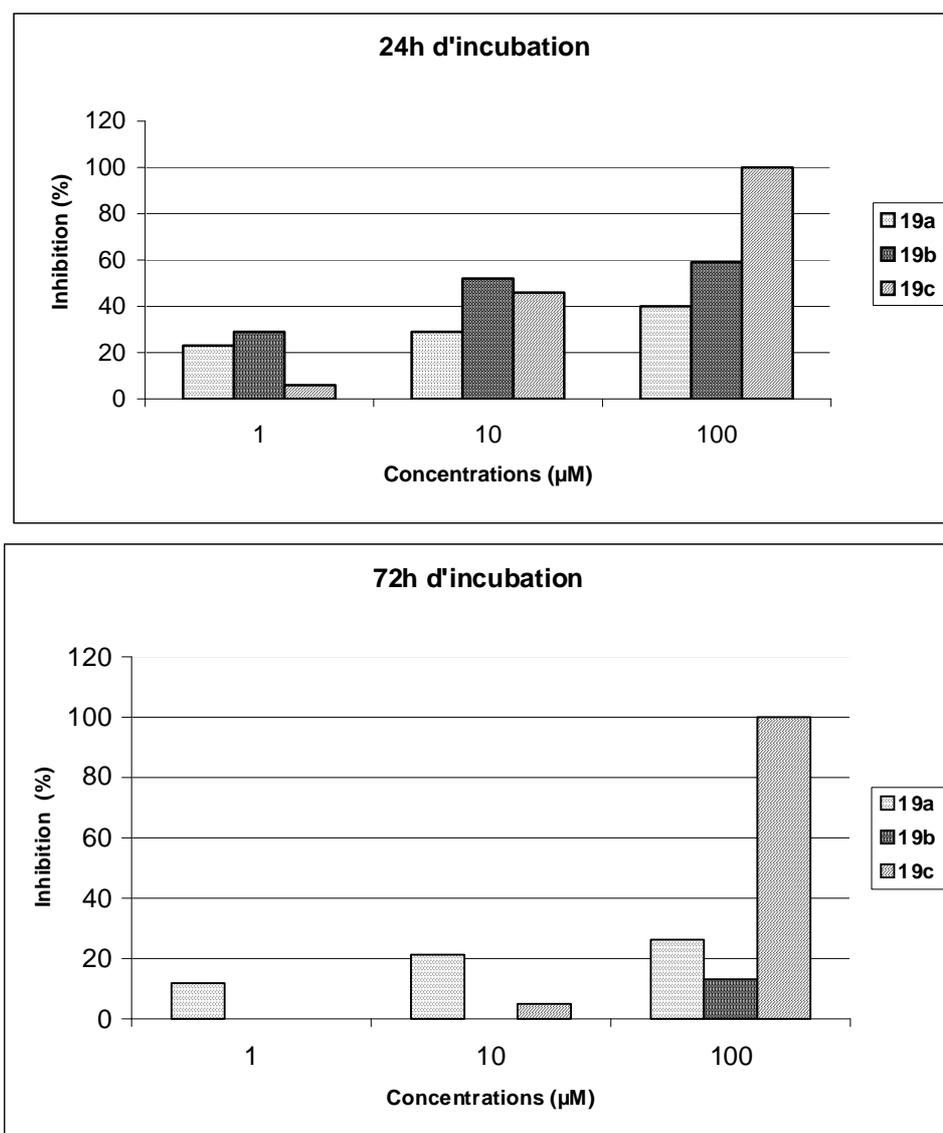
Lors de ces expériences, nous avons été surpris de ne pas constater d'activité de la part du kétoprofène ainsi que du suprofène malgré leurs bonnes valeurs d'inhibition en évaluation enzymatique, le carprofène présentant une faible activité. Il semble alors exclu de lier directement inhibition de la cyclooxygénase et inhibition de la prolifération cellulaire. En revanche, l'ajout d'un donneur de NO à ces molécules permet de leur conférer une certaine activité antiproliférative, que l'on pourrait donc associer uniquement à la libération du NO. Les CI_{50} des dérivés du carprofène (**18c** et **19c**) fonctionnalisés semblent particulièrement intéressantes, compte tenu de la grande résistance de la lignée cellulaire PC3.

La différence chimique entre un ester nitrique « primaire » et un ester nitrique « secondaire » ne semble pas être retranscrite dans les activités pharmacologiques mesurées. En revanche, les résultats obtenus avec les doubles donneurs de NO sont mitigés : en effet, le kétoprofène double donneur **22a** ne présente pas une activité supérieure à son homologue monodonneur **18a** ou **19a**, alors que dans le cas du suprofène cette différence est significative. Il semble alors nécessaire ici d'augmenter le nombre de molécules à disposition pour essayer de corréler l'activité antiproliférative de nos dérivés de profène au nombre de groupements ester nitrique présents sur la molécule. Ceci permettra de déterminer si l'ajout du NO a un effet « équivalent-dépendant » ou s'il existe un plafond aux bénéfices que nous pouvons en tirer.

(b) Cinétique d'inhibition de prolifération cellulaire

Si on prend en compte le temps de demi-vie de nos composés en milieu sanguin et les résultats de prolifération cellulaire, il est légitime de se demander quels sont les effets de nos composés à différents temps d'incubation avec des cellules de type PC3. Nous avons donc cherché à connaître l'impact de certains profènes donneurs de NO sur la prolifération cellulaire après 24 et 72 heures d'incubation.

Nous avons obtenu les résultats suivants :



Il est alors évident que nos composés présentent une activité bien plus importante si elle est mesurée après 24 heures d'incubation et non 72. On peut alors obtenir des CI_{50} de l'ordre de 10 µM sur notre lignée cellulaire pour un composé tel que le **19b**. Ceci est probablement dû à l'activité métabolique des cellules : en effet, il est probable que pendant les 24 premières heures d'incubation la quantité de NO présente dans le milieu soit importante et donc conduise à des effets antiprolifératifs importants ; après 72 h d'incubation, la quantité de NO diminue de façon importante et les cellules se remettent à se diviser de façon incontrôlée. Il semble finalement intéressant de se pencher sur l'activité des *prodrugs* à temps de demi-vie court en utilisant des protocoles d'évaluations de durée limitée afin de se rapprocher des conditions qui seraient obtenues *in vivo*.

En plus de ces manipulations et au vu de ces résultats, il aurait été intéressant de se pencher sur l'action de nos composés administrés de manière séquencée. Par exemple, l'ajout toutes les 24 h d'une dose inférieure et le suivi de la survie cellulaire pourraient présenter un certain intérêt.

2. Diarylpyrazoles

a) *Inhibition enzymatique*

Dans le chapitre concernant la cyclooxygénase, nous avons pu présenter les premières évaluations pharmacologiques de nos composés dérivés de diarylpyrazoles. Nous pouvons donc maintenant les comparer aux résultats obtenus après ajout d'un donneur de NO (tableau 3).

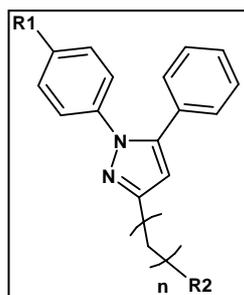
Il est tout d'abord intéressant de constater que la fonctionnalisation des alcools 7a,b,c en esters nitriques 24a,b,c influe assez peu sur l'activité inhibitrice des composés, et ce malgré un relargage de l'alcool à partir de l'ester nitrique mesurée située entre 10 et 16%. Ceci indiquerait que les valeurs d'inhibition mesurées sont dues pour 80% aux esters nitriques, qui posséderaient alors une activité propre (difficile toutefois à estimer à cause du processus permanent de métabolisation). Il est cependant possible que cette libération estimée soit faussée : en effet, les diarylpyrazoles ont un temps de rétention moyen très proche de celui de certains composants du sang, ce qui rend l'exploitation du chromatogramme obtenu délicate.

Les diarylpyrazoles estérifiés par une chaîne linéaire alkyle portant un donneur de NO (25,b,c) présentent une activité significative comparé aux équivalents acides carboxyliques. Ceci peut être dû à l'estérification, qui empêche une interaction des acides avec les protéines du sang, le composé circule alors plus facilement, et peut alors se lier à la COX, avant ou après clivage de la liaison ester par les estérases. Il est effectivement possible que l'ester ne soit pas clivé rapidement, et qu'il présente une capacité inhibitrice intrinsèque, même si cela paraît peu probable à cause de la forte activité des estérases dans le sang.

Les composés présentant un double donneur de NO amené par le biais d'une fonction ester (27a,b,c) n'ont quant à eux qu'une faible activité sur la cible, et les résultats semblent en contradiction avec les autres évaluations pharmacologiques. La chute d'activité peut néanmoins être expliquée, si on considère que l'ester devient trop encombré pour se lier de façon stable et efficace à la cyclooxygénase. Dans ce cas, l'activité mesurée ne correspondrait qu'à la faible activité des acides résultant de la métabolisation de ces composés.

Ici encore, la mesure exacte de l'interaction entre le NO et l'expression de la cyclooxygénase (en particulier COX-2) est difficile à estimer. A ce niveau, il serait intéressant de se pencher sur le relargage des composés de façon précise, en mettant au point une technique permettant de l'estimer sans perturbation par la composition du sang. Ainsi, nous serons capables de déterminer quel est le composé dont nous mesurons l'activité, et d'en déduire la part d'activité de chaque métabolite.

b) *Inhibition de prolifération cellulaire (lignée PC3)*



Molécule	R1	R2	n	Inhibition de COX-1 ^a	Inhibition de COX-2 ^a	Spécificité COX-1/COX-2
Célécoxib	-	-	-	CI ₅₀ = 13 μM	CI ₅₀ = 0,8 μM	16,3
7a	H	-CH ₂ OH	0	69	0	0
24a	H	-CH ₂ ONO ₂	0	75	0	0
5a	H	-COOH	0	44	0	0
25a	H	-COO(CH ₂) ₂ ONO ₂	0	41	0	0
27a	H	-COOCH ₂ (CHONO ₂)CH ₂ ONO ₂	0	0	0	0
6a	H	COOH	1	37	0	0
7b	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ OH	0	60	32	0,5
24b	-SO ₂ CH ₃	-CH ₂ ONO ₂	0	32	59	1,8
5b	-SO ₂ CH ₃	-COOH	0	56	15	0,3
25b	-SO ₂ CH ₃	-COO(CH ₂) ₂ ONO ₂	0	23	59	2,6
27b	-SO ₂ CH ₃	-COOCH ₂ (CHONO ₂)CH ₂ ONO ₂	0	0	60	n/a
7c	-SO ₂ NH ₂	-CH ₂ OH	0	61	90	1,5
24c	-SO ₂ NH ₂	-CH ₂ ONO ₂	0	96	80	0,83
5c	-SO ₂ NH ₂	-COOH	0	0	10	n/a
25c	-SO ₂ NH ₂	-COO(CH ₂) ₂ ONO ₂	0	71	66	0,9
27c	-SO ₂ NH ₂	-COOCH ₂ (CHONO ₂)CH ₂ ONO ₂	0	30	0	0

^aPourcentage d'inhibition à une concentration de 10⁻⁴M ou (CI₅₀ pour le Célécoxib)

n/a : non applicable

Tableau 3 : Activité inhibitrice de cyclooxygénase des dérivés de diarylpyrazoles donneurs de NO

Au vu des résultats obtenus avec les dérivés de profènes, nous avons dès le début opté pour une étude cinétique de la prolifération cellulaire (après 24 et 72 heures d'incubation). Les résultats des essais menés sur nos molécules originales (dépliant de quatrième de couverture) sont présentés sous forme d'histogramme sur la figure 61.

Les résultats obtenus avec les composés **7a,b,c** ne sont par reportés sur les histogrammes car nous n'avons observé aucune inhibition de prolifération après incubation avec ces molécules. Même le composé **7c**, qui donne de bons résultats en inhibition enzymatique, ne présente aucun signe d'activité. Par contre, les dérivés acides **5a,b,c** qui possèdent un potentiel inhibiteur légèrement plus faible, ont montré un très léger pouvoir antiprolifératif. Ces résultats confirment la difficulté qu'il y a à toujours associer inhibition de COX-2 et inhibition de la prolifération cellulaire.

Cependant, on constate immédiatement l'activité importante des donneurs de NO, voire plus importante pour les composés **24a,b,c** que le Célécoxib utilisé ici comme référence ($CI_{50} \approx 40 \mu\text{M}$). On retrouve donc ici la tendance initiée lors des essais sur les dérivés de profènes, avec une forte activité induite par la libération de NO, même si l'effet temps est moins marqué.

Les dérivés possédant un ester nitrique directement voisin de l'hétérocycle **24** montrent une activité bien meilleure que les composés possédant un espaceur attaché par une fonction ester. Ceci peut être expliqué par une métabolisation moins complexe, comportant uniquement 2 étapes pour aboutir à la libération du radical. On sent bien ici que cette métabolisation est la principale responsable des disparités obtenues entre les différents composés porteurs de NO : entre la série **24** et la série **25**, la quantité de NO pouvant potentiellement être libérée étant la même, engendrant pourtant des résultats bien différents.

Ici encore, on observe que les dérivés porteurs d'un groupement sulfonamide, meilleurs inhibiteurs COX-2, semblent légèrement moins bons en activité antiproliférative que leurs homologues présentant des groupements $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ ou dépourvu de substituants en position para.

Au vu des résultats, il apparaît comme nécessaire de tenter de mieux comprendre le mécanisme de métabolisation et de pénétration de nos molécules dans la cellule, pour essayer de mieux comprendre les disparités que les modulations chimiques engendrent dans les résultats.

3. Cinétiques de libération de NO

Les évaluations pharmacologiques de nos composés, en particulier en prolifération cellulaire, ont révélé un effet dose dépendant et surtout temps dépendant pour les composés portant un donneur de NO. Il nous a donc semblé intéressant de chercher à comprendre les mécanismes sous-jacents à la libération de NO dans différents milieux : nous avons donc, après avoir évalué la décomposition chimique d'un de nos composés, procédé au suivi de cette libération par résonance paramagnétique électronique (RPE), ainsi que par relaxation de l'aorte de rat.

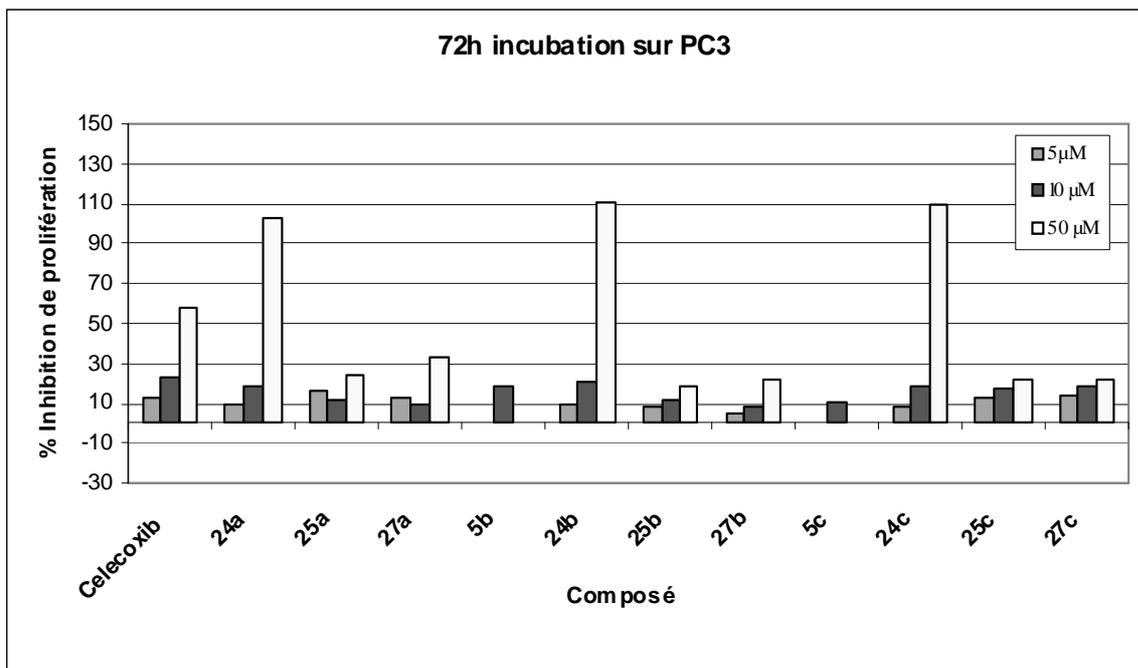
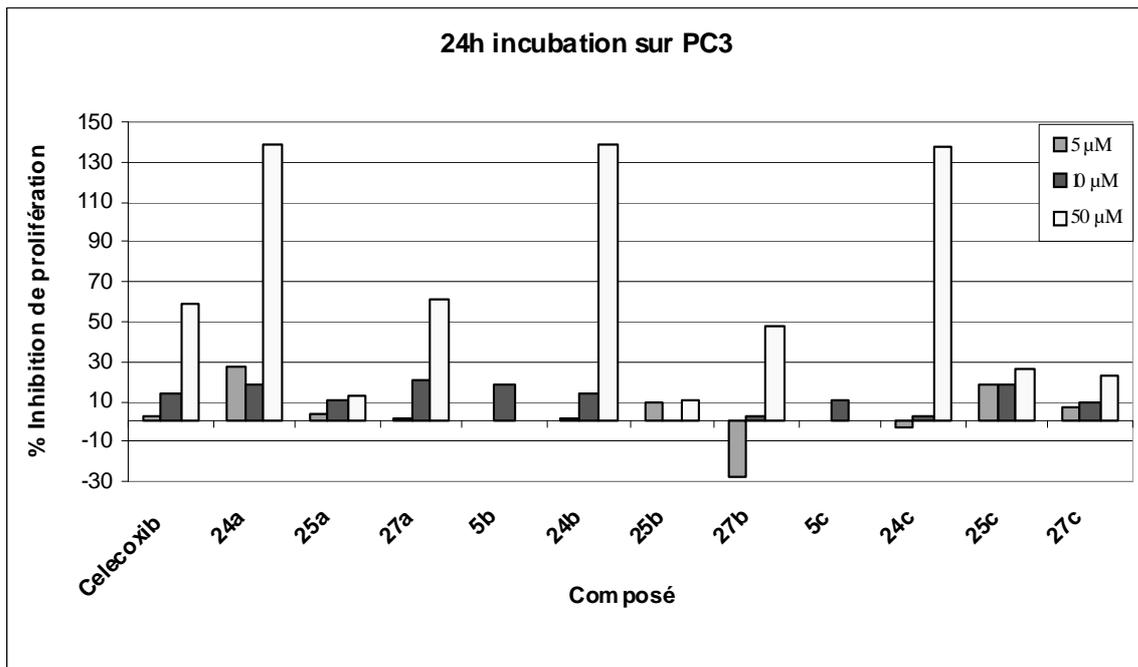
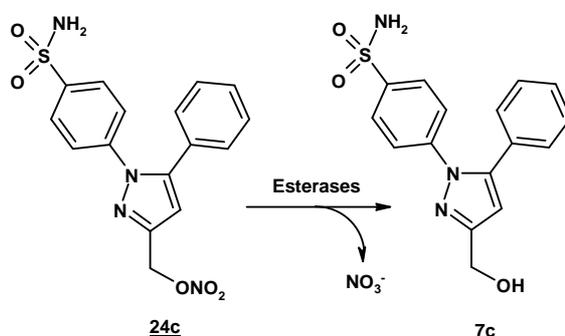


Fig. 61 : Évaluations d'inhibition de prolifération cellulaire des dérivés de diarylpyrazoles donneurs de NO après 24 et 72 heures d'incubation
(moyenne de 3 expériences)

a) Stabilité chimique

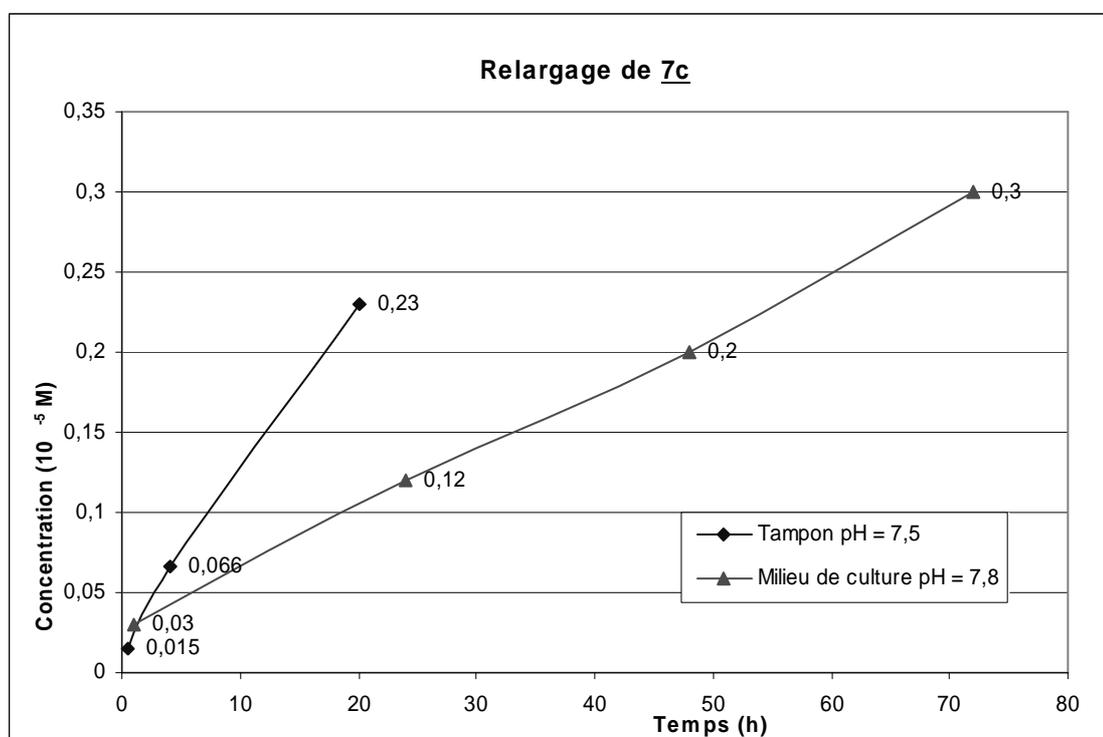
En premier lieu, il nous a semblé intéressant de nous pencher sur la cinétique de décomposition d'un de nos composés type en milieu tamponné. Nous avons choisi la réaction suivante :



A des intervalles de temps choisis en fonction de l'expérience et pour la cohérence, la quantité de composé **7c** dans chacun des milieux est mesuré par CLHP, en utilisant les aires sous la courbe.

La concentration en produit initiale a été choisie à 10^{-5} M pour deux raisons : la première est qu'elle est proche des CI_{50} sur enzymes ; la seconde est qu'elle est assez élevée pour être détectable par UV en CLHP.

Nous avons donc pu évaluer cette étape de métabolisation de nos composés, et les résultats sont résumés dans le graphique suivant :



On peut constater une certaine dégradation de nos composés sur les temps d'expériences choisis (pH = 7,8 mimant la solution dans laquelle baignent les cellules, et pH = 7,5 pour un tampon mimant le sang). Cette dégradation reste cependant relativement lente et modeste.

D'autre part, ces résultats sont intéressants car ils permettent de remettre en question la validité des évaluations pharmacologiques pour nos composés particuliers type *prodrugs*. La présence de certaines enzymes étant nécessaire, il faut s'assurer que toutes les évaluations que nous avons ou que nous allons effectuer sont représentatives, ou suffisamment proches des conditions *in vivo* auxquelles nos produits seraient soumis.

Concernant cet essai de libération, il faut noter que certaines hypothèses ont été émises et qu'elles n'ont pour le moment pas été vérifiées :

- la première étape de métabolisation est le clivage de l'ester nitrique pour libérer l'alcool, comme nous l'avons écrit plus haut
- la seule étape de métabolisation que nous pouvons observer pendant la durée des mesures est la libération du NO redonnant le produit de référence.

Ces deux hypothèses majeures sont réfutables. En effet, bien que très probable, rien ne nous assure que la première réaction que subit le produit **24c** est celle des estérases sur son ester nitrique. De plus, il est vraisemblable que le composé **7c**, une fois libéré, subisse une autre réaction de métabolisation qui empêcherait de mesurer sa libération de façon totale : un maximum de concentration serait observé, pendant qu'une partie de cet alcool serait transformé en un métabolite secondaire qui ne serait pas pris en compte pour la mesure de concentration. Enfin, il est possible que le taux circulant de nos composés soit très inférieur à la quantité réellement disponible et que nos composés soient parfois piégés dans d'autres compartiments (récepteurs, protéines plasmatiques...).

Néanmoins, ces mesures cinétiques de libération donnent une idée de ce qu'il advient de nos composés dans chacune de nos évaluations, et permettent de mieux apprécier la signification de nos résultats.

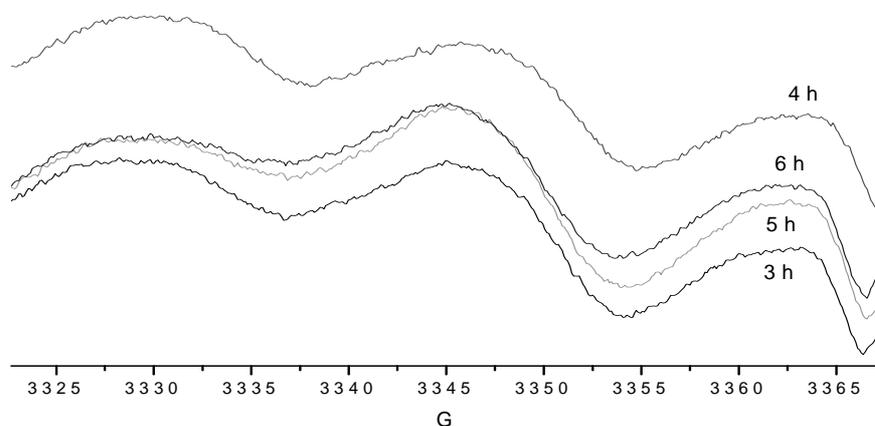
b) Libération de NO par RPE

La RPE permet de suivre la présence d'atomes comportant des électrons non appariés sur leurs couches électroniques. Typiquement, un radical présente ce type de propriété avec un spin non nul. Le NO, de par sa nature radicalaire, est donc un candidat idéal pour des études de RPE : sa libération à partir de nos composés pourra être suivie dans le temps, et nous allons pouvoir estimer la durée nécessaire à une métabolisation optimale.

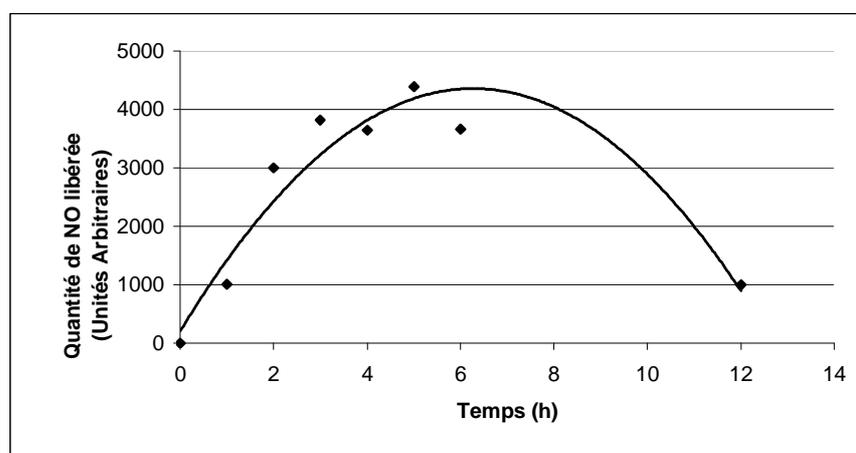
Le plus intéressant est de se pencher sur la dégradation des composés dans le sang, qui est le meilleur modèle *in vitro* quand il s'agit d'approcher le devenir métabolique d'un médicament, en particulier quand il s'agit d'une *prodrug*. Le problème majeur de cette approche est que le sang comporte des protéines possédant un noyau hème (en particulier l'hémoglobine) donc un ion ferreux, ce qui est une des raisons pour laquelle le NO a un temps de demi-vie aussi court (quelques secondes). Or ces ions ont tendance à piéger les radicaux et à les rendre silencieux en RPE. Une manière de contourner ce problème est d'utiliser un capteur de radicaux libres (*scavenger*) plus efficace que le fer et permettant de conserver un signal important. Plusieurs équipes ont travaillé sur le sujet, et il nous a semblé intéressant d'utiliser pour nos expériences le N,N-diéthylthiocarbamate (Samouilov, A. et Zweier, J. L., 2002) comme nous l'avons précisé précédemment.

Le protocole retenu consiste en une mesure de la quantité de NO libérée à partir du composé kétoprofène mono donneur de NO **19a** dans le sang, et ce sur une durée de 12 h environ, après avoir vérifié que le sang ne possède pas de signal propre.

Après accumulation des données, nous avons obtenu les courbes suivantes pour une concentration initiale de 10^{-5} M en composé :



Le NO présente bien le triplet attendu centré à 3345 G. Un traitement mathématique particulier nous permet de présenter la courbe suivante d'évolution de la concentration en NO en fonction du temps :



On peut constater que la mesure du NO dans le milieu présente son maximum autour de 6 heures d'incubation. On peut analyser la présence d'un maximum de plusieurs façons. Tout d'abord, la libération de NO semble se faire de manière progressive sur plusieurs heures. La métabolisation de nos composés serait donc relativement lente dans le sang. Ensuite, après 6 heures d'incubation, la dégradation naturelle du complexe *scavenger* – NO prend le pas sur la libération effective du radical

Il faut noter ici que la courbe s'organise selon des quantités relatives et non pas absolues. En effet, pour avoir accès à la quantité réelle de NO libéré, il serait nécessaire de réaliser une abaque afin d'avoir un étalon pour nos mesures, par exemple en utilisant du nitroprussiate de sodium.

En conclusion, la libération de NO à partir de nos composés semble efficace. Il serait intéressant de continuer l'étude pour tenter d'obtenir des valeurs quantitatives, et de constater (ou non) un recoupement avec les valeurs de relargage de la molécule parent. Toutefois, la mise au point de cette méthode de détection va permettre à l'avenir une étude systématique de la métabolisation de ce type de *prodrug* dans le sang, et de justifier la variation des valeurs obtenues en fonction du temps lors des essais de cinétique de prolifération cellulaire.

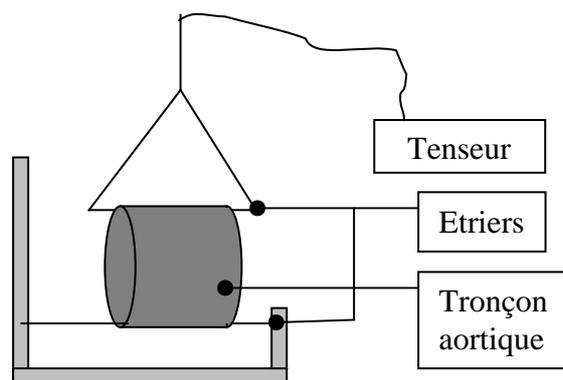
c) *Mesure de l'activité vasodilatatrice sur aorte isolée de rat*

Afin d'essayer d'apprécier l'effet d'une libération de NO au niveau de la circulation sanguine, ainsi que de sa pénétration dans les cellules, nous avons voulu évaluer l'action de nos composés en tant que vasodilatateurs. Ceci a pu être réalisé par des essais sur un modèle *ex vivo* de dilatation artérielle, sur des tronçons aortiques de rat. Après mise au point du protocole, nous avons pu tester certains de nos composés diarylpyrazoles dans le laboratoire de pharmacologie du Pr. R. Bordet.

(a) Principe du modèle et mise en place

L'action du NO sur les cellules musculaires lisses, passant par la guanylate cyclase, conduit à une vasodilatation en influant sur un système en équilibre permanent. Cette propriété du monoxyde d'azote est exploitée dans plusieurs pathologies, comme nous l'avons vu au début de ce chapitre. Nous avons donc mesuré la dilatation engendrée par certains de nos composés, ce qui revenait à constater la libération du NO en périphérie d'un organe, et donc la bonne métabolisation de l'ester nitrique.

Ceci est réalisable en isolant des tronçons d'aorte de rat dont la contraction (extrapolée de la variation de dilatation du tronçon) est suivie lors d'ajout de composés dans le bain d'incubation. Un système d'étriers couplé à une interface informatique permet de suivre cette variation qui sera mesurée en « grammes force » (gF). Le tronçon doit être placé dans un milieu thermostaté contenant suffisamment de nutriments pour permettre à l'organe de demeurer dans le même état physiologique pendant toute la durée de l'expérience (liquide de Krebs, composition en annexe).



Les aortes sont prélevées sur des rats vivants de manière suffisamment rapide pour éviter une mort tissulaire trop importante au niveau de l'aorte, mais en évitant un stress mécanique excessif pour ne pas lyser les cellules et perturber la matrice extracellulaire. Après prélèvement et placement en milieu de survie, les tissus conjonctifs et gras sont retirés précautionneusement afin de ne conserver que les cellules musculaires lisses (ainsi que l'endothélium dans la majeure partie des expériences). Par aorte, entre 2 et 4 tronçons viables

sont obtenus, et les expériences présentés ont toutes été réalisées sur au moins 2 animaux sur lesquels au moins 2 tronçons ont été prélevés. Après montage sur les étriers et application d'une légère tension, l'organe est laissé au repos pendant une heure (détails de la manipulation en annexe).

La contraction de l'artère est réalisée par de la phényléphrine (PE) (Fig. 62), un agoniste des récepteurs α -adrénergiques. Dans un organisme vivant, son temps de demi-vie est d'environ 3h (chez l'homme). Dans un organe isolé, ce temps est considérablement allongé. La PE peut donc être utilisée pour contracter l'organe en début d'expérience, et permettre à un vasodilatateur donneur de NO d'agir, en considérant un temps d'expérience inférieur à 3h, sans dégradation de PE (et donc décontraction) trop importante.

L'étalon de vasodilatation choisi est le nitroprussiate de sodium (SNP) (Fig. 62), qui en tant que donneur de NO va agir sur les cellules musculaires lisses. De part sa grande activité, il va nous permettre d'établir une valeur de « dilatation maximale » en fin d'expérience.

Un autre moyen d'obtenir une vasodilatation importante est de passer par une action de l'endothélium vasculaire. Ceci peut être réalisé par l'ajout d'acétylcholine (ACh) (Fig. 62) dans le milieu, qui est un neurotransmetteur dont un des effets est de déclencher une vasodilatation par des récepteurs associés situés dans l'endothélium. Ce protocole permet de s'assurer d'un prélèvement correct de l'organe, l'endothélium étant le premier tissu touché en cas de mauvaise manipulation.

Les résultats sont présentés soit sous forme de force appliquée au tenseur, soit en terme de pourcentage de décontraction par rapport à la valeur maximale obtenue en fin d'expérience avec une concentration de 10^{-3} M en SNP, en utilisation la formule :

$$\% \text{ Relaxation} = (\text{tension maximale} - \text{tension mesurée}) / (\text{tension maximale} - \text{tension minimale})$$

Après vérification de la validité de nos procédés de prélèvement d'organe, la valeur de tension de repos optimum et la quantité de PE permettant d'obtenir la meilleure sensibilité vont être déterminées. Ceci nous a permis de tester plusieurs dérivés de diarylpyrazoles dans les meilleures conditions de reproductibilité possible.

(b) Vérification d'une manipulation correcte pour les étapes de dissection et de montage

Afin de vérifier que la méthode choisie ainsi que la réalisation de la dissection et du montage sont valides, des expériences de dilatation / contraction de l'aorte ont été réalisées.

Pour ce faire, nous avons tendu les organes de manière exagérée, à environ 3,5 gF. L'ajout d'une grande quantité de PE (10^{-3} M) a conduit à une contraction de l'organe à des valeurs pouvant atteindre 6,5 gF (cf. valeurs à concentration nulle en ACh présentées page suivante).

Nous avons ensuite procédé à une mesure « d'effet dose » de l'ACh sur la relaxation des tronçons (obtention d'une concentration croissante d'ACh par ajouts successifs dès l'atteinte d'une valeur palier de tension).

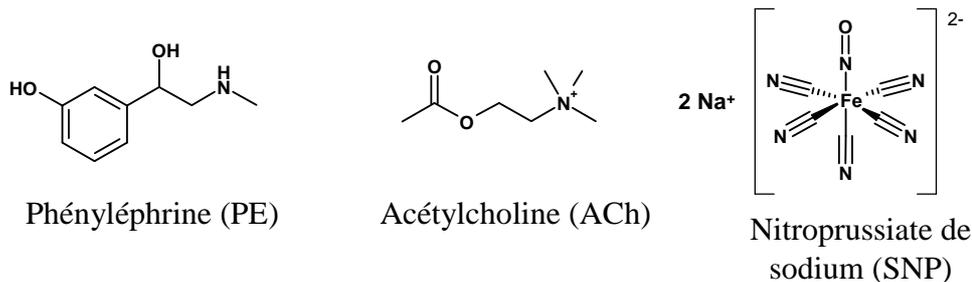
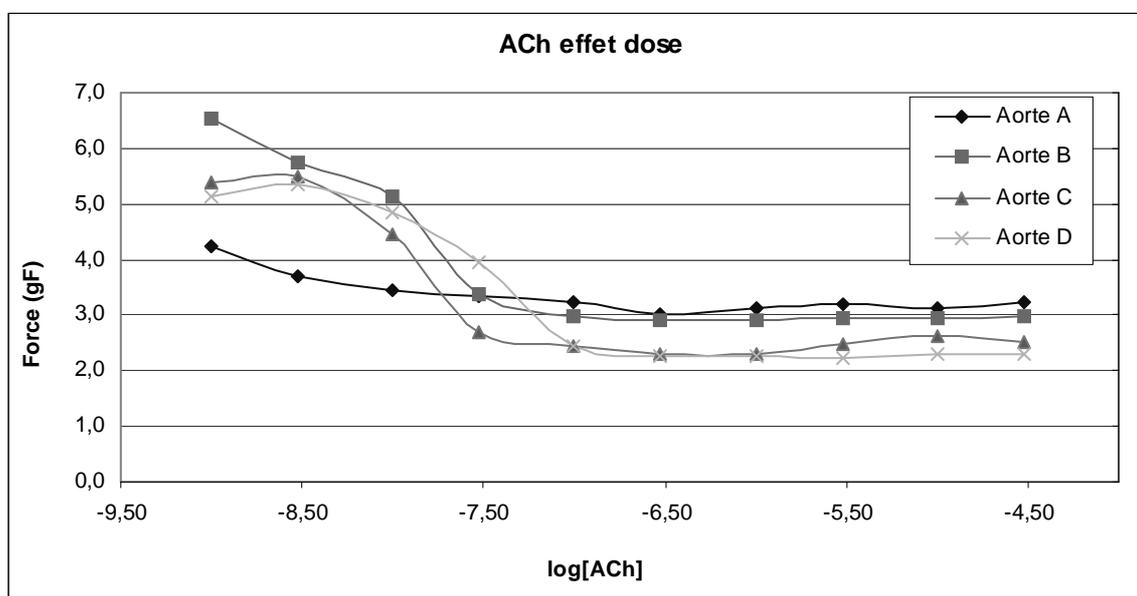


Fig. 62: Composés de référence utilisés lors des expériences de vasorelaxation



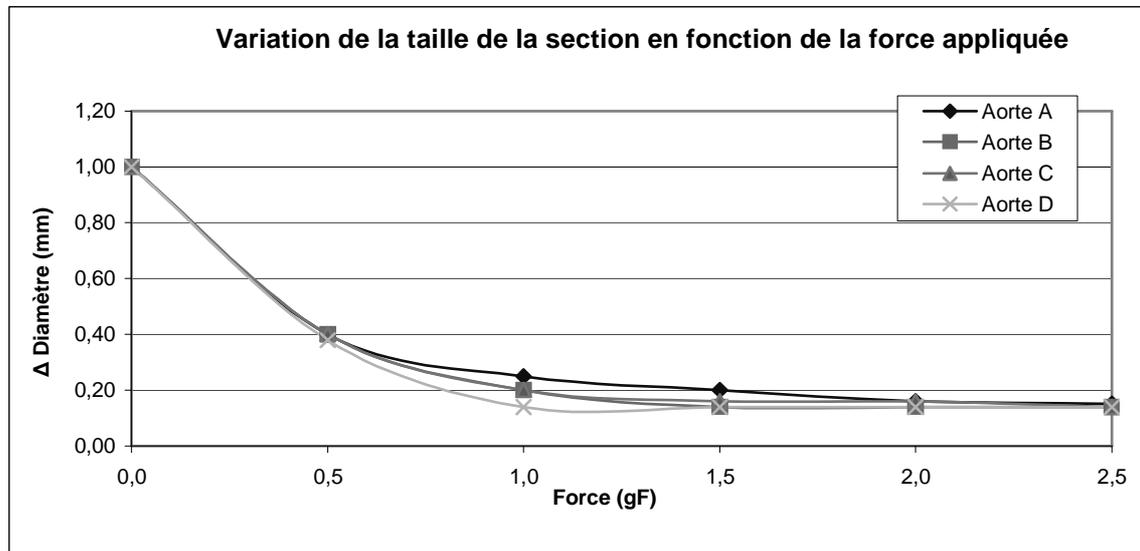
Nous pouvons alors conclure que les aortes B, C, D ont été prélevées correctement, l'ACh exerçant son effet décontractant. L'aorte A présente une faible contraction après ajout de PE, et très peu de dilatation lors de l'ajout de différentes concentrations d'ACh. Ceci montre que, lors de la dissection, l'aorte a subi un stress mécanique important et n'a pas été prélevée assez rapidement, l'artère ayant été retirée après la mort de l'animal. Le sang a donc pu former des caillots, et les différents tissus n'ont pas été correctement préservés.

(c) Détermination de la tension de repos optimale

Lors de cette mise au point, le but était de normaliser la tension appliquée à l'aorte après montage sur les étriers et avant ajout de PE, pour se retrouver dans des conditions permettant de détecter toute réponse des tissus sans pour autant engendrer de stress mécanique risquant de perturber les mesures.

Il s'agit donc de mesurer la variation de la dimension de la lumière aortique après modification de la force appliquée par le tenseur équipant les étriers. Lorsque le diamètre ne

varie plus malgré une augmentation de la force appliquée, c'est donc que l'organe est déjà tendu : on doit se placer initialement à la force suffisante pour permettre un bon contact tissu / étrier sans déformation. Ceci revient à annuler la dérivée de la fonction « diamètre = f (force) », donc à atteindre le palier de la courbe représentant la variation de diamètre en fonction de la force appliquée :



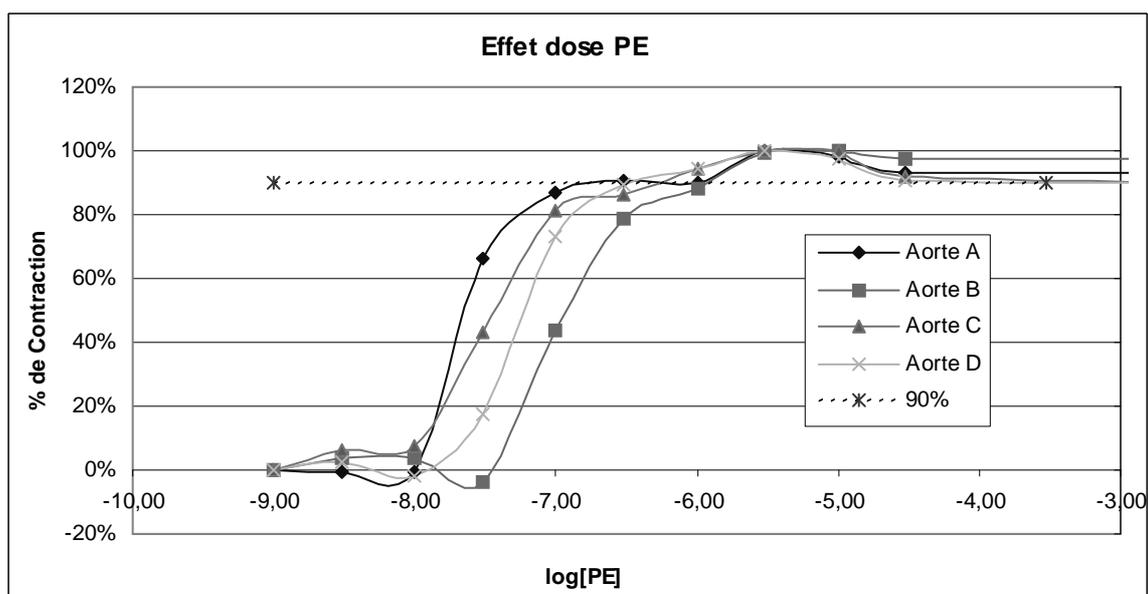
On peut constater que la valeur permettant de satisfaire cette condition se situe à 1,5 gF.

Dans la suite, nous nous sommes donc placés à une force initiale appliquée de 1,5 gF.

(d) Quantité de phényléphrine utilisée

Lors de manipulation de décontraction aortique, les conditions de contraction sont importantes et peuvent grandement influencer sur les résultats. Après avoir établi une tension de repos convenable, il est nécessaire d'établir quelle quantité de PE va permettre d'assurer une bonne contraction des tissus sans exagération de la réponse. Concrètement, la quantité de PE permettant d'obtenir environ 90% de contraction (par rapport à une contraction maximale obtenue avec une grande quantité de PE) est communément admise comme standard de mesure.

Nous avons donc procédé, sur une aorte prétendue à 1,5 gF, à une mesure d'effet/dose de la phényléphrine.



On constate que sur les quatre aortes utilisées, une concentration de 10^{-6} M en phényléphrine permet d'obtenir la contraction voulue.

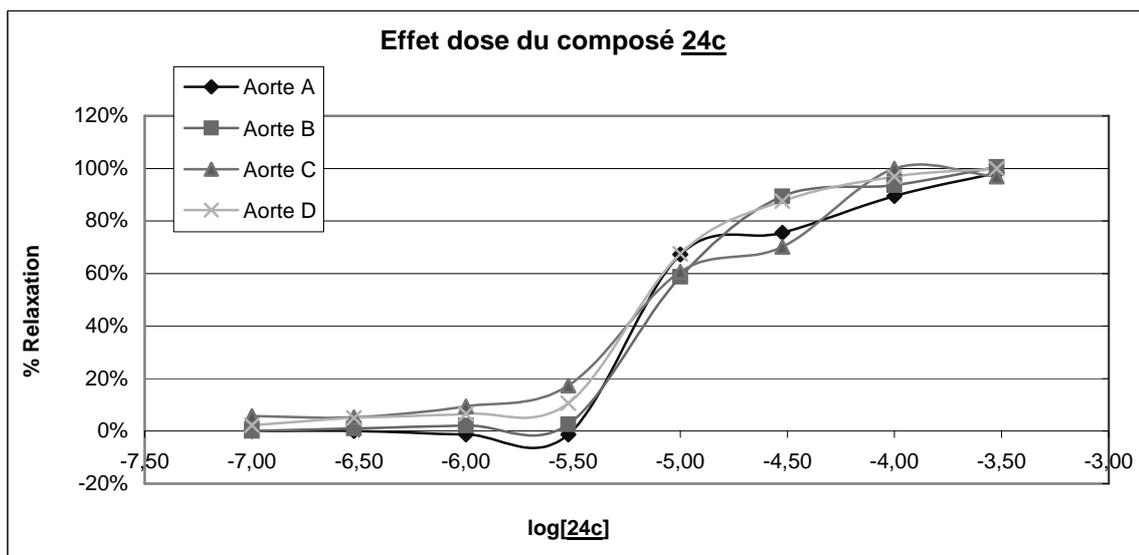
Dans la suite, les expériences de relaxation aortique ont été conduites avec une tension de repos de 1,5 gF, après contraction par une concentration de 10^{-6} M en phényléphrine.

Nous avons en parallèle tenté de retirer l'endothélium des aortes, pour essayer de maximiser la réponse aux différents composés. En effet, le système vasculaire est en équilibre permanent entre contraction / dilatation, équilibre dans lequel l'endothélium joue un rôle important. Retirer cette couche cellulaire aurait permis de se focaliser sur l'action des cellules musculaires lisses, et de calculer une CI_{50} de nos composés valable sur ces cellules. Cependant, bien qu'utile dans le cadre d'une évaluation pharmacologique totale, ce type d'expériences n'est que peu corrélable avec des expériences in vivo et perd donc ainsi une partie de son intérêt. De plus, les manipulations requises sont extrêmement délicates, les premiers essais réalisés ayant conduit à une détérioration très importante de la couche de cellules musculaires lisses.

(e) Comparaison d'un composé donneur de NO avec le composé parent

Nous avons commencé par appliquer la technique ise au point, sur un « couple » de molécules, c'est-à-dire DAP / DAP couplé à un donneur de NO (**7c/24c**).

Après ajout du composé **24c** dans le milieu d'incubation, nous avons obtenu les courbes suivantes sur des tronçons provenant de 4 aortes différentes :



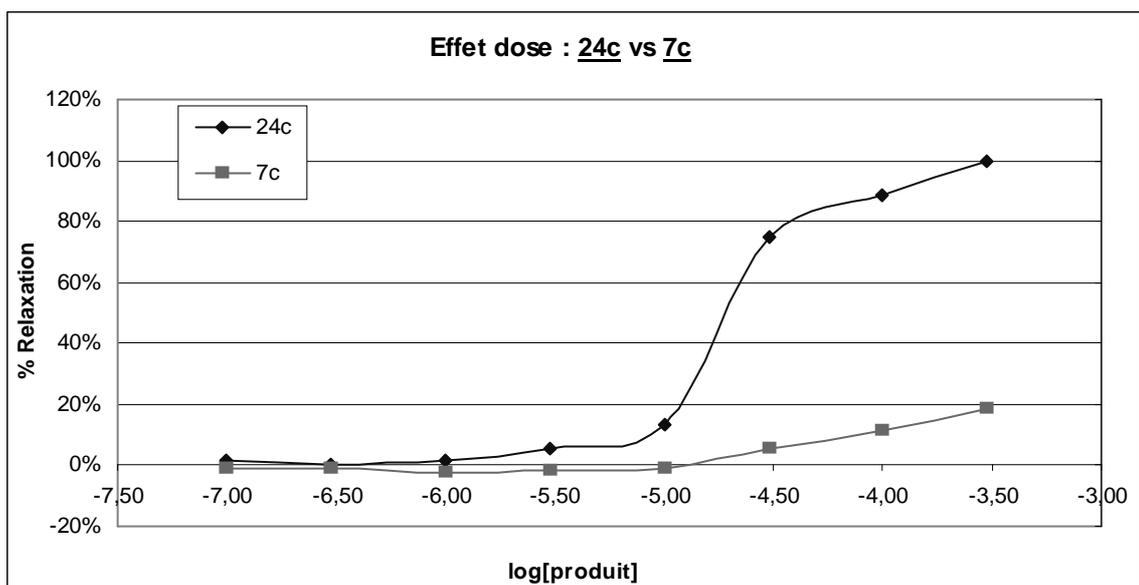
On peut constater sur le graphique que les aortes ont bien réagi, avec un effet dose marqué avec le composé **24c** (Fig. 63). Cependant, de par la nécessité d'une réaction enzymatique pour libérer le NO, les temps d'attente de palier sont relativement longs, temps qui augmente avec la quantité introduite : avec des concentrations en donneur de NO supérieures à $3 \cdot 10^{-5}$ M, il est nécessaire d'attendre la stabilisation de l'organe pendant plus de 15 minutes. L'allure des courbes pour de fortes concentrations témoignent alors d'une légère altération des tissus.

Cependant, on peut considérer que les mesures sont valables autour de 50% de relaxation et ceci permet de calculer la CI_{50} du produit, qui se situe autour de $8,5 \mu\text{M}$.

Pour vérifier que l'effet était bien médié par NO, nous avons testé le métabolite du **24c** après libération du donneur de NO, c'est-à-dire le composé **7c**.

De la même manière que précédemment, le pourcentage de relaxation est mesuré comparativement à la dilatation maximale obtenue avec une grande quantité de SNP.

On obtient les courbes suivantes :



Les expériences ont été réalisées en doublet, les produits couplés ayant été testés sur des tronçons aortiques provenant du même animal.

On obtient de nouveau pour le composé **24c** le même type de courbe que précédemment avec ici une CI_{50} se situant à $15\mu M$ environ. Une incubation avec son équivalent dépourvu d'ester nitrique n'a pas permis d'atteindre 50% de dilatation même à très forte concentration, ce qui souligne l'importance du NO dans l'obtention de l'effet pharmacologique.

Cependant, nous avons observé une dilatation non négligeable à partir de 10^{-4} M pour le composé **7c**. Ceci peut être dû à plusieurs raisons :

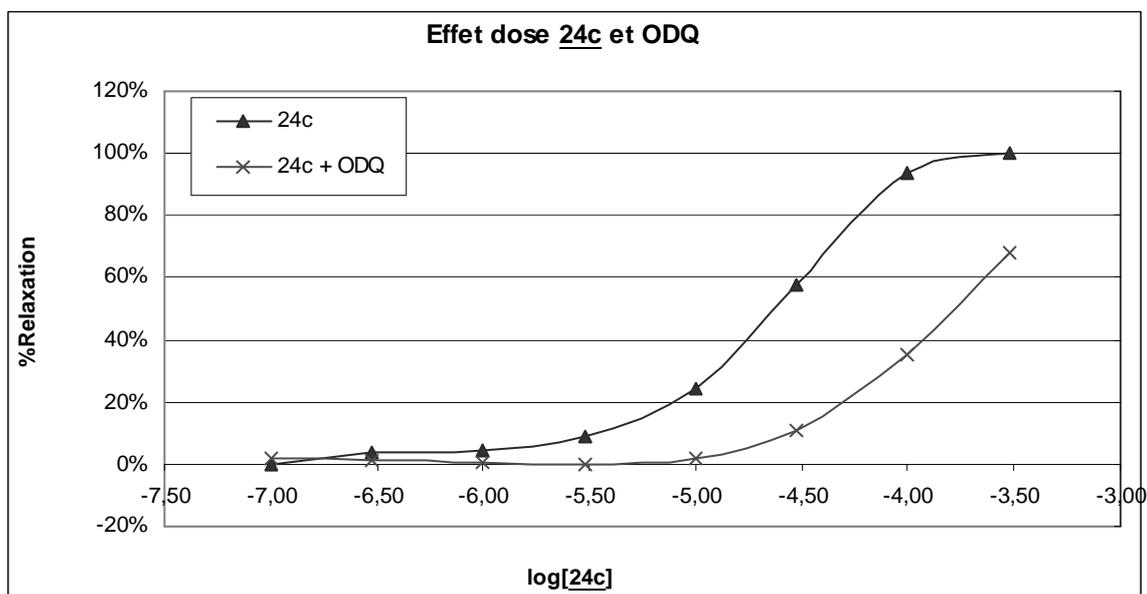
- un effet intrinsèque de la molécule sur l'aorte, qui serait donc dotée d'un faible effet vasorelaxant
- une altération des tissus, résultant en une diminution de sa résistance
- une diminution de la quantité de PE présente dans le milieu par métabolisation de cet outil pharmacologique.

Il est peu probable que notre composé soit un agent vasodilatateur, puisqu'il ne présente aucune analogie structurale avec ces familles de composés connus. En revanche, connaissant le temps de demi-vie de la PE, il est probable que sa dégradation soit à l'origine de cette « relaxation », sans doute amplifiée par une « fatigue » des tissus due au stress mécanique qui leur est appliqué. Il est important de préciser qu'ici également le temps d'expérience est relativement long.

(f) Confirmation d'un effet lié au radical NO

L'ODQ (ou 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) est un inhibiteur de la guanylate cyclase. Il est donc possible d'utiliser cette molécule pour paralyser les voies d'actions de NO dans la vasodilatation, qui mettent en jeu GMPc (Fig. 43B).

Nous avons donc voulu, après les résultats obtenus lors des expériences de relaxation vasculaire avec les composés **24c** et **7c**, utiliser de l'ODQ pour vérifier que l'effet dilatateur était bien dû à l'action de NO sur les cellules musculaires lisses. La quantité d'ODQ utilisée ici est de $2,5\mu M$, correspondant à sa CI_{50} .



On constate que les courbes obtenues sont similaires à celles exposées précédemment. Ici encore, une certaine relaxation est constatée à forte concentration, qui peut s'expliquer de la même manière que précédemment.

Expérimentalement, nous nous sommes intéressés à des courbes d'effets doses afin de pouvoir calculer les CI_{50} de nos composés. Elles ne peuvent donc retranscrire les différents temps d'attente de palier. Ici particulièrement, les courbes d'effets dose semblent indiquer que l'ODQ ne parvient pas à annuler tout l'effet du NO, alors que la littérature est unanime sur le sujet. Il convient alors de préciser que dans les cuves contenant cet inhibiteur de la guanylate cyclase, les temps d'attente de palier sont extrêmement longs (plus d'une heure). En plus de la fatigue des tissus et de la métabolisation de la PE, on peut considérer qu'une partie de l'OQD est également métabolisée, ce qui va se traduire par des valeurs de relaxation supérieures à celles attendues.

Il existe plusieurs moyens de contourner ce problème. Le premier est de prendre les mesures à un temps fixe ou dès que la première cuve présente une valeur stable, ce qui est délicat dans le cas de nos composés car le temps d'attente varie considérablement selon les quantités introduites dans le milieu de survie.

Une seconde option est la réalisation de courbes « d'effet temps », où une simple dose de produit (typiquement permettant d'atteindre sa CI_{50}) est ajoutée, afin de suivre l'évolution de la relaxation en fonction du temps. Il serait intéressant de faire ce type de manipulations plus rigoureuses dans le cadre d'une étude de relaxation vasculaire plus poussée.

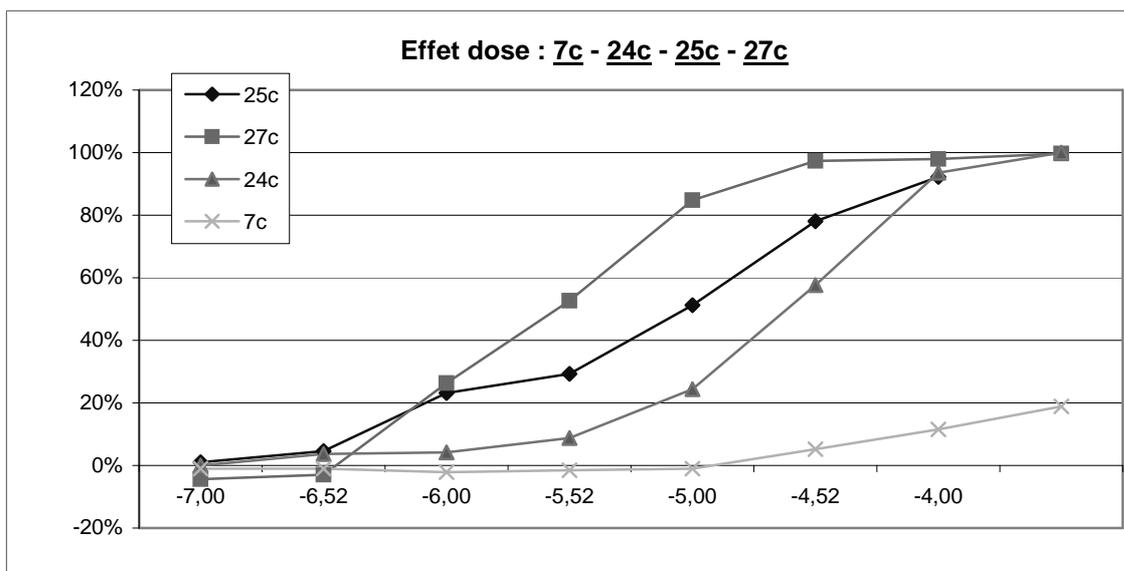
(g) Comparaison 24c/7c/27c/25c

Malgré le léger pourcentage d'erreur inhérent au protocole suivi, nous avons vu et prouvé que l'effet de vasodilatation obtenu après ajout du composé **24c** était dû principalement à la libération de NO dans le milieu. Dès lors, l'utilisation de composés permettant la libération de plusieurs équivalents de ce messenger radicalaire présente un intérêt évident, qui peut être mis en évidence par l'évaluation, sur notre modèle ex vivo, de dérivés de diarylpyrazoles doubles donneurs de NO comme le **27c**.

Nous avons donc voulu comparer dans des mesures « effet / dose » et en prenant le composé **7c** comme référence, les molécules suivantes :

- le composé **24c**, déjà évoqué
- le composé **25c**, monodonneur possédant une liaison ester modifiant les étapes de métabolisation
- le composé **27c**, double donneur de NO.

Les courbes suivantes obtenues sont présentées page suivante.



En plus de la bonne reproductibilité des tests, ces expériences ont permis de déboucher sur un certain nombre de conclusions.

On constate, sur ces courbes, que les composés 25c et 24c ont des profils assez similaires, même si l'augmentation de l'effet du composé 25c semble plus progressive. Le groupement actif ici est le NO, qui est présent en quantité équivalente dans ces deux molécules : il est possible que la métabolisation se fasse plus facilement sur le composé 25c. En effet, le clivage de la liaison ester présente sur cette molécule, doit pouvoir se faire avant la libération de NO, ce qui aurait pour résultat de faciliter la métabolisation de l'ester nitrique grâce à un encombrement moindre autour de la fonction d'intérêt. Lors de nos expériences, nous avons constaté une attente de palier moins longue pour le composé 25c comparé au 24c.

Au niveau du composé 27c, on constate immédiatement qu'il entraîne une plus grande activité de relaxation de l'aorte. On peut établir une CI_{50} d'environ $3 \mu M$ pour ce composé sur cette expérience, alors que celle du 24c se situe autour de $8 \mu M$. La molécule possédant un double donneur de NO est bien deux fois plus active que la molécule ne possédant qu'un ester nitrique, ce qui confirme le potentiel de nos molécules.

(h) Conclusion des expériences de vasodilatation

Après avoir établi un protocole de dissection permettant une bonne viabilité des tronçons aortiques prélevés, ainsi que les conditions optimales pour réaliser nos expériences, diverses molécules ont été testées.

Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence la capacité vasodilatatrice d'une de nos molécules possédant un ester nitrique. La comparaison avec l'équivalent dépourvu de donneur de NO a pu montrer l'importance de ce médiateur dans la réponse des tissus, ce qui a été confirmé par les mêmes expériences conduites avec et sans inhibiteur de la guanylate cyclase, empêchant ainsi le NO d'exercer son action au niveau des cellules musculaires lisses. Enfin, l'évaluation de la CI_{50} de divers composés a permis de mettre en avant les différences d'efficacité de relaxation induites par des molécules présentant un ou plusieurs donneurs de NO.

Ceci confirme la bonne libération de NO à partir de nos composés en milieu physiologique *ex vivo*, ce qui est une étape importante dans la compréhension des mécanismes chimiques et pharmacologiques de ce type de composés.

De plus, nous avons soulevé dans l'étude bibliographique de la cyclooxygénase et de ses inhibiteurs le problème récurrent de certains représentants de la classe des coxibs, leur action délétère au niveau vasculaire ayant entraîné le retrait du marché d'un de leur tête de file. Il semble alors judicieux, dans ce contexte, de pousser l'étude de l'impact de la libération de NO simultanée à la prise de ce type de médicament. En effet, nous pouvons anticiper une possible « annulation » de l'influence sur le réseau artériel et veineux d'un coxib couplé à un donneur de NO, type d'effet auquel la recherche s'intéresse de plus en plus.

G - CONCLUSION SUR LES COMPOSES MIXTES INHIBITEURS DE CYCLOOXYGENASE DONNEURS DE NO

Après avoir constaté dans la littérature l'intérêt du monoxyde d'azote dans un certain nombre de fonctions physiologiques normales ainsi que dans certains dérèglements, en particulier le cancer, nous avons vu l'intérêt que des molécules présentant à la fois un potentiel d'inhibition de COX ainsi qu'un groupement chimique capable de libérer du NO pouvaient apporter.

Dans le cadre de nos synthèses, l'incorporation d'un ester nitrique pouvant remplir cette fonction a été envisagée. Tout d'abord, la modulation de profènes déjà connus a permis de mettre en place une chimie particulière, qui a conduit à des composés présentant des résultats pharmacologiques intéressants : en inhibition enzymatique sur sang total, nous avons pu constater la bonne libération du profène parent et des valeurs de CI_{50} conservées. Les expériences d'inhibition de prolifération cellulaire ont confirmé l'intérêt de NO dans le traitement du cancer, tout en nuancant l'efficacité de l'inhibition pure de COX-2 dans la pathologie. Après avoir constaté que ces effets étaient fortement dépendants du temps d'incubation, il nous a paru judicieux de nous pencher sur la cinétique de libération de NO dans le sang à partir d'un profène comportant un ester nitrique. Retenir la RPE comme approche permet le suivi et la comparaison des quantités libérées de façon efficace et novatrice.

Sur les dérivés de diarylpyrazoles, le même type de travail a été conduit. Ici encore, les bons résultats d'inhibition enzymatique de la plupart de nos composés nous ont amené à conduire des expériences d'inhibition de prolifération cellulaire. Les résultats sont ici plus complexes que ceux obtenus avec les profènes, certains des composés étant mesurés plus actifs après 24 h d'incubation alors que d'autres ne présentent pas de différences marquées. Ici également, l'intérêt de l'inhibition pure de COX-2 dans la pathologie cancéreuse peut être remis en question. Nous avons donc cherché à mieux cerner les cinétiques liées à la libération de NO pour ces composés de manière la plus proche possible de l'*in vivo* : l'approche de relaxation vasculaire sur aorte de rat isolée nous a ainsi permis de vérifier que la métabolisation des produits conduit efficacement à la libération de NO actif et de façon dose dépendante.

Suite à ce travail, et au vu des résultats préliminaires obtenus concernant la vectorisation d'une molécule par un peptide, nous nous sommes intéressés à l'ajout sur le peptide vecteur d'un groupement capable de libérer du NO en milieu physiologique, en essayant d'opter pour une chimie facilement généralisable à d'autres cibles.

Chapitre V :

***Vectorisation par action de la PSA et
ajout d'un groupement donneur de NO***

Nous avons vu tout l'intérêt que comportaient les composés possédant un groupement capable de libérer du NO dans les conditions physiologiques, que ce soit au point de vue de l'activité anti-tumorale aussi bien qu'au niveau de la diminution des effets secondaires des inhibiteurs de cyclooxygénase. De même, le travail réalisé sur la vectorisation de ce type d'inhibiteur par un peptide montre que cette approche est prometteuse.

C'est donc dans la continuité de notre travail qu'ont été abordées la conception, puis la synthèse d'un peptide présentant un groupement donneur de NO et permettant par la suite de vectoriser un de nos composés, par le mécanisme de cyclisation de l'espaceur présenté dans le chapitre III.

A - TRAVAUX EXISTANTS

Il existe très peu de travaux relatant la synthèse de peptide portant un groupement chimique capable de libérer du monoxyde d'azote. Il existe cependant une certaine somme d'informations concernant la S-nitrosylation des protéines et des peptides au cours de la prise de donneurs de NO de type vasodilatateur, ou bien dans différents processus physiologiques normaux (cf. chapitre concernant le NO). Il semble alors logique que les travaux concernant le couplage d'un peptide et d'un donneur de NO se penchent presque exclusivement sur la chimie de S-nitrosylation de certains peptides. On peut en effet comprendre l'intérêt limité d'un seul peptide portant un groupement donneur de NO comparativement à un composé bien plus simple pouvant libérer du NO tel que la trinitrine, sauf dans le cas de vectorisation spécifique.

1. S-nitroso-peptide

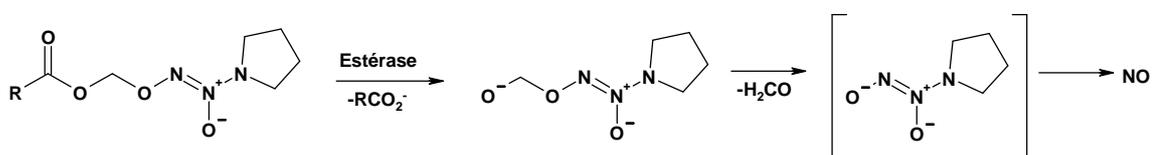
Il est évident que la S-nitrosylation ne peut pas se faire sur n'importe quel acide aminé mais nécessite la présence d'une cystéine sur la chaîne peptidique. Plusieurs types de réaction sont disponibles pour conduire à cette fonction sur des protéines de toutes tailles (Taldone F. S. et al., 2005), la majeure partie étant basée sur le « transfert » d'un NO par un donneur de NO en solution sur le thiol de la cystéine, par utilisation de NO gazeux ou de NONOates. Une autre voie de synthèse classique nécessite l'utilisation de nitrite de sodium (Al-Sa'doni H. H. et al., 2000b), mais les rendements sont d'autant plus mauvais que la chaîne peptidique est plus longue.

Dans tous les cas, la synthèse de peptides S-nitrosylés conduit à des composés extrêmement instables. Plusieurs équipes se sont penchées sur cette stabilité dans différents milieux (Butler A. L. et al., 1998). Tout d'abord, l'analyse même de ces composés pour établir leur présence est problématique, étant donné qu'il est connu qu'une détection en masse de type électrospray clive cette fonction. Ensuite, la conservation de ces produits est rendue difficile par les différentes réactions qu'ils peuvent déclencher. Nous pouvons notamment citer la formation de ponts disulfures (Al-Sa'doni H. H. et Ferro A., 2000a), la transnitrosation (Peterson L. A. et al., 2007), la photo-décomposition (Namiki S. et al., 1999), ou bien sûr la décomposition thermique. Ces réactions de dégradation semblent catalysées par la présence de cations métalliques tels que les ions cuivres (Dicks A. P. et al., 1996).

Au niveau pharmacologique, plusieurs composés ont été évalués comme vasodilatateurs (Al-Sa'doni H. H. et al., 2000b ; Jia L. et Stamler J. S., 1999), ou plus rarement comme inhibiteurs des phosphatases (Xian M. et al., 2000).

2. Vectorisation du NO par un substrat de la PSA

Dans le cas du cancer de la prostate, nous avons vu dans les chapitres précédents le potentiel thérapeutique des donneurs de NO, ainsi que l'utilisation pouvant être faite de la PSA. En tenant compte de la chimie particulière des diazeniumdiolates, une équipe a développé un concept de peptide vecteur permettant après clivage par la PSA la libération de NO, donc théoriquement uniquement dans la prostate (Tang X. et al, 2001). Les quelques composés synthétisés reposent sur le mécanisme suivant :



On retrouve ici l'intérêt d'une vectorisation vers les cellules cancéreuses, permettant d'éviter les effets vasodilatateurs sur le système cardiovasculaire du NO. Cependant, et pour cette raison, l'action de NO se limitera à la prostate et n'aura pas d'effets sur les métastases et dans une moindre mesure sur l'angiogenèse.

Dans le cadre de notre travail, et après avoir montré l'apport d'un donneur de NO couplé à nos molécules dans le cancer de la prostate, et après avoir exploré les possibilités de vectorisation, nous avons voulu combiner les deux approches en proposant la synthèse d'un composé inhibiteur de cyclooxygénase donneur de NO vectorisé.

B - CONCEPTION DE LA MOLECULE

Nous nous sommes basés sur le même inhibiteur de cyclooxygénase que dans le chapitre sur la vectorisation, c'est à dire le composé **7b**, qui sera lié au peptide choisi de la même manière et selon la même chimie. Cependant, la méthode que nous avons utilisée pour coupler le donneur de NO à l'inhibiteur de cyclooxygénase n'est ici plus envisageable, l'alcool de **7b** servant à porter le groupement ester nitrique étant déjà engagé dans la liaison avec le peptide. Il va alors être nécessaire de faire porter un donneur de NO par la séquence peptidique, qui devra être dans notre cas légèrement modifiée pour permettre d'y ajouter ce type de fonction.

1. Modification de la séquence peptidique

Le choix de la séquence en acides aminés du peptide retenu dans le chapitre sur l'utilisation de la PSA en vectorisation ne comporte pas de site facilement modulable. Nous allons donc devoir en modifier légèrement la séquence, en prenant en compte les interactions nécessaires et suffisantes dans le site de clivage de l'enzyme. Si on se réfère à la nomenclature présentée figure 35, et en reconsidérant les interactions présentées, il semble intéressant de remplacer l'acide aminé en C-terminal par une cystéine qui prendra donc la place P'1. En effet, la cystéine devrait être capable de former des liaisons de Van der Waals en fond de poche S'1 avec His⁵⁷ tout en formant un couple intéressant avec la glutamine en P1, qui « forcerait » la PSA à cliver le peptide entre ces 2 acides aminés (Coombs G. S. et al., 1998). Le peptide serait donc facilement reconnu et clivé par la PSA.

De plus, au point de vu chimique, le thiol présent sur la cystéine permet d'envisager différentes modulations, que ce soit par thioalkylation ou encore par S-nitrosylation.

2. Incorporation du groupement donneur de NO

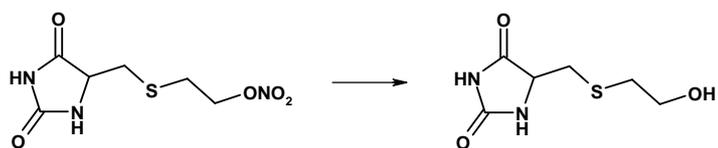
Nous avons vu que les S-nitrosothiols portés par des cystéines présentent une très faible stabilité. Au vu de la chimie et des évaluations pharmacologiques nécessaires, nous n'allons pas utiliser ce type de fonctionnalisation.

En revanche, la thioalkylation d'une cystéine est une réaction pouvant se faire dans des conditions suffisamment douces, et conduisant à une liaison assez stable pour envisager de poursuivre un schéma de synthèse tout en la conservant sur la molécule. Nous avons, dans le chapitre sur les donneurs de NO, présenté le 1-bromo-2-nitrooxyéthane comme synthon permettant des alkylations tout en étant capable de libérer du NO de manière efficace dans les évaluations pharmacologiques. Nous pouvons donc envisager la thioalkylation de la cystéine par ce produit.

Bien que cette option permette probablement d'augmenter la stabilité du produit, il sera intéressant de mesurer l'influence de la thioalkylation sur la reconnaissance par la PSA du peptide. De même, la stabilité réelle du peptide portant la fonction donneurs de NO devra être évaluée avant de pouvoir envisager la suite des manipulations : ceci pourra être effectué après

modulation d'un peptide-amide, présentant l'avantage d'avoir un groupement moins réactif qu'un peptide-acide classique en C-terminal.

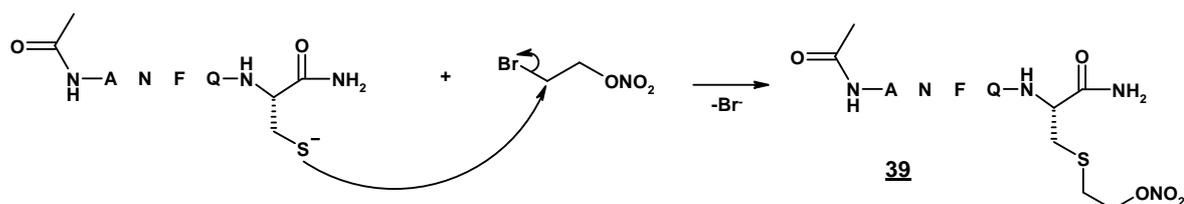
La suite de la synthèse pourra alors être conduite de manière similaire après fonctionnalisation de la cystéine. Après clivage par la PSA, et cyclisation intramoléculaire, un dérivé d'hydantoïne devrait être libéré de façon similaire aux travaux présentés dans les chapitres précédents : dans ce cas particulier, il s'agira d'une hydantoïne pouvant porter un donneur de NO susceptible de se métaboliser en alcool de structure suivante :



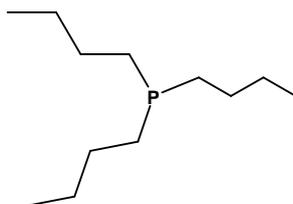
C - SYNTHESE ET ETUDE DE LA STABILITE DU PEPTIDE DONNEUR DE NO

Après obtention du peptide Ac-ANFQC-NH₂, et après nous être assurés de sa structure ainsi que de sa pureté, nous avons abordé sa thioalkylation.

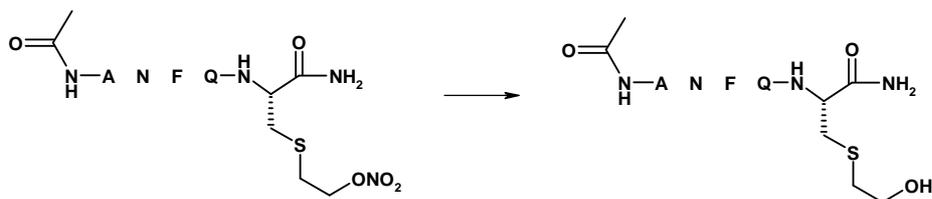
Le thiol étant une fonction acide, le thiolate va pouvoir réagir par substitution nucléophile sur le carbone portant le brome du bromonitrooxyéthane, pour conduire au thioéther **39**.



Les essais réalisés sans base et reposant sur l'équilibre de présence entre le thiol et le thiolate dans l'eau n'ont pas été concluants car présentant une cinétique très lente. Différents essais ont alors été conduits afin de mesurer l'influence du pH sur la réaction (tampon phosphate à pH 7, 1 équivalent de triéthylamine, plusieurs équivalents de carbonate de césium) et du solvant (eau, DMF, mélange de solvants...). Nous avons pu constater la formation du thioether, mais ces différentes manipulations n'ont pas été concluantes à cause de la formation de ponts disulfure dans le milieu réactionnel, avec une cinétique concurrente à celle de la formation du thioether. Après avoir établi que l'association carbonate de césium dans un mélange d'eau et de DMF conduisait aux meilleurs résultats (disparition du réactif de départ en quelques heures), nous avons alors envisagé de limiter cette réaction secondaire dans le milieu. Ceci est possible avec l'utilisation de composés tels que la tri-(n-butyl)phosphine, qui va empêcher l'oxydation des thiols :



Nous avons alors constaté une nette diminution de la formation de ponts disulfure au cours de la réaction. Cependant, il est alors possible d'observer la formation d'un autre produit, que nous avons pu identifier comme le produit de dégradation résultant de la libération de NO à partir de l'ester nitrique :



La formation de ce produit semble spontanée et indépendante des paramètres réactionnels, nos essais pour en faire diminuer l'apparition n'ayant pas abouti. Nous avons donc entrepris, après précipitation du milieu réactionnel dans l'éther pour en retirer les réactifs insolubles en excès, de purifier le mélange obtenu par chromatographie préparative.

Malgré la relative facilité de séparation des produits obtenus, nous avons constaté une dégradation rapide et spontanée dès le passage sur la colonne du peptide donneur de NO. Il nous a alors semblé être intéressant de procéder à une étude de cinétique de dégradation, qui nous a permis de constater un temps de demi-vie relativement court (2h) du peptide possédant un ester nitrique, rendant difficile la suite de la synthèse ou toute purification. Les essais d'amélioration des conditions de synthèse et de purification n'ont pu nous faire parvenir pour l'instant à une pureté satisfaisante, et les différents solvants utilisés ont tous conduit à une dégradation du composé.

Ces résultats sont assez surprenants. En effet, lors des évaluations de stabilité des esters nitriques sur nos composés organiques inhibiteurs de cyclooxygénase, ces groupements n'avaient présenté qu'une faible dégradation après 30 heures d'incubation dans des milieux tamponnés à pH physiologique, ce qui laissait présager une stabilité suffisante pour le travail envisagé sur le peptide. Obtenir plus de détails sur cette dégradation pourrait nous permettre dans la suite de mieux appréhender ce type de réaction et de moduler notre schéma de synthèse de façon à parvenir au composé final souhaité.

Malgré ces résultats préliminaires décevants sur la synthèse d'un peptide donneur de NO permettant de vectoriser un inhibiteur de cyclooxygénase, persévérer dans cette voie semble prometteur dans la conception de nouveaux composés anticancéreux. La modification éventuelle du peptide envisagé au départ (par exemple par remplacement de la cystéine par une sérine, directement fonctionnalisable en ester nitrique), le réarrangement du schéma de synthèse (avec thioalkylation en dernière étape) ou encore le choix d'un autre groupement donneur de NO sont des possibilités présentant toutes des avantages et des inconvénients chimiques comme pharmacologiques, qu'il convient de mieux documenter avant de poursuivre le travail sur cet objectif.

*Conclusion et
perspectives*

L'inhibition de la cyclooxygénase, en particulier de son isoforme COX-2 surexprimée dans le cancer de la prostate, est présentée comme potentiellement intéressante dans la chimioprévention et la chimiothérapie de cette pathologie, aussi bien au niveau de la prolifération des cellules cancéreuses que de leur invasivité.

Les inhibiteurs de COX, sélectif ou non de l'isoforme 2, sont nombreux sur le marché ou dans les laboratoires, et principalement utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Ainsi, l'optimisation du concept d'inhibition de cette enzyme dans le traitement du cancer de la prostate nous est apparu comme un objectif prometteur et s'inscrivant dans l'effort de recherche international contre le cancer.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons ainsi cherché à progresser dans la résolution de deux problèmes majeurs inhérents à l'utilisation des inhibiteurs de cyclooxygénase, à savoir :

- éviter les troubles systémiques, en particulier gastro-intestinaux et cardiovasculaires liés à la modification du métabolisme de l'acide arachidonique
- augmenter le potentiel antiprolifératif de cette classe de molécules.

Tout d'abord, la conception et l'étude de nouveaux inhibiteurs sélectifs COX-2 nous ont permis de distinguer, grâce à leur évaluation en inhibition enzymatique sur sang total, certains dérivés de diarylpyrazoles voisins du célécoxib comme base de modulations intéressantes en terme de synthèse chimique et d'intérêt pharmacologique.

Conscient de la difficulté récurrente à utiliser des inhibiteurs enzymatiques dans un contexte de pathologie localisée, nous avons alors cherché à vectoriser un de nos composés afin de limiter son activité à la prostate. L'utilisation d'un espaceur novateur reliant vecteur peptidique, reconnu par une protéase spécifique (PSA), et inhibiteur, devait permettre la libération de ce principe actif à proximité de la cible. La cinétique du réarrangement intramoléculaire mise en jeu a donc été étudiée, et les essais sur PSA purifiée ont été concluants en aboutissant à une libération effective de l'inhibiteur de cyclooxygénase. Notre volonté d'orienter la chimie nécessaire à la synthèse de l'espaceur vers une chimie de peptide déprotégé dans des conditions relativement douces permet d'espérer une généralisation du procédé dans plusieurs pathologies présentant une surexpression spécifique d'une protéase.

Par ailleurs, en vue de l'utilisation de ce type de composés dans le traitement de fond de pathologies longues telles que le cancer, il a été évoqué dans la littérature que l'adjonction d'un groupement capable de libérer de l'oxyde nitrique permettait de diminuer certains des effets secondaires, en particulier au niveau de la muqueuse gastrique. Ces *prodrugs*, les « CINODs », ont également montré des propriétés antiprolifératives intéressantes que la connaissance de l'implication du NO dans différents aspects du cancer permet d'expliquer. Sachant que ces effets sont extrêmement dose-dépendants et encore sujets à débats, il est apparu crucial de tenter d'élargir le panel de composés à disposition afin d'explorer les mécanismes chimiques et physiologiques sous-jacents à l'activité de ces CINODs. Après la conception et la synthèse d'un certain nombre de ces *prodrugs*, leur évaluation en inhibition enzymatique et prolifération cellulaire sur des cellules issues du cancer de la prostate au stade hormono-indépendant ont été réalisées. Elles ont permis de souligner l'intérêt d'un apport massif de NO sur les cellules cancéreuses, tout en nuancant l'intérêt d'une simple inhibition de COX-2.

Fort de ces nouvelles informations sur l'importance de NO, il nous a ensuite semblé indispensable de comprendre les mécanismes et cinétiques de libération de ce radical à partir de l'ester nitrique, après s'être bien sûr assuré de sa stabilité en solution et de la bonne

métabolisation des composés dans le sang. L'utilisation de la technique de Résonance Paramagnétique Electronique a permis de réaliser ces études de façon originale et directe. Les données ainsi collectées nous ont conduits à nous intéresser à la pénétration de NO dans la cellule à partir de nos diarylpyrazoles modulés. En utilisant une approche *ex vivo*, la vasorelaxation d'aortes de rat, nous avons pu confirmer d'une part une métabolisation dans le tissu aortique et, d'autre part, la possible utilisation du radical NO dans la diminution des effets secondaires cardiovasculaires des coxibs.

Enfin, nous avons tenté de réunir la vectorisation par un peptide et la libération de NO sur un seul composé trifonctionnel. L'instabilité du peptide donneur de NO par dégradation de l'ester nitrique en alcool n'a pas permis pour l'instant d'envisager l'aboutissement du projet tel que conçu initialement.

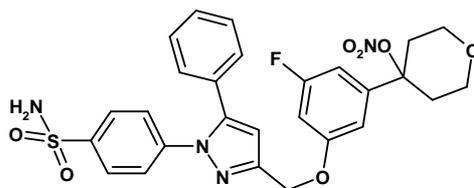
Le travail présenté ici a donc permis d'apporter des éléments de réponse nouveaux en vue de l'utilisation d'inhibiteurs de cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate. Cependant, il reste une quantité importante de travaux à conduire pour valider certains concepts.

Tout d'abord, au niveau de la vectorisation peptidique, il semble important d'exemplifier la chimie en utilisant des séquences d'acides aminés différentes. En effet, il est essentiel de montrer la possibilité de généralisation de la chimie développée ici. De plus, ceci permettra à terme de développer des peptides ligands plus spécifiques des protéases ciblées et ainsi d'améliorer la sélectivité de la vectorisation.

Du point de vue de l'intérêt pharmaco-chimiques, il est nécessaire de poursuivre les évaluations démarrées sur l'inhibiteur vectorisé. Tout d'abord, l'étude de la métabolisation du composé par une PSA non plus introduite de façon artificielle dans le milieu d'incubation mais produite par des cellules humaines telles que la lignée cancéreuse prostatique hormono-dépendante LNCaP, sera déterminante. Ceci permettra, par la suite, de s'orienter vers la validation du concept sur des modèles *in vivo*, de type souris xénogréffées, une fois le peptide vecteur optimisé pour n'être reconnu que par la PSA.

Concernant les inhibiteurs de cyclooxygénase donneur de NO, la synthèse des γ -carbolines donneuses de NO sera poursuivie et exemplifiée. L'utilisation de différents espaceurs sur l'ensemble de nos molécules nouvellement synthétisées nous permettra de mieux comprendre les hypothèses publiées quant à l'activité de certains dérivés de l'aspirine. De même, l'utilisation de donneurs de NO différents devrait permettre de moduler la cinétique de libération du radical et d'optimiser l'activité des *prodrug* sur nos modèles. Les résultats ainsi obtenus permettront de reprendre la conception de la molécule tripartite peptide vecteur – inhibiteur de cyclooxygénase – donneur de NO de façon plus rationnelle.

La diversification chimique de nos composés reste également possible. Au delà de la « simple » modulation des groupements, il serait intéressant, dans la continuité des travaux du laboratoire, de synthétiser des composés de type inhibiteurs mixtes de cyclooxygénase (par un motif diarylpyrazole) et de lipoxygénase (par un motif dérivé du ZD-2138, inhibiteur de 5-LOX) donneurs de NO. Ces travaux sont actuellement en cours, sur des structures du type :



En prenant en compte les différents commentaires soulevés par la communauté scientifique sur la validité de l'utilisation *in vivo* d'anticancéreux basés sur le NO, une étude *in vitro* plus large de l'influence de nos composés sur les différents aspects de la pathologie est primordiale pour confirmer ou infirmer les doutes exprimés. En effet, la mise en évidence de l'influence réelle des CINODs sur des modèles d'invasion et d'angiogenèse, ainsi que par des tests plus significatifs d'apoptose paraît déterminant pour compléter les connaissances acquises lors de simples tests de prolifération cellulaire. De même, la réalisation de spectres RPE à partir de suspensions cellulaires nous fera percevoir le devenir métabolique réel de ces *prodrugs*.

Enfin, nous avons constaté en confrontant les résultats des évaluations enzymatiques et ceux de mesure de prolifération cellulaire, une absence de corrélation entre l'inhibition de la cyclooxygénase et l'inhibition de la croissance cellulaire, ce qui confirmait bien sûr grand nombre de données de la littérature. Il sera donc intéressant de tester certains de nos composés sur un large panel de cibles (telles que PDK-1) afin de déterminer si une autre voie de signalisation est impliquée dans les effets pharmacologiques constatés.

En conclusion, notre travail présente différentes possibilités d'amélioration du concept d'inhibition de la cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate. Il reste cependant indispensable de poursuivre la recherche dans les directions indiquées afin d'évaluer définitivement l'avenir de ce type d'approche thérapeutique.

Bibliographie

Attributable causes for cancer in France in the year 2000 (2007) World Health Organisation, (International Agency for Research on Cancer).

Abdellatif, K. R. A., Chowdhury, M. A., Dong, Y., Chen, Q., et Knaus, E. E. (2008) Diazen-1-ium-1,2-diolated and nitrooxyethyl nitric oxide donor ester prodrugs of anti-inflammatory (E)-2-(aryl)-3-(4-methanesulfonylphenyl)acrylic acids: synthesis, cyclooxygenase inhibition, and nitric oxide release studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(6), 3302-8.

Agrawal, A. et Fentiman, I. S. (2008) NSAIDs and breast cancer: a possible prevention and treatment strategy. *International journal of Clinical Practice*, 62(3), 444-9.

Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L., et Zeilhofer, H. U. (2002) PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nature Neuroscience*, 5(1), 34-40.

Al-Sa'doni, H. et Ferro, A. (2000a) S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clinical science*, 98(5), 507-20.

Al-Sa'doni, H. H., Khan, I. Y., Poston, L., Fisher, I., et Ferro, A. (2000b) A novel family of S-nitrosothiols: chemical synthesis and biological actions. *Nitric oxide : Biology and Chemistry*, 4(6), 550-60.

Ambs, S., Merriam, W. G., Ogunfusika, M. O., Bennett, W. P., Ishibe, N., Hussain, S., Tzeng E. E., Geller, D. A., Billiar, T. R., et Harris, C. C. (1998) p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nature Medicine*, 4(12), 1371-1376.

Angelucci, A., Garofalo, S., Specca, S., Bovadilla, A., Gravina, G., Muzi, P., Vicentini, C., et Bologna, M. (2008) Arachidonic acid modulates the crosstalk between prostate carcinoma and bone stromal cells. *Endocrine-related Cancer*, 15(1), 91-100.

Antonakopoulos, N. et Karamanolis, D. G. (2007) The role of NSAIDs in colon cancer prevention. *Hepato-gastroenterology*, 54(78), 1694-700.

Aparicio Gallego, G., Díaz Prado, S., Jiménez Fonseca, P., García Campelo, R., Cassinello Espinosa, J. et Anton Aparicio, L. M. (2007) Cyclooxygenase-2 (COX-2): a molecular target in prostate cancer. *Clinical & Translational Oncology*, 9(11), 694-702.

Appleton, I., Tomlinson, A., et Willoughby, D. A. (1996) Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Advances in Pharmacology*, 35, 27-78.

Aragon-Ching, J. B. et Dahut, W. L. (2008) The role of angiogenesis inhibitors in prostate cancer. *Cancer Journal*, 14(1), 20-5.

Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P., et Ogier-Denis, E. (2002) Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 27613-21.

- Balk, S. P., Ko, Y., et Bubley, G. J. (2003) Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 383-91.
- Bandarage, U. K., Chen, L., Fang, X., Garvey, D. S., Janero, D. R., Letts, L. G., Saha, J. K., Schroeder, J. D., et Shumway, M. J. (2000) Nitrosothiol esters of diclofenac: synthesis and pharmacological characterization as gastrointestinal-sparing prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(21), 4005-16.
- Bates, J. N., Baker, M. T., Guerra, R., et Harrison, D. G. (1991) Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical Pharmacology*, 42 Suppl, S157-65.
- Bean, M. et Kohn, H. (1983) Studies on the reaction of mitomycin C with potassium ethyl monothiocarbonate under reductive conditions. *The Journal of Organic Chemistry*, 48(25), 5033-41.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., et Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), 1620-4.
- Bicker, G. (2005) STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(5), 495-505.
- Bindukumar, B., Schwartz, S. A., Nair, M. P. N., Aalinkeel, R., Kawinski, E., et Chadha, K. C. (2005) Prostate-specific antigen modulates the expression of genes involved in prostate tumor growth. *Neoplasia*, 7(3), 241-52.
- Blac, C. (1997) *Chemical Abstract*, 127, 220465.
- Blaise, G. A., Gauvin, D., Gangal, M., et Authier, S. (2005) Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*, 208(2), 177-92.
- Bogdan, C. (1997) Of microbes, macrophages and nitric oxide. *Behring Institute Mitteilungen*, (99), 58-72.
- Boo, Y. C. et Jo, H. (2003) Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 285(3), C499-508.
- Borda, E., Furlan, C., Orman, B., Reina, S., et Sterin-Borda, L. (2007) Nitric oxide synthase and PGE2 reciprocal interactions in rat dental pulp: cholinergic modulation. *Journal of Endodontics*, 33(2), 142-7.
- Borgoño, C. A., Michael, I. P., et Diamandis, E. P. (2004) Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Molecular Cancer Research*, 2(5), 257-80.
- Botting, R. M. (2006) Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *Journal of Thermal Biology*, 31(1-2), 208-19.

- Boughton-Smith, N. K., Hutcheson, I. R., Deakin, A. M., Whittle, B. J., et Moncada, S. (1990) Protective effect of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 191(3), 485-8.
- Boyle, P. et Ferlay, J. (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology*, 16(3), 481-8.
- Brady, S. F., Pawluczyk, J. M., Lumma, P. K., Feng, D. M., Wai, J. M., Jones, R., DeFeo-Jones, D., Wong, B. K., Miller-Stein, C., Lin, J. H., Oliff, A., Freidinger, R. M., et Garsky, V. M. (2002) Design and synthesis of a pro-drug of vinblastine targeted at treatment of prostate cancer with enhanced efficacy and reduced systemic toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(21), 4706-15.
- Breinig, M., Schirmacher, P., et Kern, M. A. (2007) Cyclooxygenase-2 (COX-2) - a therapeutic target in liver cancer? *Current Pharmaceutical Design*, 13(32), 3305-15.
- Brockhaus, F. et Brüne, B. (1999) p53 accumulation in apoptotic macrophages is an energy demanding process that precedes cytochrome c release in response to nitric oxide. *Oncogene*, 18(47), 6403-10.
- Brookes, P. S., Salinas, E. P., Darley-USmar, K., Eiserich, J. P., Freeman, B. A., Darley-USmar, V. M., et Anderson, P. G. (2000) Concentration-dependent Effects of Nitric Oxide on Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome c Release. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20474-9.
- Brown, D. W., Mahon, M. F., Ninan, A., Sainsbury, M., et Shertzer, H. G. (1993) The Fischer indolisation reaction and the synthesis of dihydroindenoindoles. *Tetrahedron*, 49(39), 8919-32.
- Butler, A. R., Al-Sa'doni, H. H., Megson, I. L., et Flitney, F. W. (1998) Synthesis, decomposition, and vasodilator action of some new S-nitrosated dipeptides. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 2(3), 193-202.
- Cai, Y., Lee, Y., Li, G., Liu, S., Bao, B.-Y., Huang, J., Hsu, C.-L., et Chang, C. (2008) A new prostate cancer therapeutic approach: combination of androgen ablation with COX-2 inhibitor. *International Journal of Cancer*, 123(1), 195-201.
- Carvalho, A. L., Sanz, L., Baretino, D., Romero, A., Calvette, J. J., et Romão, M. J. (2002) Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human PSA. *Journal of Molecular Biology*, 322(2), 325-37.
- Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., deKernion, J. B., Ratliff, T. L., Kavoussi, L. R., et Dalkin, B. L. (1994) Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of Urology*, 151(5), 1283-90.
- Chabrier, P. E., Demerlé-Pallardy, C., et Auguet, M. (1999) Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(8-9), 1029-35.

- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., et Simmons, D. L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13926-31.
- Chandrasekharan, N. V. et Simmons, D. L. (2004) The cyclooxygenases. *Genome Biology*, 5(9), 241-7.
- Chegaev, K., Lazzarato, L., Tosco, P., Cena, C., Marini, E., Rolando, B., Carrupt, P.-A., Fruttero, R., et Gasco, A. (2007) NO-donor COX-2 inhibitors. New nitrooxy-substituted 1,5-diarylimidazoles endowed with COX-2 inhibitory and vasodilator properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7), 1449-57.
- Christensson, A., Laurell, C. B., et Lilja, H. (1990) Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 194(3), 755-63.
- Christensson, A. et Lilja, H. (1994) Complex formation between protein C inhibitor and prostate-specific antigen in vitro and in human semen. *European Journal of Biochemistry*, 220(1), 45-53.
- Cipollone, F., Cicolini, G., et Bucci, M. (2008) Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives. *Pharmacology & Therapeutics*, 118(2), 161-80.
- Clements, J. A. (1989) The glandular kallikrein family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocrine Reviews*, 10(4), 393-419.
- Cleutjens, K. B., van der Korput, H. A., van Eekelen, C. C., van Rooij, H. C., Faber, P. W. et Trapman, J. (1997) An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Molecular Endocrinology*, 11(2), 148-61.
- Connolly, D., Black, A., Murray, L. J., Nambirajan, T., Keane, P. F., et Gavin, A. (2008) The utility of prostate-specific antigen velocity thresholds in clinical practice: a population-based analysis. *British Journal of Urology International*, 101(12), 1507-12.
- Coombs, G. S., Bergstrom, R. C., Pellequer, J. L., Baker, S. I., Navre, M., Smith, M. M., Tainer, J. A., Madison, E. L., et Corey, D. R. (1998) Substrate specificity of prostate-specific antigen (PSA). *Chemistry & Biology*, 5(9), 475-88.
- Crawford, E. D., Leewansangtong, S., Goktas, S., Holthaus, K., et Baier, M. (1999) Efficiency of prostate-specific antigen and digital rectal examination in screening, using 4.0 ng/ml and age-specific reference range as a cutoff for abnormal values. *The Prostate*, 38(4), 296-302.
- Creighton, T. E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties* 2 éd. (W. H. Freeman).

- Dannhardt, G. et Laufer, S. (2000) Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: is there a common pharmacophore? *Current Medicinal Chemistry*, 7(11), 1101-12.
- Dannhardt, G. et Kiefer, W. (2001) Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36(2), 109-26.
- Darling, M. R., Tsai, S., Jackson-Boeters, L., Daley, T. D., et Diamandis, E. P. (2006) Human kallikrein 3 (prostate specific antigen) and human kallikrein 5 expression in salivary gland tumors. *The International Journal of Biological Markers*, 21(4), 201-5.
- De Belder, A. J., MacAllister, R., Radomski, M. W., Moncada, S., et Vallance, P. J. (1994) Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovascular Research*, 28(5), 691-4.
- DeFeo-Jones, D., Garsky, V. M., Wong, B. K., Feng, D. M., Bolyar, T., Haskell, K., Kiefer, D. M., Leander, K., McAvoy, E., Lumma, P., Wai, J., Senderak, E. T., Motzel, S. L., Keenan, K., van Zwieten, M., Lin, J. H., Freidinger, R., Huff, J., Oliff, A., et Jones, R. E. (2000) A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. *Nature Medicine*, 6(11), 1248-52.
- DeFeo-Jones, D., Brady, S. F., Feng, D., Wong, B. K., Bolyar, T., Haskell, K., Kiefer, D. M., Leander, K., McAvoy, E., Lumma, P., Pawluczyk, J. M., Wai, J., Motzl, S. L., Keenan, K., van Zwieten, M., Lin, J. H., Garsky, V. M., Freidinger, R., Oliff, A., et Jones, R. E. (2002) A prostate-specific antigen (PSA)-activated vinblastine prodrug selectively kills PSA-secreting cells in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(7), 451-9.
- De Jong, J., Klein, I., Bast, A., et van der Vijgh, W. J. (1992) Analysis and pharmacokinetics of N-l-leucyldoxorubicin and metabolites in tissues of tumor-bearing BALB/c mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 31(2), 156-60.
- De Leval, X., Delarge, J., Somers, F., de Tullio, P., Henrotin, Y., Pirote, B., et Dogné, J. M. (2000) Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 7(10), 1041-62.
- De Moraes, E., Dar, N. A., de Moura Gallo, C. V., et Hainaut, P. (2007) Cross-talks between cyclooxygenase-2 and tumor suppressor protein p53: Balancing life and death during inflammatory stress and carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(5), 929-37.
- Del Grosso, E., Boschi, D., Lazzarato, L., Cena, C., Di Stilo, A., Fruttero, R., Moro, S., et Gasco, A. (2005) The furoxan system: design of selective nitric oxide (NO) donor inhibitors of COX-2 endowed with anti-aggregatory and vasodilating activities. *Chemistry & Biodiversity*, 2(7), 886-900.
- Denmeade, S. R., Lou, W., Lövgren, J., Malm, J., Lilja, H., et Isaacs, J. T. (1997) Specific and efficient peptide substrates for assaying the proteolytic activity of prostate-specific antigen. *Cancer Research*, 57(21), 4924-30.

- Denmeade, S. R., Nagy, A., Gao, J., Lilja, H., Schally, A. V., et Isaacs, J. T. (1998) Enzymatic activation of a doxorubicin-peptide prodrug by prostate-specific antigen. *Cancer Research*, 58(12), 2537-40.
- Denmeade, S. R., Jakobsen, C. M., Janssen, S., Khan, S. R., Garrett, E. S., Lilja, H., Christensen, S. B., et Isaacs, J. T. (2003) Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(13), 990-1000.
- Dermond, O. et Ruegg, C. (2001) Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resistance Updates*, 4(5), 314-21.
- Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., et Chinnaiyan, A. M. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 412(6849), 822-6.
- Diamandis, E. P. et Yu, H. (1998) Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *The Urologic Clinics of North America*, 24(2), 275-82.
- Dicks, A. P., Swift, H. R., Williams, D. L. H., Butler, A. R., Al-Sa'doni, H. H., et Cox, B. G. (1996) Identification of Cu⁺ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (4), 481-87.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., et Zeiher, A. M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-5.
- DiPaola, R. S., Rinehart, J., Nemunaitis, J., Ebbinghaus, S., Rubin, E., Capanna, T., Ciardella, M., Doyle-Lindrud, S., Goodwin, S., Fontaine, M., Adams, N., Williams, A., Schwartz, M., Winchell, G., Wickersham, K., Deutsch, P., et Yao, S.-L. (2002) Characterization of a novel prostate-specific antigen-activated peptide-doxorubicin conjugate in patients with prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(7), 1874-9.
- Doni, M. G., Whittle, B. J., Palmer, R. M., et Moncada, S. (1988) Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *European Journal of Pharmacology*, 151(1), 19-25.
- Drago, R. S. et Paulik, F. E. (1960) The Reaction of Nitrogen(II) Oxide with Diethylamine. *Journal of the American Chemical Society*, 82(1), 96-8.
- Dray, A. et Urban, L. (1996) New pharmacological strategies for pain relief. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 253-80.
- Drugs in R&D (2006) Nitronaproxen: AZD 3582, HCT 3012, Naproxen Nitroxybutylester, NO-Naproxen. *Drugs in R&D*, 7(4), 262-6.

- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., van de Putte, L. B., et Lipsky, P. E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, 12(12), 1063-73.
- Ehrich, E. W., Dallob, A., De Lepeleire, I., Van Hecken, A., Riendeau, D., Yuan, W., Porras, A., Wittreich, J., Seibold, J. R., de Scheppet, P., Mehlich, D. R., et Gertz, B. J. (1999) Characterization of rofecoxib as a cyclooxygenase-2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 65(3), 336-47.
- Engelhardt, F. C., Shi, Y., Cowden, C. J., Conlon, D. A., Pipik, B., Zhou, G., McNamara, J. M., et Dolling, U.-F. (2006) Synthesis of a NO-releasing prodrug of rofecoxib. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(2), 480-91.
- Ermondi, G., Caron, G., Lawrence, R., et Longo, D. (2004) Docking studies on NSAID/COX-2 isozyme complexes using contact statistics analysis. *Journal of Computer-aided Molecular Design*, 18(11), 683-96.
- FacBio – Biocell (2005) Organisation des cellules eucaryotes. Cours en ligne, <http://www.sciencebio.com/FacBio/BioCell/FBindex.htm>
- Feelisch, M., Ostrowski, J., et Noack, E. (1989) On the mechanism of NO release from sydnonimines. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 14 Suppl 11, S13-22.
- Feldman, S. et Weidenfeld, J. (2004) Involvement of endogeneous glutamate in the stimulatory effect of norepinephrine and serotonin on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinology*, 79(1), 43-53.
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Santucci, L., Morelli, O., Miglietti, M., Federici, B., Mannucci, R., del Soldato, P., et Morelli, A. (1999) Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology*, 116(5), 1089-106.
- Fiorucci, S., Santucci, L., Gresele, P., Faccino, R. M., del Soldato, P., et Morelli, A. (2003) Gastrointestinal safety of NO-aspirin (NCX-4016) in healthy human volunteers: A proof of concept endoscopic study. *Gastroenterology*, 124(3), 600-7.
- Firuzi, O. et Praticò, D. (2006) Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go ? *Annals of Neurology*, 59(2), 219-28.
- Fischer, E. et Jourdan, F. (1883) Über die Hydrazine der Brentztraubensäure. *Chemische Berichte*, 16, 2241-5.
- Forman, B. M., Chen, J., et Evans, R. M. (1996) The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804, 266-75.
- Foster, M. W., McMahon, T. J., et Stamler, J. S. (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 160-8.

- Frayon, S., Cueille, C., Prat, R., et Garel, J.-M. (2005) La cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV), Université de Paris VI Pierre et Marie Curie, cours en ligne (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/>).
- Frost, M. C., Reynolds, M. M., et Meyerhoff, M. E. (2005) Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. *Biomaterials*, 26(14), 1685-93.
- Fulton, A. M., Ma, X., et Kundu, N. (2006) Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Research*, 66(20), 9794-7.
- Furchgott, R. F. et Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-6.
- Fürstenberger, G., Krieg, P., Müller-Decker, K., et Habenicht, A. J. R. (2006) What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis ? *International Journal of Cancer*, 119(10), 2247-54.
- Galea, E. et Feinstein, D. L. (1999) Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *The FASEB Journal*, 13(15), 2125-37.
- Gans, K. R., Galbraith, W., Roman, R. J., Haber, S. B., Kerr, J. S., Schmidt, W. K., Smith, C., Hewes, W. E., et Ackerman, N. R. (1990) Anti-inflammatory and safety profile of DuP-697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 254(1), 180-7.
- Gao, J., Kashfi, K., et Rigas, B. (2004) In vitro metabolism of nitric oxide-donating aspirin: the effect of positional isomerism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(3), 989-97.
- Garavito, R. M. et DeWitt, D. L. (1999) The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441(2-3), 278-87.
- Garg, R., Kurup, A., Mekapati, S. B., et Hansch, C. (2003) Cyclooxygenase (COX) inhibitors: a comparative QSAR study. *Chemical Reviews*, 103(3), 703-32.
- Garthwaite, J. et Boulton, C. L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*, 57, 683-706.
- Gasco, A., Fruttero, R., et Rolando, B. (2005) Focus on recent approaches for the development of new NO-donors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(2), 217-29.
- Gasparini, G., Longo, R., Sarmiento, R., et Morabito, A. (2003) Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *The Lancet Oncology*, 4(10), 605-15.
- Getting, S. J., Segieth, J., Ahmad, S., Biggs, C. S., et Whitton, P. S. (1996) Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Research*, 717(1-2), 196-9.

- Giardiello, F. M., Hamilton, S. R., Krush, A. J., Piantadosi, S., Hylind, L. M., Celano, P., Booker, S. V., Robinson, C. R., et Offerhaus, G. J. (1993) Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *The New England Journal of Medicine*, 328(18), 1313-6.
- Gilbert, D. C. et Parker, C. (2005) Docetaxel for the treatment of prostate cancer. *Future Oncology*, 1(3), 307-14.
- Glockzin, S., von Knethen, A., Scheffner, M., et Brüne, B. (1999) Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19581-6.
- Gluszok, S. (2007) Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de dérivés pyrazoliques et pyrroliques inhibiteurs de PDK-1 à visée anti-cancéreuse. *Thèse de l'Université de Lille 2, EA 2692*.
- Goldenberg, M. M. (1999) Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Therapeutics*, 21(9), 1497-513; discussion 1427-8.
- Goodwin, D. C., Landino, L. M., et Marnett, L. J. (1999) Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *The FASEB Journal*, 13(10), 1121-36.
- Goossens, L., Pommery, N., et Hénichart, J. P. (2007) COX-2/5-LOX dual acting anti-inflammatory drugs in cancer chemotherapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(3), 283-96.
- Goto, F., Goto, K., Weindel, K., et Folkman, J. (1993) Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Laboratory Investigation*, 69(5), 508-17.
- Gow, A. J. et Stamler, J. S. (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*, 391(6663), 169-73.
- Gow, A. J., Chen, Q., Hess, D. T., Day, B. J., Ischiropoulos, H., et Stamler, J. S. (2002) Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 9637-40.
- Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Seguin, M. C., Klotz, F. W., Slayer, M., Nelson, B. J., et Nacy, C. A. (1994) Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*, 43(1-2), 87-94.
- Greenough, A. (2000) Inhaled nitric oxide in the neonatal period. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(7), 1601-9.
- Griffiths, M. J. D. et Evans, T. W. (2005) Inhaled nitric oxide therapy in adults. *The New England Journal of Medicine*, 353(25), 2683-95.

- Grossi, L. et D'Angelo, S. (2005) Sodium nitroprusside: mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2622-6.
- Guéritte, F. (2001) General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids. *Current Pharmaceutical Design*, 7(13), 1229-49.
- Guix, F., Uribesalgo, I., Coma, M., et Muñoz, F. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 126-52.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G., et Mukhtar, H. (2000) Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate*, 42(1), 73-8.
- Ha, K. S., Kim, K., Kwon, Y., Bai, S., Nam, W.-D., Yoo, Y.-M., Kim, P., Chung, H.-T., Billiar, T. R., et Kim, Y.-M. (2003) Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. *The FASEB Journal*, 17(9), 1036-47.
- Halliday, G., Robinson, S. R., Shepherd, C., et Kril, J. (2000) Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 27(1-2), 1-8.
- Han, C. et Wu, T. (2005) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 24053-63.
- Hara, M., Koyanagi, Y., Inoue, T., et Fukuyama, T. (1971) [Some physico-chemical characteristics of "seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII]. *The Japanese Journal of Legal Medicine*, 25(4), 322-4.
- Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N., et Breyer, M. D. (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(6), 2504-10.
- Harrison, D. G. et Bates, J. N. (1993) The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation*, 87(5), 1461-7.
- Hashimoto, T., Kihara, M., Yokoyama, K., Fujita, T., Kobayashi, S., Matsushita, K., Tamura, K., Hirawa, N., Toya, Y., et Umemura, S. (2003) Lipoxygenase products regulate nitric oxide and inducible nitric oxide synthase production in interleukin-1beta stimulated vascular smooth muscle cells. *Hypertension Research*, 26(2), 177-84.
- Hassan, M. I., Kumar, V., Singh, T. P., et Yadav, S. (2007) Structural Model of Human PSA: a Target for Prostate Cancer Therapy. *Chemical Biology & Drug Design*, 70(3), 261-7.
- Hau, P., Kunz-Schughart, L., Bogdahn, U., Baumgart, U., Hirschmann, B., Weimann, E., Muhleisen, H., Ruemmele, P., Steinbrecher, A., et Reichle, A. (2007) Low-dose chemotherapy in combination with COX-2 inhibitors and PPAR-gamma agonists in recurrent high-grade gliomas - a phase II study. *Oncology*, 73(1-2), 21-5.

- Hawkey, C. J., Jones, J. I., Atherton, C. T., Skelly, M. M., Bebb, J. R., Fagerholm, U., Jonzon, B., Karlsson, P., et Bjarnason, I. T. (2003) Gastrointestinal safety of AZD3582, a cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donator: proof of concept study in humans. *Gut*, 52(11), 1537-42.
- Hortelano, S., Dallaporta, B., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S. A., Marzo, I., Bosca, L., et Kroemer, G. (1997) Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Letters*, 410(2-3), 373-7.
- Hrabie, J. A., Klose, J. R., Wink, D. A., et Keefer, L. K. (1993) New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(6), 1472-6.
- Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J. T., Zhu, L., Miller, P. W., Wollman, J., Herschman, H., et Dubinett, S. M. (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Research*, 58(6), 1208-16.
- Hughes-Fulford, M., Chen, Y., et Tjandrawinata, R. R. (2001) Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 22(5), 701-7.
- Huguenin, S., Fleury-Feith, J., Kheuang, L., Jaurand, M., Bolla, M., Riffaud, J.-P., Chopin, D. K., et Vacherot, F. (2004) Nitrosulindac (NCX 1102): a new nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drug (NO-NSAID), inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostatic epithelial cell lines. *The Prostate*, 61(2), 132-41.
- Huledal, G., Jonzon, B., Malmenäs, M., Hedman, A., Andersson, L. I., Odling, B., et Brater, D. C. (2005) Renal effects of the cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donator AZD3582 compared with rofecoxib and naproxen during normal and low sodium intake. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 77(5), 437-50.
- Hulsman, N., Medema, J. P., Bos, C., Jongejan, A., Leurs, R., Smit, M. J., de Esch, I., Richel, D., et Wijtman, M. (2007) Chemical insights in the concept of hybrid drugs: the antitumor effect of nitric oxide-donating aspirin involves a quinone methide but not nitric oxide nor aspirin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(10), 2424-31.
- Humphries, P. S. et Finefield, J. M. (2006) Microwave-assisted synthesis utilizing supported reagents: a rapid and versatile synthesis of 1,5-diarylpyrazoles. *Tetrahedron Letters*, 47(14), 2443-6.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., et Chaudhuri, G. (1987a) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), 9265-9.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., et Wood, K. S. (1987b) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, 61(6), 866-79.

- Ignarro, L. J. (2002) After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 7816-7.
- Iñiguez, M. A., Rodríguez, A., Volpert, O. V., Fresno, M., et Redondo, J. M. (2003) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 9(2), 73-8.
- Ishii, K., Otsuka, T., Iguchi, K., Usui, S., Yamamoto, H., Sugimura, Y., Yoshikawa, K., Hayward, S. W., et Hirano, K. (2004) Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Letters*, 207(1), 79-87.
- Jerónimo, C., Usadel, H., Henrique, R., Oliveira, J., Lopers, C., Nelson, W. G., et Sidransky, D. (2001) Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(22), 1747-52.
- Jia, L. et Stamler, J. S. (1999) Dual actions of S-nitrosylated derivative of vasoactive intestinal peptide as a vasoactive intestinal peptide-like mediator and a nitric oxide carrier. *European Journal of Pharmacology*, 366(1), 79-86.
- Jonsson, M., Linse, S., Frohm, B., Lundwall, Å., et Malm, J. (2005) Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochemical Journal*, 387(Pt 2), 447-53.
- Jouzeau, J., Daouphars, M., Benani, A., et Netter, P. (2004) Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 28(Supplement 2), 7-17.
- Kaehler, S. T., Singewald, N., Sinner, C., et Philippu, A. (1999) Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Research*, 835(2), 346-9.
- Kahl, K. G., Zielasek, J., Uttenthal, L. O., Rodrigo, J., Toyka, K. V., et Schmidt, H. (2003) Protective role of the cytokine-inducible isoform of nitric oxide synthase induction and nitrosative stress in experimental autoimmune encephalomyelitis of the DA rat. *Journal of Neuroscience Research*, 73(2), 198-205.
- Kashfi, K., Ryan, Y., Qiao, L. L., Williams, J. L., Chen, J., del Soldato, P., Traganos, F., Rigas, B., et Ryann, Y. (2002) Nitric oxide-donating nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of various cultured human cancer cells: evidence of a tissue type-independent effect. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(3), 1273-82.
- Kashfi, K., Borgo, S., Williams, J. L., Chen, J., Gao, J., Glekas, A., Benedini, F., Del Soldato, P., et Rigas, B. (2004) Positional isomerism markedly affects the growth inhibition of colon cancer cells by nitric oxide-donating aspirin in vitro and in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(3), 978-88.
- Kashfi, K. et Rigas, B. (2005a) Molecular targets of nitric-oxide-donating aspirin in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 4), 701-4.

- Kashfi, K. et Rigas, B. (2005b) Non-COX-2 targets and cancer: expanding the molecular target repertoire of chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 70(7), 969-86.
- Kashfi, K. et Rigas, B. (2007) The mechanism of action of nitric oxide-donating aspirin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(4), 1096-101.
- Katori, M. et Majima, M. (2000) Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflammation Research*, 49(8), 367-92.
- Katsumi, H., Nishikawa, M., Yamashita, F., et Hashida, M. (2005) Development of polyethylene glycol-conjugated poly-S-nitrosated serum albumin, a novel S-Nitrosothiol for prolonged delivery of nitric oxide in the blood circulation in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1117-24.
- Kavdia, M. et Lewis, R. S. (2003) Nitric oxide delivery in stagnant systems via nitric oxide donors: a mathematical model. *Chemical Research in Toxicology*, 16(1), 7-14.
- Khan, A. R. et James, M. N. (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, 7(4), 815-36.
- Khan, S. R. et Denmeade, S. R. (2000) In vivo activity of a PSA-activated doxorubicin prodrug against PSA-producing human prostate cancer xenografts. *The Prostate*, 45(1), 80-3.
- Killian, C. S., Corral, D. A., Kawinski, E., et Constantine, R. I. (1993) Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192(2), 940-7.
- Kim, Y. M., Chung, H. T., Kim, S. S., Han, J. A., Yoo, Y. M., Kim, K. M., Lee, G. H., Yun, H. Y., Green, A., Li, J., Simmons, R. L. et Billiar, T. R. (1999) Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *The Journal of Neuroscience*, 19(16), 6740-7.
- Kim, P. K. M., Kwon, Y., Chung, H., et Kim, Y. (2002) Regulation of caspases by nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962, 42-52.
- Klaunig, J. E. et Kamendulis, L. M. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-67.
- Klobeck, H. G., Combriato, G., Schulz, P., Arbusow, V., et Fittler, F. (1989) Genomic sequence of human prostate specific antigen (PSA). *Nucleic Acids Research*, 17(10), 3981.
- Koistinen, H., Wohlfahrt, G., Mattsson, J. M., Wu, P., Lahdenperä, J., et Stenman, U.-H. (2008) Novel small molecule inhibitors for Prostate-Specific Antigen. *The Prostate*, [Epub, DOI : 10.1002/pros.20773]
- Kolakowski, R. V., Shanguan, N., Sauers, R., et Williams, L. (2006) Mechanism of Thio Acid/Azide Amidation. *Journal of the American Chemical Society*, 128(17), 5695-702.

- Kratz, F., Mansour, A., Soltau, J., Warnecke, A., Fichtner, I., Unger, C., et Dreves, J. (2005) Development of albumin-binding doxorubicin prodrugs that are cleaved by prostate-specific antigen. *Archiv der Pharmazie*, 338(10), 462-72.
- Krieger, M. H., Santos, K. F., Shishido, S. M., Wanschel, A. C., Estrella, H. F., Santos, L., De Oliveira, M. G., Franchini, K. G., Spadari-Bratfisch, R. C., et Laurindo, F. R. (2006) Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*, 14(1), 12-20.
- Kubes, P. et McCafferty, D. (2000) Nitric oxide and intestinal inflammation. *The American Journal of Medicine*, 109(2), 150-8.
- Kulp, S. K., Yang, Y., Hung, C., Chen, K., Lai, J.-P., Tseng, P., Fowble, J.W., Ward, P. J., et Chen, C. (2004) 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 64(4), 1444-51.
- Kumar, S. K., Williams, S. A., Isaacs, J. T., Denmeade, S. R., et Khan, S. R. (2007) Modulating paclitaxel bioavailability for targeting prostate cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(14), 4973-84.
- Kundu, S. D., Roehl, K. A., Yu, X., Antenor, J. A. V., Suarez, B. K., et Catalona, W. J. (2007) Prostate specific antigen density correlates with features of prostate cancer aggressiveness. *The Journal of Urology*, 177(2), 505-9.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak., J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., et Stallings, W. C. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644-8.
- Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R., et Marnett, L. J. (2001) Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 752-60.
- Lala, P. K. et Orucevic, A. (1998) Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Reviews*, 17(1), 91-106.
- Le, H. T., Gallard, J., Mayer, M., Guittet, E., et Michelot, R. (1996) Use of BOP-Cl in the presence of Boc-amino monothioacids for the thioacylation of iminoacid residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4(12), 2201-9.
- Li, T. S. et Beling, C. G. (1973) Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 24(2), 134-44.
- Li, L. M., Nicolson, G. L., et Fidler, I. J. (1991) Direct in vitro lysis of metastatic tumor cells by cytokine-activated murine vascular endothelial cells. *Cancer Research*, 51(1), 245-54.
- Li, J. J., Anderson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Collins, J. T., Garland, D. J., Gregory, S. A., Huang, H. C., Isakson, P. C., et Koboldt, C. M. (1995) 1,2-Diarylcyclopentenes as selective cyclooxygenase-2 inhibitors and orally active anti-inflammatory agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(22), 4570-8.

- Li, J., Billiar, T. R., Talanian, R. V., et Kim, Y. M. (1997) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(2), 419-24.
- Liang, X., Wu, L., Wang, Q., Hand, T., Bilak, M., McCullough, L., et Andreasson, K. (2007) Function of COX-2 and prostaglandins in neurological disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 33(1), 94-9.
- Liao, Z., Mason, K. A., et Milas, L. (2007) Cyclo-oxygenase-2 and its inhibition in cancer: is there a role? *Drugs*, 67(6), 821-45.
- Lièvreumont, J. P., Sciorati, C., Morandi, E., Paolucci, C., Bunone, G., Della Valle, G., Meldolesi, J., et Clementi, E. (1999) The p75(NTR)-induced apoptotic program develops through a ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15466-72.
- Liew, F. Y., Wei, X. Q., et Proudfoot, L. (1997) Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 352(1359), 1311-5.
- Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., et Laurell, C. B. (1987) Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *The Journal of Clinical Investigation*, 80(2), 281-5.
- Linton, H. J., Marks, L. S., Millar, L. S., Knott, C. L., Rittenhouse, H. G., et Mikolajczyk, S. D. (2003) Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease. *Clinical Chemistry*, 49(2), 253-9.
- Liu, C. H., Chang, S. H., Narko, K., Trifan, O. C., Wu, M. T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T. F., et Hila, T. (2001) Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18563-9.
- Lohmander, L. S., McKeith, D., Svensson, O., Malmenäs, M., Bolin, L., Kalla, A., Genti, G., Szechinski, J., et Ramos-Remus, C. (2005) A randomised, placebo controlled, comparative trial of the gastrointestinal safety and efficacy of AZD3582 versus naproxen in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(3), 449-56.
- Lolli, M. L., Cena, C., Medana, C., Lazzarato, L., Morini, G., Coruzzi, G., Manarini, S., Fruttero, R., et Gasco, A. (2001) A new class of ibuprofen derivatives with reduced gastrotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(21), 3463-8.
- Lövgren, J., Valtonen-André, C., Marsal, K., Lilja, H., et Lundwall, A. (1999) Measurement of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in different body fluids. *Journal of Andrology*, 20(3), 348-55.
- Lundholm, K., Gelin, J., Hyltander, A., Lönnroth, C., Sandström, R., Svaninger, G., Körner, U., Gülich, M., Kärrefors, I., et Norli, B. (1994) Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Research*, 54(21), 5602-6.

- Lundwall, A. et Lilja, H. (1987) Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Letters*, 214(2), 317-22.
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. et Browner, M. F. (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Structural Biology*, 3(11), 927-33.
- Ma, X., Sayed, N., Beuve, A., et van den Akker, F. (2007) NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *The EMBO Journal*, 26(2), 578-88.
- Maejima, Y., Adachi, S., Morikawa, K., Ito, H., et Isobe, M. (2005) Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 38(1), 163-74.
- Magklara, A., Cheung, C. C., Asa, S. L., et Diamandis, E. P. (2000a) Expression of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in the thyroid gland. *Clinica Chimica Acta*, 300(1-2), 171-80.
- Magklara, A., Scorilas, A., Stephan, C., Kristiansen, G. O., Hauptmann, S., Jung, K., et Diamandis, E. P. (2000b) Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urology*, 56(3), 527-32.
- Malm, J., Hellman, J., Hogg, P., et Lilja, H. (2000) Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn(2+), a tight-binding inhibitor. *The Prostate*, 45(2), 132-9.
- Marnett, L. J. et Burcham, P. C. (1993) Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chemical Research in Toxicology*, 6(6), 771-85.
- Martina, S. D., Vesta, K. S., et Ripley, T. L. (2005) Etoricoxib: a highly selective COX-2 inhibitor. *The Annals of Pharmacotherapy*, 39(5), 854-62.
- Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J., et Seibert, K. (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research*, 60(5), 1306-11.
- McCormack, R. T., Rittenhouse, H. G., Finlay, J. A., Sokoloff, R. L., Wang, T. J., Wolfert, R. L., Lilja, H., et Oesterling, J. E. (1995) Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology*, 45(5), 729-44.
- Meiers, I., Shanks, J. H., et Bostwick, D. G. (2007) Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology*, 39(3), 299-304.
- Ménez, R., Michel, S., Muller, B. H., Bossus, M., Ducancel, F., Jolivet-Reynaud, C., et Stura, E. A. (2008) Crystal structure of a ternary complex between human prostate-specific antigen, its substrate acyl intermediate and an activating antibody. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 1021-33.

- Méric, J. B., Rottey, S., Olausson, K., Soria, J., Khayat, D., Rixe, O., et Spano, J.-P. (2006) Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 59(1), 51-64.
- Mhaka, A., Denmeade, S. R., Yao, W., Isaacs, J. T., et Khan, S. R. (2002) A 5-fluorodeoxyuridine prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(17), 2459-61.
- Michaux, C., de Leval, X., Julémont, F., Dogné, J., Pirotte B., et Durant F. (2006) Structure-based pharmacophore of COX-2 selective inhibitors and identification of original lead compounds from 3D database searching method. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(12), 1446-55.
- Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Wang, T. J., Rittenhouse, H. G., Marks, L. S., Song, W., Wheeler, T. M., et Slawin, K. M. (2000a) A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Research*, 60(3), 756-9.
- Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Marker, K. M., Wang, T. J., Rittenshouse, H. G., Marks, L. S., et Slawin K. M. (2000b) Seminal plasma contains "BPSA," a molecular form of prostate-specific antigen that is associated with benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, 45(3), 271-6.
- Mikolajczyk, S. D., Catalona, W. J., Evans, C. L., Linton, H. J., Millar, L. S., Marker, K. M., Katir, D., Amirkhan, A., et Rittenhouse, H. G. (2004) Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clinical Chemistry*, 50(6), 1017-25.
- Miller, M. R., Megson, I. L., Roseberry, M. J., Mazzei, F. A., Butler, A. R., et Wabb, D. J. (2000) Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryl trinitrate-tolerant rat femoral arteries. *European Journal of Pharmacology*, 403(1-2), 111-9.
- Miller, M. R., Okubo, K., Roseberry, M. J., Webb, D. J., et Megson, I. L. (2004) Extracellular nitric oxide release mediates soluble guanylate cyclase-independent vasodilator action of spermine NONOate: comparison with other nitric oxide donors in isolated rat femoral arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 43(3), 440-51.
- Millet, R., Domarkas, J., Houssin, R., Gilleron, P., Goossens, J.-F., Chavatte, P., Logé, C., Pommery, N., Pommery, J., et Hénichart, J.-P. (2004) Potent and selective farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(27), 6812-20.
- Mizuno, T., Takahashi, J., et Ogawa, A. (2002) Non-phosgene synthesis of benzyl chloroformate (CbzCl). *Tetrahedron Letters*, 43(43), 7765-7.
- Mizuno, T., Iwai, T., et Ishino, Y. (2005) Solvent-assisted thiocarboxylation of amines and alcohols with carbon monoxide and sulfur under mild conditions. *Tetrahedron*, 61(38), 9157-63.
- Montalbetti, C. A. et Falque, V. (2005) Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 61(46), 10827-52.

- Moore, B. C. et Simmons, D. L. (2002) COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(11), 1131-44.
- Morley, D. et Keefer, L. K. (1993) Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22 Suppl 7, S3-9.
- Mowery, K. A., Schoenfisch, M. H., Saavedra, J. E., Keefer, L. K., et Meyerhoff, M. E. (2000) Preparation and characterization of hydrophobic polymeric films that are thromboresistant via nitric oxide release. *Biomaterials*, 21(1), 9-21.
- Mullet, D., Fertel, R. H., Kniss, D., et Cox, G. W. (1997) An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN-gamma-treated macrophages. *Journal of Immunology*, 158(2), 897-904.
- Münzel, T., Feil, R., Mülsch, A., Lohmann, S. M., Hosmann, F., et Walter, U. (2003) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, 108(18), 2172-83.
- Namiki, S., Kaneda, F., Ikegami, M., Arai, T., Fujimori, K., Asada, S., Hama, H., Kasuya, Y. et Goto, K. (1999) Bis-N-nitroso-caged nitric oxides: photochemistry and biological performance test by rat aorta vasorelaxation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(8), 1695-702.
- Naoe, M., Marumoto, Y., Ishizaki, R., Ogawa, Y., Nagakami, Y., et Yoshida, H. (2002) Correlation between major histocompatibility complex class I molecules and CD8+ lymphocytes in prostate, and quantification of CD8 and interferon-gamma mRNA in prostate tissue specimens. *British Journal of Cancer*, 90(7), 748-53.
- Narita, D., Raica, M., Suci, C., Cîmpean, A., et Anghel, A. (2006) Immunohistochemical expression of androgen receptor and prostate-specific antigen in breast cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(3), 165-72.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., et Ushikubi, F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79(4), 1193-226.
- Nathan, C. F. et Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8841-8.
- Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224(4647), 350-7.
- Nikolic, D. et van Breemen, R. B. (2001) DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chemical Research in Toxicology*, 14(4), 351-4.
- North, G. L. (2001) Celecoxib as adjunctive therapy for treatment of colorectal cancer. *The Annals of Pharmacotherapy*, 35(12), 1638-43.

- O'Dell, T. J., Huang, P. L., Dawson, T. M., Dinerman, J. L., Snyder, S. H., Kandel, E. R., et Fishman, M. C. (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*, 265(5171), 542-6.
- Oehler, M. K. et Bicknell, R. (2000) The promise of anti-angiogenic cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 82(4), 749-52.
- Oh, L. M. (2006) Synthesis of celecoxib via 1,3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Letters*, 47(45), 7943-6.
- Okabe, E., Kajihara, J., Usami, Y., et Hirano, K. (1999) The cleavage site specificity of human prostate specific antigen for insulin-like growth factor binding protein-3. *FEBS Letters*, 447(1), 87-90.
- Okamoto, A., Shirakawa, T., Bito, T., Shigemura, K., Hamada, K., Gotoh, A., Fujisawa, M., et Kawabata, M. (2008) Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces upregulation of E-cadherin and has antitumor effect on human bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Urology*, 71(1), 156-60.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., et Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524-6.
- Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S., et Moncada, S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 153(3), 1251-6.
- Papapetropoulos, A., Rudic, R. D., et Sessa, W. C. (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 43(3), 509-20.
- Parinandi, N. L., Sharma, A., Eubank, T. D., Kaufman, B. F., Kutala, V. K., Marsh, C. B., Ignarro, L. J., et Kuppusamy, P. (2007) Nitroaspirin (NCX-4016), an NO donor, is antiangiogenic through induction of loss of redox-dependent viability and cytoskeletal reorganization in endothelial cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(11), 1837-49.
- Pastorekova, S., Kopacek, J., et Pastorek, J. (2007) Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(9), 865-78.
- Patil, R. T., Parveen, G., Gumaste, V. K., Bhawal, B. M., et Deshmukh, A. R. A. S. (2002) An Efficient One-Pot Synthesis of Azidoformates from Alcohols Using [n]Triphosgene: Synthesis of N-Carbobenzyloxy Azetid-2-ones. *SYNLETT*, 9, 1455-8.
- Peehl, D. M., Cohen, P., et Rosenfeld, R. G. (1995) The insulin-like growth factor system in the prostate. *World Journal of Urology*, 13(5), 306-11.
- Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Andersson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Greogry, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y., et Isakson, P. C. (1997) Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-

- (trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(9), 1347-65.
- Peterson, L. A., Wagener, T., Sies, H., et Stahl, W. (2007) Decomposition of S-nitrosocysteine via S- to N-transnitrosation. *Chemical Research in Toxicology*, 20(5), 721-3.
- Petit, J. F., Nicaise, M., Lepoivre, M., Guissani, A., et Lemaire, G. (1996) Protection by glutathione against the antiproliferative effects of nitric oxide. Dependence on kinetics of no release. *Biochemical Pharmacology*, 52(2), 205-12.
- Peyromaure, M., Fulla, Y., Debré, B., et Dinh-Xuan, A. T. (2005) Pro PSA : a "pro cancer" form of PSA? *Medical Hypotheses*, 64(1), 92-5.
- Picot, D., Loll, P. J., et Garavito, R. M. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367(6460), 243-9.
- Pluta, R. M., Oldfield, E. H., et Boock, R. J. (1997) Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 87(5), 746-51.
- Pommery, J., Pommery, N., et Hénichart, J.-P. (2005) Modification of eicosanoid profile in human blood treated by dual COX/LOX inhibitors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(6), 411-7.
- Pommery, N., Taverne, T., Telliez, A., Goossens, L., Charlier, C., Pommery, J., Goossens, J.-F., Houssin, R., Durant, F., et Hénichart, J.-P. (2004) New COX-2/5-LOX inhibitors: apoptosis-inducing agents potentially useful in prostate cancer chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(25), 6195-206.
- Prasit, P., Wang, Z., Brideau, C., Chan, C. C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J. F., Ford-Hutchinson, A. W., Gauthier, J. Y., Gordon, R., Guay, J., Gresser, M., Kargamn, S., Leblanc, Y., Léger, S., Mancini, J., O'Neill, G. P., Ouellet, M., Percival, M. D., Perrier, H., Riendeau, D., Rodger, I., et Zamboni, R. (1999) The discovery of rofecoxib, [MK 966, Vioxx, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2-inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(13), 1773-8.
- Prast, H., Lamberti, C., Fischer, H., Tran, M. H., et Philippu, A. (1996) Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 354(6), 731-5.
- Prescott, S. M. et Fitzpatrick, F. A. (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1470(2), M69-78.
- Pruthi, R. S., Derksen, J. E., et Moore, D. (2004) A pilot study of use of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *BJU International*, 93(3), 275-8.
- Pyo, H., Choy, H., Amorino, G. P., Kim, J. S., Cao, Q., Herculer, S. K., et DuBois, R. N. (2001) A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of

- radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research*, 7(10), 2998-3005.
- Pyrko, P., Kardosh, A., Liu, Y., Soriano, N., Xiong, W., Chow, R. H., Uddin, J., Petasis, N. A., Mircheff, A. K., Farley, R. A., Louei, S. G., Chen, T. C., et Schönthal, A. H. (2007) Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1262-75.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., et Moncada, S. (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), 5193-7.
- Rauhala, P., Andoh, T., et Chiueh, C. C. (2005) Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 Suppl), 91-5.
- Raz, A., Wyche, A., Siegel, N., et Needleman, P. (1988) Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(6), 3022-8.
- Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Brinkmann, A. O., et Trapman, J. (1991) The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Molecular Endocrinology*, 5(12), 1921-30.
- Riendeau, D., Percival, M. D., Brideau, C., Charleson, S., Dube, D., Ethier, D., Falguyret, J.-P., Friesen, R. W., Gordon, R., Greig, G., Guay, J., Mancini, J., Ouellet, M., Wong, E., Xu, L., Boyce, S., Visco, D., Girard, Y., Prasit, P., Zamboni, R., Rodger, I. W., Gresser, M., Ford-Hutchinson, A. W., Young, R. N., et Chan, C.-C. (2001) Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile and Comparison with Other Agents That Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), 558-66.
- Rigas, B. et Williams, J. L. (2002) NO-releasing NSAIDs and colon cancer chemoprevention: a promising novel approach (Review). *International Journal of Oncology*, 20(5), 885-90.
- Rigas, B. et Kashfi, K. (2004) Nitric-oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention. *Trends in Molecular Medicine*, 10(7), 324-30.
- Roberts, D. D., Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., et Wink, D. A. (2007) Nitric Oxide and Its Gatekeeper Thrombospondin-1 in Tumor Angiogenesis. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 795-8.
- Rundhaug, J. E. et Fischer, S. M. (2008) Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, 84(2), 322-9.
- Ryan, C. J., Lin, A. M., et Small, E. J. (2006) Angiogenesis inhibition plus chemotherapy for metastatic hormone refractory prostate cancer: history and rationale. *Urologic Oncology*, 24(3), 250-3.

- Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G., et Needleman, P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), 7240-4.
- Samouilov, A. et Zweier, J. L. (2002) Analytical implications of iron dithiocarbamates for measurement of nitric oxide. *Methods in Enzymology*, 352, 506-22.
- Sandler, H. M. et Eisenberger, M. A. (2007) Assessing and treating patients with increasing prostate specific antigen following radical prostatectomy. *The Journal of Urology*, 178(3 Pt 2), S20-4.
- Santini, G., Sciulli, M. G., Panara, M. R., Padovano, R., di Giamberardino, M., Rotondo, M. T., del Soldato, M. T., et Patrignani, P. (1996) Effects of flurbiprofen and flurbinitroxybutylester on prostaglandin endoperoxide synthases. *European Journal of Pharmacology*, 316(1), 65-72.
- Saransaari, P. et Oja, S. S. (2004) Involvement of nitric oxide in adenosine release in the developing and adult mouse hippocampus. *Neurochemical Research*, 29(1), 219-25.
- Sautebin, L., Ialenti, A., Ianaro, A., et Di Rosa, M. (1995a) Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema. *European Journal of Pharmacology*, 286(2), 219-22.
- Sautebin, L., Ialenti, A., Ianaro, A., et Di Rosa, M. (1995b) Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 114(2), 323-8.
- Schaller, J., Akiyama, K., Tsuda, R., Hara, M., Marti, T. et Rickli, E. E. (1987) Isolation, characterization and amino-acid sequence of gamma-seminoprotein, a glycoprotein from human seminal plasma. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 170(1-2), 111-20.
- Schnitzer, T. J., Kivitz, A. J., Lipetz, R. S., Sanders, N., et Hee, A. (2005) Comparison of the COX-inhibiting nitric oxide donator AZD3582 and rofecoxib in treating the signs and symptoms of Osteoarthritis of the knee. *Arthritis and Rheumatism*, 53(6), 827-37.
- Schönthal, A. H. (2007) Direct non-cyclooxygenase-2 targets of celecoxib and their potential relevance for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 97(11), 1465-8.
- Schönthal, A. H., Chen, T. C., Hofman, F. M., Louie, S. G., et Petasis, N. A. (2008) Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs. *Opinion on Investigational Drugs*, 17(2), 197-208.
- Schulz, P., Stucka, R., Feldmann, H., Combriato, G., Klobeck, H. G., et Fittler, F. (1988) Sequence of a cDNA clone encompassing the complete mature human prostate specific antigen (PSA) and an unspliced leader sequence. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6226.
- Schuur, E. R., Henderson, G. A., Kmetec, L. A., Miller, J. D., Lamparski, H. G., et Henderson, D. R. (1996) Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 7043-51.

- Sciarra, A., Di Silverio, F., Salciccia, S., Autran Gomez, A. M., Gentilucci, A., et Gentile, V. (2007) Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *European Urology*, 52(4), 964-72.
- Sennequier, N. et Vadon-Le Goff, S. (1998) Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/Sciences*, 14(11), 1185-95.
- Sensabaugh, G. F. (1978) Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *Journal of Forensic Sciences*, 23(1), 106-15.
- Sequeira, S. M., Ambrósio, A. F., Malva, J. O., Carvalho, A. P., et Carvalho, C. M. (1997) Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 1(4), 315-29.
- Shan, R., Velazquez, C., et Knaus, E. E. (2004) Syntheses, calcium channel agonist-antagonist modulation activities, and nitric oxide release studies of nitrooxyalkyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)pyridine-5-carboxylate racemates, enantiomers, and diastereomers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(1), 254-61.
- Shangguan, N., Katukojvala, S., Greenberg, R., et Williams, L. (2003) The Reaction of Thio Acids with Azides: A New Mechanism and New Synthetic Applications. *Journal of the American Chemical Society*, 125(26), 7754-5.
- Shen, Y. H., Wang, X. L., et Wilcken, D. E. (1998) Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Letters*, 433(1-2), 125-31.
- Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S. C., Isakson, P., Coffey, R. J., Morrow, J., Beauchamps, R. D., et DuBois, R. N. (1997) Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2254-9.
- Sheu, M. L., Chao, K. F., Sung, Y. J., Lin, W. W., Lin-Shiau, S. Y., et Liu, S. H. (2005) Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. *Cellular Signalling*, 17(8), 975-84.
- Singh, P. et Mittal, A. (2008) Current status of COX-2 inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(1), 73-90.
- Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J., Konorev, E., et Kalyanaraman, B. (1999) The peroxyxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 361(2), 331-9.
- Singh, S. K., Saibaba, V., Rao, K. S., Reddy, P. G., Daga, P. R., Rajjak, S. A., Misra, P., et Rao, Y. K. (2005) Synthesis and SAR/3D-QSAR studies on the COX-2 inhibitory activity of 1,5-diarylpyrazoles to validate the modified pharmacophore. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(10), 977-90.
- Song, X., Lin, H., Johnson, A. J., Tseng, P., Yang, Y.-T., Kulp S. K., et Chen, C.-S. (2002) Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced

- apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(8), 585-91.
- Spencer, A. G., Woods, J. W., Arakawa, T., Singer, I. I., et Smith, W. L. (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9886-93.
- Stadler, J., Stefanovic-Racic, M., Billiar, T. R., Curran, R. D., McIntyre, L. A., Georgescu, H. I., Simmons, R. L., et Evans, C. H. (1991) Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*, 147(11), 3915-20.
- Stamler, J. S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78(6), 931-6.
- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L. K., et Levin, B. (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *The New England Journal of Medicine*, 342(26), 1946-52.
- Subbaramaiah, K., Howe, L. R., Port, E. R., Brogi, E., Fishman, J., Liu, C. H., Hla, T., Hudis, C., et Dannenberg, A. J. (2006) HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Research*, 66(10), 5504-11.
- Suleyman, H., Cadirci, E., Albayrak, A., et Halici, Z. (2008) Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. *Current Medicinal Chemistry*, 15(3), 278-83.
- Takayama, T. K., Fujikawa, K., et Davie, E. W. (1997) Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21582-8.
- Takayama, T. K., McMullen, B. A., Nelson, P. S., Matsumura, M., et Fujikawa, K. (2001) Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry*, 40(50), 15341-8.
- Taldone, F. S., Tummala, M., Goldstein, E. J., Ryzhov, V., Ravi, K. et Black, S. M. (2005) Studying the S-nitrosylation of model peptides and eNOS protein by mass spectrometry. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 13(3), 176-87.
- Talley, J. J., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Koboldt, C. M., Masferrer, J. L., Perkins, W. E., Rogers, R. S., Shaffer, A. F., Zhang, Y. Y., Zweifel, B. S., et Seibert, K. (2000a) 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]- benzenesulfonamide, valdecoxib: a potent and selective inhibitor of COX-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(5), 775-7.
- Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Kellogg, M. S., Koboldt, C. M., Yuan, J., Zhang, Y. Y., et Seibert, K. (2000b) N-[[[5-methyl-3-

- phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(9), 1661-3.
- Tang, X., Xian, M., Trikha, M., Honn, K. V., et Wang, P. G. (2001) Synthesis of peptide-diazoniumdiolate conjugates: towards enzyme activated antitumor agents. *Tetrahedron Letters*, 42(14), 2625-9.
- Taplin, M., Rajeshkumar, B., Halabi, S., Werner, C. P., Woda, B. A., Picus, J., Stadler, W., Hayes, D. F., Kantoff, P. W., Vogelzang, N. J., et Small, E. J. (2003) Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *Journal of Clinical Oncology*, 21(14), 2673-8.
- Teicher, B. A., Korbut, T. T., Menon, K., Holden, S. A., et Ara, G. (1994) Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 33(6), 515-22.
- Telliez, A., Furman, C., Pommery, N., et Hénichart, J. (2006) Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(3), 187-208.
- Telliez, A., Desroses, M., Pommery, N., Briand, O., Farce, A., Laconde, G., Lemoine, A., Depreux, P., et Hénichart, J.-P. (2007) Derivatives of Iressa, a Specific Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor, are Powerful Apoptosis Inducers in PC3 Prostatic Cancer Cells. *ChemMedChem*, 2(3), 318-32.
- Tetsuka, T., Daphna-Iken, D., Srivastava, S. K., Baier, L. D., DuMaine, J., et Morrison, A. R. (1994) Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12168-72.
- Thippeswamy, T. et Morris, R. (1997) Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones. *Brain Research*, 774(1-2), 116-22.
- Tjandrawinata, R. R., Dahiya, R., et Hughes-Fulford, M. (1997) Induction of cyclooxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 75(8), 1111-8.
- Torfgård, K. E. et Ahlner, J. (1994) Mechanisms of action of nitrates. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 8(5), 701-17.
- Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guérin, M., et Torreilles, J. (1999) Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Research Reviews*, 30(2), 153-63.
- Tran, M. H., Yamada, K., Nakajima, A., Mizuno, M., He, J., Kamei, H., et Nabeshima, T. (2003) Tyrosine nitration of a synaptic protein synaptophysin contributes to amyloid beta-peptide-induced cholinergic dysfunction. *Molecular Psychiatry*, 8(4), 407-12.

- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L., et Singh, V. (2007) The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(3), 443-52.
- Tsuji, M. et DuBois, R. N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3), 493-501.
- Tsuji, M., Kawano, S., et DuBois, R. N. (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3336-40.
- Turnbull, C. M., Cena, C., Fruttero, R., Gasco, A., Rossi, A. G., et Megson, I. L. (2006) Mechanism of action of novel NO-releasing furoxan derivatives of aspirin in human platelets. *British Journal of Pharmacology*, 148(4), 517-26.
- Uno, K., Iuchi, Y., Fujii, J., Sugata, H., Iijima, K., Shimosegawa, T., et Yoshimura, T. (2008) In vivo study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(3), 995-1002.
- Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New Biology*, 231(25), 232-5.
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., et Martísek, P. (2003) The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radical Research*, 37(2), 121-7.
- Velázquez, C., Rao, P. N. P., McDonald, R., et Knaus, E. E. (2005) Synthesis and biological evaluation of 3,4-diphenyl-1,2,5-oxadiazole-2-oxides and 3,4-diphenyl-1,2,5-oxadiazoles as potential hybrid COX-2 inhibitor/nitric oxide donor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(8), 2749-57.
- Velázquez, C. A., Praveen Rao, P., Citro, M. L., Keefer, L. K., et Knaus, E. E. (2007) O²-Acetoxymethyl-protected diazeniumdiolate-based NSAIDs (NONO-NSAIDs): Synthesis, nitric oxide release, and biological evaluation studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(14), 4767-74.
- Wadleigh, D. J., Reddy, S. T., Kopp, E., Ghosh, S., et Herschman, H. R. (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6259-66.
- Wallace, J. L., Vergnolle, N., Muscará, M. N., Asfaha, S., Chapman, K., del Soldato, P., Morelli, A., et Fiorucci, S. (1999) Enhanced anti-inflammatory effects of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rats. *Gastroenterology*, 117(3), 557-66.
- Wallace, J. L. et Miller, M. J. (2000) Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, 119(2), 512-20.
- Wallace, J. L., Ignarro, L. J., et Fiorucci, S. (2002) Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(5), 375-82.

- Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., et Chu, T. M. (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, 17(2), 159-63.
- Wang, P. G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T., et Janczuk, A. J. (2002) Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chemical Reviews*, 102(4), 1091-134.
- Wanstall, J. C., Homer, K. L., et Doggrell, S. A. (2005) Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. *Current Vascular Pharmacology*, 3(1), 41-53.
- Watt, K. W., Lee, P. J., M'Timkulu, T., Chan, W. P., et Loo, R. (1986) Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3166-70.
- Weber, A., Casini, A., Heine, A., Kuhn, D., Supuran, C. T., Scozzafava, A., et Klebe, G. (2004) Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(3), 550-7.
- Weinberg, R. A. et Hanahan, D. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Wey, S., Augustyniak, M. E., Cochran, E. D., Ellis, J. L., Fang, X., Garvey, D. S., Janero, D. R., Letts, L. G., Martino, A. M., Melim, T. L., Murty, M. G., Richardson, S. K., Schroeder, J. D., Seilig, W. M., Trocha, A. M., Wexler, R. S., Yound, D. V., Zemtseva, I. S., et Zifcak, B. M. (2007) Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of indomethacin derivatives as cyclooxygenase-2 inhibiting nitric oxide donors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(25), 6367-82.
- Wiese, F. W., Thompson, P. A., et Kadlubar, F. F. (2001) Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis*, 22(1), 5-10.
- Williams, J. L., Borgo, S., Hasan, I., Castillo, E., Traganos, F., et Rigas, B. (2001) Nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) alter the kinetics of human colon cancer cell lines more effectively than traditional NSAIDs: implications for colon cancer chemoprevention. *Cancer Research*, 61(8), 3285-9.
- Wink, D. A. et Laval, J. (1994) The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 15(10), 2125-9.
- Wink, D. A., Christodoulou, D., Ho, M., Krishna, M. C., Cook, J. A., Haut, H., Randolph, J. K., Sullivan, M., Coia, G., Murray, R., et Meyer, T. (1995) A Discussion of Electrochemical Techniques for the Detection of Nitric Oxide. *Methods*, 7(1), 71-7.
- Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W., et Mitchel, J. B. (1998) The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*, 19(5), 711-21.
- Xian, M., Wang, K., Chen, X., Hou, Y., McGill, A., Zhou, B., Zhang, Z. Y., Cheng, J. P., et Wang, P. G. (2000) Inhibition of protein tyrosine phosphatases by low-molecular-

- weight S-nitrosothiols and S-nitrosylated human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2), 310-4.
- Xie, K. et Huang, S. (2003) Regulation of cancer metastasis in stress pathway. *Clinical and Experimental Metastasis*, 20(1), 31-43.
- Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., et Simmons, D. L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), 2692-6.
- Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., et Charles, I. G. (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research*, 12(5-6), 311-20.
- Yabuki, M., Tsutsui, K., Horton, A. A., Yoshioka, T., et Utsumi, K. (2000) Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radical Research*, 32(6), 507-14.
- Yeung, F., Li, X., Ellett, J., Trapman, J., Kao, C., et Chung, L. W. (2000) Regions of prostate-specific antigen (PSA) promoter confer androgen-independent expression of PSA in prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40846-55.
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., et Mori, Y.. (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology*, 2(11), 596-607.
- Young, D. V., Cochran, E. D., Dhawan, V., Earl, R. A., Garvey, D. S., Janero, D. R., Khanapure, S. P., Letts, L. G., Melim, T. L., Murty, M. G., Shumway, M. J., Wey, S.-J., Zemtseva, I. S., et Selig, W. M. (2005) A comparison of the cyclooxygenase inhibitor-NO donors (CINOD), NMI-1182 and AZD3582, using in vitro biochemical and pharmacological methods. *Biochemical Pharmacology*, 70(9), 1343-51.
- Yousef, G. M. et Diamandis, E. P. (2001) The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrine Reviews*, 22(2), 184-204.
- Yuan, P., Plourde, R., Shoemaker, M. R., Moore, C. L., et Hansen, D. E. (1995) A Mimic of Both a Torsionally-Distorted Peptide Ground State and the Transition State for Peptide Bond Hydrolysis: Synthesis of a Spiro[4.4]nonyl Derivative. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(16), 5360-4.
- Zai, A., Rudd, M. A., Scribner, A. W., et Loscalzo, J. (1999) Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(3), 393-9.
- Zarghami, N., Levesque, M., D'Costa, M., Angelopoulou, K., et Diamandis, E. P. (1997) Frequency of expression of prostate-specific antigen mRNA in lung tumors. *American Journal of Clinical Pathology*, 108(2), 184-90.
- Zaviacic, M. et Ablin, R. J. (2000) The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and

- reasons for using the term "prostate" in the human female. *Histology and Histopathology*, 15(1), 131-42.
- Zhang, H., Melamed, J., Wei, P., Cox, K., Frankel, W., Bahnson, R. R., Robinson, N., Pyka, R., Liu, Y., et Zheng, P. (2003) Concordant down-regulation of proto-oncogene PML and major histocompatibility antigen HLA class I expression in high-grade prostate cancer. *Cancer Immunity*, 3, 2.
- Zhang, W. M., Leinonen, J., Kalkkinen, N., Dowell, B., et Stenman, U. H. (1995) Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. *Clinical Chemistry*, 41(11), 1567-73.
- Zhu, X., Pachamuthu, K., et Schmidt, R. (2004) Synthesis of Novel S-Neoglycopeptides from Glycosylthiomethyl Derivatives. *Organic Letters*, 6(7), 1083-5.
- Zhuang, J. C., Wright, T. L., deRojas-Walker, T., Tannenbaum, S. R., et Wogan, G. N. (2000) Nitric oxide-induced mutations in the HPRT gene of human lymphoblastoid TK6 cells and in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(1), 39-47.

Annexes

Appareillages et Techniques
Matériels et Méthodes
Modes opératoires

Appareillages et techniques d'analyse

1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'avancement des réactions est contrôlé par chromatographie sur couche mince sur plaques de silice 60F₂₅₄ d'épaisseur 0,2 mm (réf. 1.05735.0001 Merck). La révélation est effectuée par une détection UV (254 et 366 nm) pour les produits possédant une liaison conjuguée, et par coloration à l'iode dans tous les cas. L'éluant et le rapport frontal (Rf) sont précisés dans les protocoles chimiques.

2. Chromatographie sur colonne

Les purifications par chromatographie sur colonne sont réalisées sur gel de silice 60, de granulométrie 0,040 - 0,063 mm (réf. 1.11567.9025 Merck). L'éluant est choisi de façon à obtenir un Rf compris entre 0,20 et 0,25 sur plaques CCM.

3. Points de fusion

Les points de fusion sont réalisés sur un appareil Büchi 530. Ils sont exprimés en degrés Celsius (°C) et ne sont pas corrigés.

4. Spectrométrie infrarouge

Les spectres infrarouges sont réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker Vector 22. Les produits sont déposés directement sur le disque en germanium de l'appareil de mesure. Les fréquences caractéristiques sont repérées par leur nombre d'onde (ν exprimé en cm^{-1}).

5. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ¹H sont enregistrés à 300 MHz sur un appareil à transformée de Fourier Bruker AC 300P du laboratoire d'application de RMN (Service Commun de Physico-Chimie de l'Université de Lille 2). Le TMS (triméthylsilane) est utilisé comme référence interne. Les spectres sont enregistrés à température ambiante. Les signaux sont repérés par leur déplacement chimique (δ en ppm), leur intensité (nombre de H), leur multiplicité (s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; qt, quintuplet ; m, massif ou multiplet ; dd, doublet dédoublé ; sl, singulet large) et éventuellement leur constante de couplage (J en Hz). Pour les massifs, celle-ci n'est pas mesurable.

6. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les spectres LC-MS sont enregistrés sur un appareil Thermo Electron Surveyor MSQ (Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université de Lille 2). La chromatographie liquide haute performance (colonne ODS, phase mobile : eau / acétonitrile / acide formique en mode gradient) est couplée à un détecteur UV et à un détecteur de masse, type APCI⁺ (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique) ou ESI (Ionisation par Electro-Spray).

7. Synthèse peptidique automatisée

Les peptides sont synthétisés sur automate CEM – Liberty couplé à un réacteur à micro-ondes CEM – Discover. Les programmes utilisés sont pré-intégrés au logiciel d'exploitation, et choisis en fonction de la quantité et de la séquence peptidique voulues.

8. Chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse pour les peptides et composés 10 à 15

Les chromatogrammes sont réalisés sur un appareil Waters 2695, muni d'une colonne phase inverse (C18, 5 μ m), de phase mobile eau/acétonitrile/TFA (Tampon A : eau – 0,05 % TFA ; Tampon B : 80 % acétonitrile, 19,95 % eau, 0,05 % TFA). La détection est effectuée à l'aide d'un détecteur UV Waters 2996 balayant un spectre allant de 215 à 280 nm. Les spectres sont enregistrés avec le logiciel Empower, et les résultats sont exprimés dans les modes opératoires sous forme de « % tampon B », représentant le pourcentage minimum de tampon B permettant de faire migrer le produit sur la colonne. Ceci permet d'accommoder les différences de gradient utilisés (de 30 minutes minimum).

La détection de masse est effectuée par un appareil pouvant être couplé à la CLHP Waters Micromass ZQ à détection ESCI⁺.

9. Détection de masse MALDI / TOF

Les spectres MALDI/TOF sont réalisés sur un appareil Voyager-DE STR de PerSeptive Biosystem, sur plaques inox avec pour matrice l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque.

10. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

Les spectres RPE ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker ELEXYS E580 fonctionnant à 9,5 GHz avec une haute fréquence de modulation de 100 kHz et une modulation d'amplitude de 1 G. Les échantillons ont été examinés dans des tubes de quartz insérés dans une cavité standard thermorégulée par de l'azote liquide. Le signal RPE du NO piégé par le N,N-diéthylthiocarbamate consiste en un triplet présentant une constante hyperfine de 13 G. Les quantités libérées ont été évaluées par double intégration en prenant comme référence interne le 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy (TEMPO).

Matériel et méthodes :

1. Mesure des activités COX-1 et COX-2

Les tests sur sang total humain ont été réalisés par Jean Pommery (Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2). Le sang veineux, fraîchement collecté sous héparine (moins de 5 h), provenait de volontaires sains.

a) Protocole d'incubation

Les molécules à tester solubilisées dans le DMSO (concentration de 10^{-4} à 10^{-7} M ; le pourcentage de DMSO doit rester < 1 % dans l'incubation totale) sont incubées dans 1 mL de sang 15 min à 37 °C.

Pour évaluer l'activité COX-2, il est nécessaire de procéder à une stimulation, d'une durée de 24 h, par le lipopolysaccharide (LPS) (100 µL d'une solution à 5 mg/mL dans le PBS – tampon phosphate salin-).

L'écicosanoïde marqueur (12-HHTr) est extrait par 3 mL d'acétate d'éthyle. Après 5 min de centrifugation à 2500 tr/min, le surnageant est récupéré, puis évaporé à sec sous courant d'azote, à 40 °C. Le résidu sec est repris par la phase mobile puis analysé en CLHP.

b) Analyse chromatographique

La pompe utilisée (CLHP Waters, modèle 600 Controller) est couplée à un détecteur UV (modèle 2487) et la colonne (Hypersil C18 5 µm, 12,5 x 0,48 mm) est protégée par une colonne de garde de même phase stationnaire. La phase mobile est constituée par un mélange de méthanol (contenant 0,05 % d'acide acétique 18 M) et d'eau (contenant également 0,05 % d'acide acétique 18 M) ; cette solution est tamponnée à pH = 6 par NH₄OH (à 25 % dilué au dixième). Le débit est de 1 mL.min⁻¹.

Le gradient d'éluion et la longueur d'onde de détection UV sont détaillés ci-après, en fonction du temps :

Temps (min.)	Phase mobile (%)		Longueur d'onde λ (nm)
	méthanol	eau	
0	70	30	270
10	80	20	234
18,1	100	0	234
22,9	100	0	234
23	70	30	234
30	70	30	234
31	70	30	270

c) Interprétation des chromatogrammes

Si COX-2 n'est pas induite par le LPS, le marqueur 12-HHTr est représentatif de l'activité COX-1 ; sinon, il reflète l'ensemble des activités des deux isoformes COX-1 et COX-2.

Le résultat est exprimé par le ratio de l'intensité du signal de l'écicosanoïde (I_{marqueur}) sur celui du standard interne (I_{standard}) : $k = I_{\text{marqueur}} / I_{\text{standard}}$

d) *Mesure de libération de l'inhibiteur de cyclooxygénase à partir du donneur de NO de la molécule mixte*

Cette mesure est également faite par CLHP, avec le même protocole que les mesures d'activité d'inhibition enzymatique, avec 2 différences majeures :

- l'étalonnage est alors effectué en utilisant une quantité égale d'inhibiteur de cyclooxygénase dépourvu de sa partie donneuse de NO
- la longueur d'onde de la mesure est celle du maximum d'absorption pour l'inhibiteur.

Le pourcentage d'inhibiteur relargué (% relargage) est alors évalué par le rapport de l'aire sous la courbe du chromatogramme du produit évalué ($AUC_{\text{relargué}}$) et de celle du produit standard (AUC_{ref}), soit :

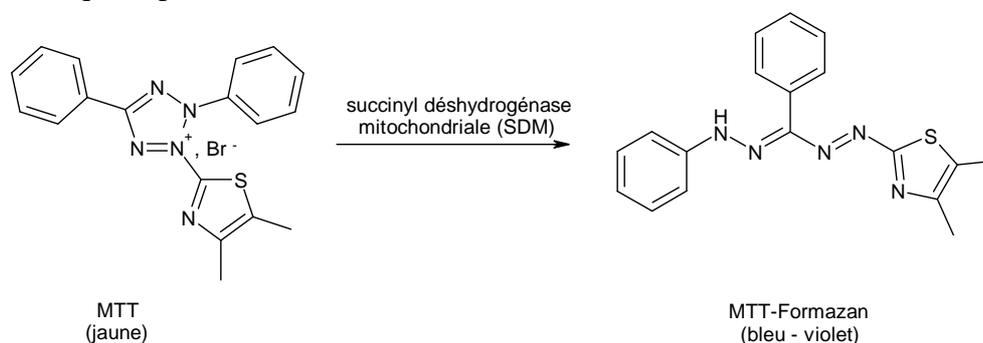
$$\% \text{ relargage} = 100 \times A_{\text{relargué}}/A_{\text{ref}}$$

2. Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire

Les mesures d'inhibition de la prolifération cellulaire ont été réalisées à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol par Amélie Lemoine, sous la direction de Nicole Pommery.

L'activité antiproliférative des molécules est mesurée sur la lignée cellulaire cancéreuse humaine PC3 (métastases osseuses du cancer de la prostate au stade hormono-indépendant). La croissance cellulaire est déterminée par mesure d'une activité enzymatique (test MTT). Les cellules sontensemencées dans leur milieu de culture respectif en plaques de 96 puits. On les laisse adhérer et se diviser pendant 72 h. Elles sont ensuite cultivées pendant 24 h dans un milieu dépourvu de sérum, ce qui leur permet d'entrer dans une phase de différenciation appelée phase de quiescence. Les molécules à tester sont alors mises au contact des cellules pendant 72 h, à différentes concentrations (de 10^{-4} à 10^{-6} M généralement). A l'issue de ce traitement, leur activité est évaluée grâce au test MTT. Ce test met en jeu le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), sel de couleur jaune soluble dans l'eau. Les cellules vivantes possèdent des déshydrogénases mitochondriales, enzymes capables de cliver ce sel en un dérivé formazan, de couleur bleue, insoluble en milieu aqueux.

La réaction qui se produit est la suivante :



Le MTT est laissé au contact des cellules traitées pendant 4 h, puis les cristaux bleus de formazan sont solubilisés dans une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium) / HCl, pendant 8 h à 37 °C. On mesure alors l'absorbance (A) du contenu du puits à 570 nm, avec une correction à 630 nm, absorbance proportionnelle au nombre de cellules vivantes. On peut ainsi déterminer le pourcentage de croissance :

$$\% \text{ croissance} = (A_{t=72h} - A_0) / (A_0) \times 100$$

On obtient ensuite des pourcentages d'inhibition vis-à-vis de la croissance du témoin, ce qui va permettre de calculer, quand cela est possible, les CI_{50} des produits.

3. Manipulations de Vasorelaxation

a) Liquide de Krebs

Ce liquide est préparé à partir d'eau distillée afin d'obtenir la composition suivante : NaCl 118,50 mM ; NaHCO₃ 25,00 mM ; KCl 4,75 mM ; MgSO₄·7H₂O 1,19 mM ; CaCl₂·2H₂O 1,36 mM ; KH₂PO₄ 1,18 mM ; glucose 11,10 mM. Il est ensuite ajusté à pH = 7,4 par de l'acide chlorhydrique dilué ou de la soude diluée.

b) Vasorelaxation

Les aortes sont prélevées sur des rats de 200 – 220 g puis placées dans des bains de liquide de Krebs oxygénés par un mélange 95 % O₂ / 5 % CO₂ refroidis à 5°C. Elles y sont alors nettoyées des tissus graisseux et conjonctifs, puis découpées en tronçons de 2 à 3 mm de long qui sont montés sur les étriers de mesures et placés dans les bains de l'appareil Radnoti Glass Technology contenant 40 mL de liquide de Krebs thermostaté à 37°C. L'appareil de mesure de force est relié par une interface informatique vers le logiciel Workbench, et est préalablement étalonné par des poids de 2 grammes.

Après 1 h d'équilibrage à cette température, différentes concentrations et volumes sont ajoutés au bain d'incubation afin d'atteindre les concentrations voulues, les mesures étant prises lorsque la force exercée par l'aorte sur le tenseur se stabilise.

Modes opératoires

Synthèse des peptides



❖ Protocole expérimental :

Le synthétiseur est chargé avec de la résine TGR pour le peptide amide Ac-ANFQC-NH₂, ou de la résine de Wang portant le premier acide aminé dans le cas des peptides acides Ac-ANFQG-OH et Ac-ANFQA-OH. Il est programmé de manière à protéger par acétylation le peptide en N-terminal.

La résine chargée récupérée en fin de synthèse est alors lavée par des quantités de solvant permettant de la recouvrir, une fois par le DMF, trois fois par le DCM pendant 2 minutes. Elle est ensuite séchée par lavage par l'éther (3 x 2 minutes), puis 1 heure sous vide.

Le mélange de clivage est alors versé de manière à recouvrir la résine, qui est mise sous agitation pendant 1h30. La solution ainsi obtenue est filtrée puis précipitée au goutte à goutte dans un mélange d'éther (50 mL) et d'heptane (50 mL). Après centrifugation à 3500 t/min pendant 10 minutes, le précipité est isolé, repris dans l'eau puis lyophilisé.

Peptide	Mélange de clivage	Rendement
Ac-ANFQC-NH ₂	TFA (94 %), H ₂ O (2,5 %), (1,2)-éthanedithiol (2,5 %), triisopropylsilane (1 %)	70 %
Ac-ANFQG-OH	TFA (95 %), H ₂ O (2,5 %), triisopropylsilane (2,5 %)	78 %
Ac-ANFQA-OH	TFA (95 %), H ₂ O (2,5 %), triisopropylsilane (2,5 %)	75 %

❖ Caractéristiques :

Peptide	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect
Ac-ANFQC-NH ₂	C ₂₆ H ₃₈ N ₈ O ₈ S	622	Poudre blanche
Ac-ANFQG-OH	C ₂₅ H ₃₅ N ₇ O ₉	577	Poudre blanche
Ac-ANFQA-OH	C ₂₆ H ₃₇ N ₇ O ₉	591	Poudre blanche

❖ Analyses :

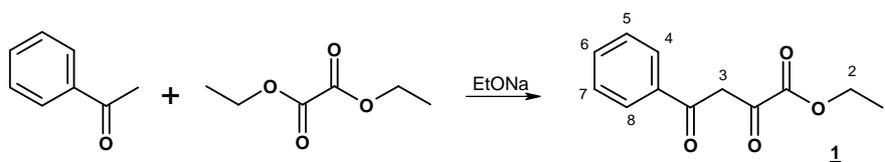
LC/MS :

Peptide	% tampon B	MH ⁺ (g.mol ⁻¹)	Pureté %	λ _{max} (nm)
Ac-ANFQC-NH ₂	23,7	623	85	215
Ac-ANFQG-OH	26,7	578	96	215
Ac-ANFQA-OH	30,6	592	98	215

MALDI / TOF :

Peptide	Masses détectées (g.mol ⁻¹)
Ac-ANFQC-NH ₂	645,4 (+Na ⁺), 661,3 (+K ⁺)
Ac-ANFQG-OH	600 (+Na ⁺), 613 (+K ⁺)
Ac-ANFQA-OH	614 (+Na ⁺), 630,3 (+K ⁺)

Synthèse du 2,4-dioxo-4-phénylbutyrate d'éthyle 1



❖ Protocole expérimental :

On introduit par petits morceaux le sodium (6,26 g, 0,27 mol, 2 éq) dans l'éthanol absolu (200 mL). Un mélange d'acétophénone (16,36 g, 0,14 mol, 1 éq) et d'oxalate de diéthyle (39,8 g, 0,27 mol, 2 éq), dilué dans l'éthanol (100 mL) est ajouté au goutte à goutte. Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux pendant 2 h.

Après évaporation du solvant, le mélange obtenu est repris dans l'eau glacée (500 mL), neutralisé par ajout de HCl 1N, puis extrait par l'éther (3 x 250 mL). La phase organique ainsi obtenue est lavée par l'eau saturée en NaCl, séchée sur MgSO₄ puis concentrée.

Le 2,4-dioxo-4-phénylbutyrate d'éthyle ainsi obtenu avec un rendement de 62 % est utilisé brut dans les réactions suivantes.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₂H₁₂O₄

Masse molaire : 220 g.mol⁻¹

Aspect : huile acajou

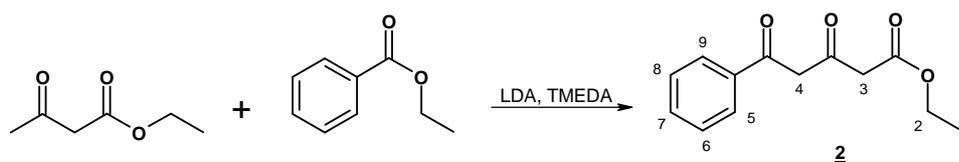
R_f (Hept 6 / AcOEt 4) : 0,47

❖ Analyses :

IR : 1735 cm⁻¹ ν (ester)

1600 cm⁻¹ ν (cétone)

Synthèse du 3,5-dioxo-5-phénylpentanoate d'éthyle 2



❖ Protocole expérimental :

Une solution de diisopropylamide de lithium est préparée par addition de diisopropylamine (5 g, 0,05 mol, 2,5 éq) dans le *n*-butyllithium (1,6 M dans l'hexane, 31 mL, 0,05 mol, 2,5 éq) à 0 °C. Après ajout de tétraméthyléthylènediamine (2 mL) dans l'éther (50 mL), un mélange d'acétoacétate d'éthyle (2,6 g, 0,02 mol, 1 éq) et de benzoate d'éthyle (3,75 g, 0,025 mol, 1,25 éq) dilué dans l'éther (50 mL) est ajouté sous atmosphère inerte.

Après 17 h de réaction, l'acide acétique (6 g, 0,1 mol, 5 éq) dilué dans l'éther (75 ml) est ajouté au milieu réactionnel avant que l'eau (50 mL) ne soit ajoutée à 0 °C. La phase étherée est ensuite séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hept 7 / AcOEt 2) pour donner le 3,5-dioxo-5-phénylpentanoate d'éthyle avec un rendement de 86 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₃H₁₄O₄

Masse molaire : 234 g.mol⁻¹

Aspect : Huile orange

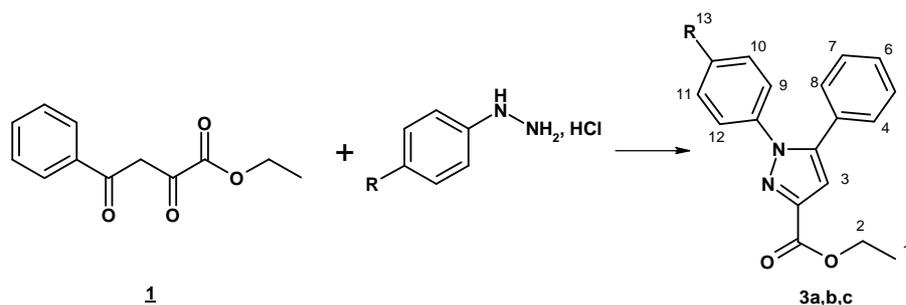
R_f (Hept 6 / AcOEt 3) : 0,46

❖ Analyses :

IR : 1739 cm⁻¹ ν (CO ester)

1629 cm⁻¹ ν (CO cétone)

Synthèse des 1-aryl-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylates d'éthyle 3a,b,c



❖ Protocole expérimental :

Le 2,4-dioxo-4-phénylbutyrate d'éthyle (0,9 g, 4 mmol, 1 éq) est solubilisé dans l'éthanol (25 mL). L'hydrazine (4 mmol, 1 éq) est ajoutée sous agitation et à température ambiante.

Après 4 h de réaction à reflux, le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'éther, puis filtré. La purification est effectuée comme précisé dans le tableau suivant.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
3a	H	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	Chromatographie : (Cyclo 9 / AcOEt 1)	70 %
3b	SO ₂ CH ₃	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	Recristallisation dans EtOH 95%	60 %
3c	SO ₂ NH ₂	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	-	68 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)
3a	Chlorhydrate de phénylhydrazine	144	0,58
3b	Chlorhydrate de 4-méthanesulfonylphénylhydrazine	222	0,9
3c	Chlorhydrate de 4-aminosulfonylphénylhydrazine	223	0,9

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect	R _f
3a	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₂	292	Poudre orange	(Cyclo 5 / AcOEt 5) 0,64
3b	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	370	Poudre beige	(Cyclo 4 / AcOEt 6) 0,44
3c	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	371	Poudre orange	(Cyclo 4 / AcOEt 6) 0,35

❖ Analyses :

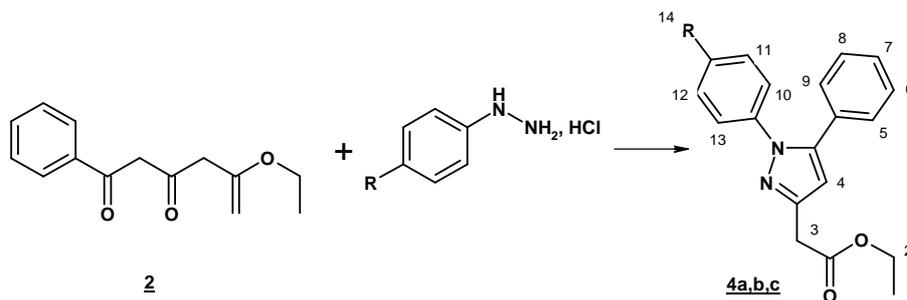
IR :

Composé	ν (cm ⁻¹)	Fonctions
3a	1713	CO ester
3b	1714	CO ester
3c	1723	CO ester

RMN ¹H :

Composé	Solvant	δ (ppm)
3a	CDCl ₃	7,45 - 7,20 (m, 10H, H _{arom}) ; 7,06 (s, 1H, H ₃) ; 4,46 (q, 2H, H ₂ , J = 7,1 Hz) ; 1,44 (t, 3H, H ₁ , J = 7,1 Hz)
3b	DMSO-d ₆	8,00 (d, 2H, H _{10,11} , J = 8,7 Hz) ; 7,60 (d, 2H, H _{9,12} , J = 9,0 Hz) ; 7,44 - 7,40 (m, 3H, H _{5,6,7}) ; 7,35 - 7,30 (m, 2H, H _{4,8}) ; 7,18 (s, 1H, H ₃) ; 4,35 (q, 2H, H ₂ , J = 7,0 Hz) ; 3,29 (s, 3H, H ₁₃) ; 1,33 (t, 3H, H ₁ , J = 7,0 Hz)
3c	CDCl ₃	7,87 (dd, 2H, H _{10,11} , J _o = 8,8 Hz, J _m = 2,0 Hz) ; 7,45 (dd, 2H, H _{9,12} , J _o = 8,8 Hz, J _m = 2,0 Hz) ; 7,40 - 7,33 (m, 3H, H _{5,6,7}) ; 7,24 - 7,20 (m, 2H, H _{4,8}) ; 7,04 (s, 1H, H ₃) ; 5,26 (s, 2H, H ₁₃) ; 4,45 (q, 2H, H ₂ , J = 7,1 Hz) ; 1,43 (t, 3H, H ₁ , J = 7,1 Hz)

Synthèse des 1-aryl-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylates d'éthyle 4a,b,c



❖ Protocole expérimental :

Le 3,5-dioxo-5-phénylpentanoate d'éthyle (1,4 g, 6 mmol, 1 éq) est solubilisé dans l'éthanol (100 mL). L'hydrazine (6 mmol, 1 éq) est ajoutée sous agitation et à température ambiante,.

Après 16 h de réaction à reflux, le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'éther, puis filtré. La purification est effectuée comme précisé dans le tableau suivant.

<i>Composé</i>	<i>R</i>	<i>Nom</i>	<i>Purification</i>	<i>Rendement</i>
4a	H	2-(1,5-diphényl-1H-pyrazol-3-yl)acétate d'éthyle	Chromatographie : (Hept 8 / AcOEt 2)	70 %
4b	SO ₂ CH ₃	2-(1-(4-(méthylsulfonyl)phényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-yl)acétate d'éthyle	Chromatographie : (Hept 5 / AcOEt 5)	60 %
4c	SO ₂ NH ₂	2-(1-(4-(aminosulfonyl)phényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-yl)acétate d'éthyle	Chromatographie : (Hept 5 / AcOEt 5)	25%

❖ Réactifs :

<i>Composé</i>	<i>Réactant</i>	<i>Masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>Masse (g)</i>
4a	Chlorhydrate de phénylhydrazine	144	0,86
4b	Chlorhydrate de 4-méthanesulfonylphénylhydrazine	222	1,3
4c	Chlorhydrate de 4-aminosulfonylphénylhydrazine	223	1,3

❖ Caractéristiques :

<i>Composé</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>Aspect</i>	<i>R_f</i>
4a	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₂	306	Poudre orange	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,61
4b	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	384	Poudre beige	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,11
4c	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	385	Poudre orange	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,14

❖ Analyses :

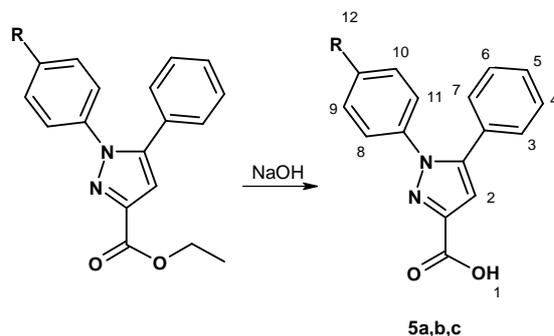
IR :

<i>Composé</i>	<i>v (cm⁻¹)</i>	<i>Fonctions</i>
4a	1738	CO ester
4b	1734	CO ester
4c	1733	CO ester

RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	<i>δ (ppm)</i>
4b	DMSO- <i>d</i> ₆	7,9 (d, 2H, H _{11,12} , J = 6,7 Hz) ; 7,51 (d, 2H, H _{10,13} , J = 6,7 Hz) ; 7,39 – 7,36 (m, 3H, H _{6,7,8}) ; 7,28 – 7,25 (m, 2H, H _{5,9}) ; 6,56 (s, 1H, H ₄) ; 4,27 (q, 2H, H ₂ , J = 7,0 Hz) ; 3,80 (s, 2H, H ₃) ; 3,06 (s, 3H, H ₁₄) ; 1,33 (t, 3H, H ₁ , J = 7,0 Hz)
4c	CDCl ₃	7,75 (d, 2H, H _{11,12} , J = 8,8 Hz) ; 7,35 (d, 2H, H _{10,13} , J = 8,8 Hz) ; 7,33 – 7,19 (m, 5H, H _{5,9}) ; 6,56 (s, 1H, H ₄) ; 5,60 (s, 2H, H ₁₄) ; 4,25 (q, 2H, H ₂ , J = 7,1 Hz) ; 3,81 (s, 2H, H ₃) ; 1,33 (t, 3H, H ₁ , J = 7,1 Hz)

Synthèse des acides 1-aryl-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique 5a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'ester éthylique (5,4 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le méthanol (50 mL) avant d'ajouter NaOH (0,675 g, 27 mmol, 5 éq) diluée dans un minimum d'eau.

Après 16 h de réaction, le milieu réactionnel est concentré. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'eau (100 mL) puis lavé par l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase aqueuse est alors amené à pH \approx 6 par ajout de HCl 1N. Après extraction par l'acétate d'éthyle (3 x 40 mL), séchage sur MgSO₄ et concentration, on obtient l'acide carboxylique sous forme solide.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
5a	H	acide 1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	Recristallisation dans l'isopropanol	71 %
5b	SO ₂ CH ₃	acide 1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	Recristallisation dans EtOH 95%	85 %
5c	SO ₂ NH ₂	acide 1-(4-aminosulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	Recristallisation dans l'éther	79 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)
5a	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	292	1,58
5b	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	370	2
5c	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	371	2

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect	R _f	Fusion (°C)
5a	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	264	Poudre jaune	(MeOH 1 / CH ₂ Cl ₂ 9) 0,2	185-186
5b	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	342	Poudre jaune	(MeOH 1 / CH ₂ Cl ₂ 9) 0,2	189-190
5c	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	343	Poudre jaune	(AcOEt 5 / Hept 5) 0,5	décomposition

❖ Analyses :

IR :		
Composé	ν (cm ⁻¹)	Fonctions
5a	1704	CO acide
5b	1696	CO acide
5c	1700	CO acide

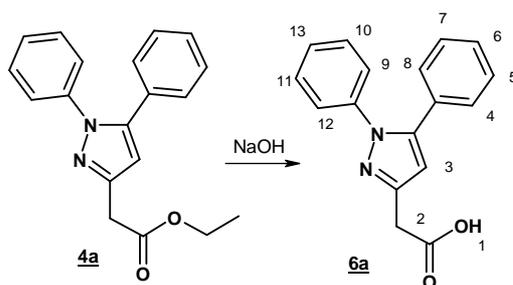
RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	δ (ppm)
<u>5a</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	13,00 (sl, 1H, H ₁) ; 7,47 – 7,23 (m, 10H, H _{arom}) ; 7,07 (s, 1H, H ₂)
<u>5b</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	13,15 (sl, 1H, H ₁) ; 8,00 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,8 Hz) ; 7,56 – 7,29 (m, 7H, H _{3-8,11}) ; 7,11 (s, 1H, H ₂) ; 3,27 (s, 3H, H ₁₂)
<u>5c</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	13,14 (sl, 1H, H ₁) ; 7,86 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,5 Hz) ; 7,52 – 7,29 (m, 9H, H _{3-8,11,12}) ; 7,09 (s, 1H, H ₂)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	λ_{max} (nm)	<i>Pureté</i>
<u>5a</u>	3,63	265	250	98,5 %
<u>5b</u>	3,13	343	250	96 %
<u>5c</u>	2,98	344	250	99 %

Synthèse de l'acide 2-(1,5-diphényl-1H-pyrazol-3-yl)acétique 6a



❖ Protocole expérimental :

L'ester éthylique (0,3 g, 0,99 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le méthanol (30 mL) avant d'ajouter NaOH (0,2 g, 4,95 mmol, 5 éq) diluée dans un minimum d'eau.

Après 16 h de réaction, le milieu réactionnel est dilué dans l'eau (200 mL), lavé par l'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase aqueuse est alors acidifiée à pH = 4 par une solution de HCl concentrée. Après extraction par l'acétate d'éthyle et évaporation du solvant, on obtient un solide qui recristallisé dans un mélange H₂O 8 /EtOH 2 donne l'acide carboxylique pur.

Caractéristiques :

Formule brute : C₁₇H₁₄N₂O₂

Masse molaire : 278 g.mol⁻¹

Aspect : Poudre orange

Ne migre pas en CCM.

❖ Analyses :

IR : 1736 cm⁻¹ v (CO acide)

RMN ¹H (DMSO - d₆) : δ (ppm) :

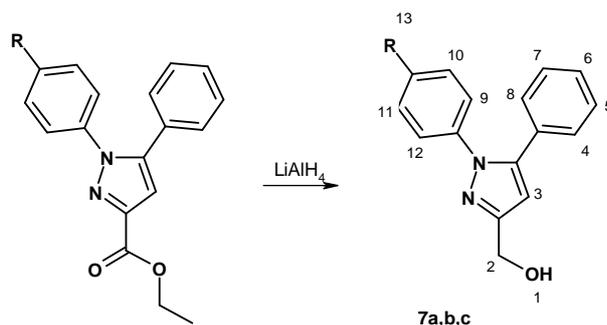
12,48 (s, 1H, H₁) ; 7,42 – 7,20 (m, 10H, H₄₋₁₃) ; 6,57 (s, 1H, H₃) ; 3,65 (s, 2H, H₂).

LC/MS :

tr : 3,53 min

MH⁺ : 279 g/mol⁻¹

Synthèse des 1-aryl-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1H-pyrazoles 7a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'ester éthylique de diarylpyrazole (4,8 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le tétrahydrofurane (20 mL) puis une suspension de LiAlH_4 (0,37 g, 9,6 mmol, 2 éq) dans le tétrahydrofurane (5 mL) est ajoutée lentement.

Après 3 h de réaction à température ambiante, une solution aqueuse de HCl 1N est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH neutre. Après concentration du milieu, le résidu est repris par l'acétate d'éthyle (100 mL), lavée par l'eau (100 mL) puis par l'eau saturée en NaCl (100 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 et concentrée. Le produit est obtenu sous forme de poudre.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
7a	H	1,5-(diphényl)-3-hydroxyméthyl-1H-pyrazole	Recristallisation dans EtOH 95 %	84 %
7b	SO_2CH_3	1-(4-méthanesulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1H-pyrazole	-	95 %
7c	SO_2NH_2	1-(4-aminosulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1H-pyrazole	Recristallisation dans ACN	84%

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Masse (g)
7a	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	292	1,4
7b	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	370	1,78
7c	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	371	1,78

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Aspect	Rf	Fusion ($^{\circ}\text{C}$)
7a	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$	250	Solide blanc	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,14	113 - 115
7b	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	328	Solide blanc	(Cyclo 8 / AcOEt 2) 0,22	133 - 134
7c	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	329	Solide blanc	(Cyclo 8 / AcOEt 2) 0,18	186 - 188

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
7a	3361 1507	CO alcool primaire C=C pyrazole
7b	3134 1591	CO alcool primaire C=C pyrazole
7c	3298 1595	CO alcool primaire C=C pyrazole

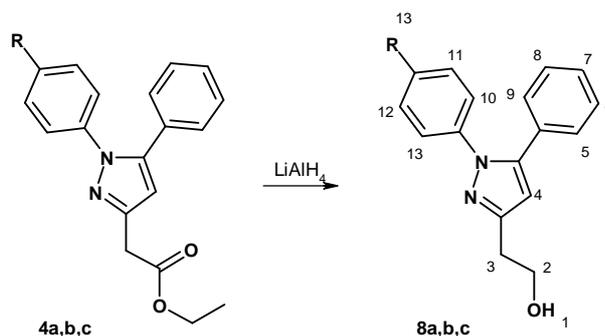
RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	δ (ppm)
<u>7a</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	7,45 – 7,33 (m, 6H, H _{arom}) ; 7,24 – 7,20 (m, 4H, H _{arom}) ; 6,60 (s, 1H, H ₃) ; 5,22 (t, 1H, H ₁ , J = 5,8 Hz) ; 4,51 (d, 2H, H ₂ , J = 5,8 Hz)
<u>7b</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	7,88 (d, 2H, H _{10,11} , J = 8,5 Hz) ; 7,49 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,8 Hz) ; 7,42 – 7,34 (m, 3H, H ₅₋₇) ; 7,33 – 7,21 (m, 2H, H _{4,8}) ; 6,56 (s, 1H, H ₃) ; 5,22 (t, 1H, H ₁ , J = 5,8 Hz) ; 4,80 (s, 2H, H ₂) ; 3,06 (s, 3H, H ₁₃)
<u>7c</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	7,79 (d, 2H, H _{10,11} , J = 8,4 Hz) ; 7,45 – 7,41 (m, 7H, H _{4-8,13}) ; 7,28 – 7,25 (m, 2H, H _{9,12}) ; 6,64 (s, 1H, H ₃) ; 5,27 (t, 1H, H ₁ , J = 5,8 Hz) ; 4,76 (s, 2H, H ₂)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺</i>	λ_{max} (nm)	<i>Pureté</i>
<u>7a</u>	3,46	251	250	99 %
<u>7b</u>	3,22	329	250	98,9 %
<u>7c</u>	2,86	330	250	99,7 %

Synthèse des 1-aryl-3-hydroxyéthyl-5-phényl-1H-pyrazoles **8a, c**



❖ Protocole expérimental :

L'ester éthylique de diarylpyrazole (4 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le tétrahydrofurane (50 mL) puis une suspension de LiAlH_4 (0,46 g, 12 mmol, 3 éq) dans le tétrahydrofurane (10 ml) est ajoutée lentement.

Après 4 h de réaction à température ambiante, une solution aqueuse de HCl 1N est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH neutre. Après concentration du milieu, le résidu est repris par l'acétate d'éthyle (150 mL), lavée par l'eau (100 mL) puis par l'eau saturée en NaCl (100 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 et concentrée.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
8a	H	1,5-(diphényl)-3-(2-hydroxyéthyl)-1H-pyrazole	Recristallisation dans Heptane	95 %
8c	SO_2NH_2	1-(4-aminosulfonylphényl)-3-(2-hydroxyéthyl)-5-phényl-1H-pyrazole	Recristallisation dans ACN	94 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Masse (g)
8a	2-(1,5-diphényl-1H-pyrazol-3-yl)acétate d'éthyle	306	1,23
8c	2-(1-(4-(aminosulfonyl)phényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-yl)acétate d'éthyle	388	1,55

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Aspect	R _f	Fusion (°C)
8a	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$	264	Solide jaune	(Hept 2/ AcOEt 8) 0,64	119 - 121
8c	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	343	Poudre blanche	(Hept 2/ AcOEt 8) 0,06	196 - 198

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
8a	3289 1506	CO alcool primaire C=C pyrazole
8c	3293 1595	CO alcool primaire C=C pyrazole

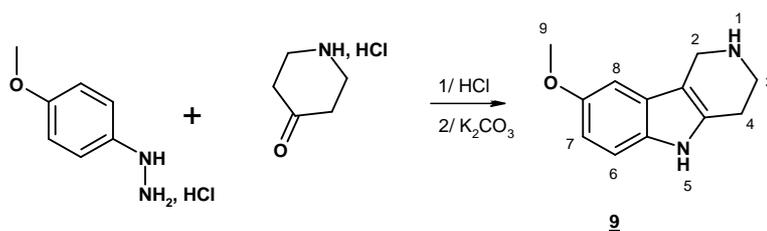
RMN ^1H :

Composé	Solvant	δ (ppm)
8a	DMSO - d_6	7,34 – 7,32 (m, 6H, H_{arom}) ; 7,23 – 7,18 (m, 4H, H_{arom}) ; 6,51 (s, 1H, H_4) ; 4,71 (t, 1H, H_1 , J = 5,7 Hz) ; 3,76 (q, 2H, H_2 , J = 5,7 Hz) ; 2,78 (t, 2H, H_3 , J = 5,7 Hz)
8c	DMSO - d_6	7,79 (d, 2H, $\text{H}_{11,12}$, J = 8,4 Hz) ; 7,45 – 7,38 (m, 7H, $\text{H}_{5-8,10,13}$) ; 7,25 (s, 2H, H_{13}) ; 6,56 (s, 1H, H_4) ; 4,73 (t, 1H, H_1 , J = 5,8 Hz) ; 3,74 (q, 2H, H_2 , J = 5,8 Hz) ; 2,80 (t, 2H, H_3 , J = 5,8 Hz)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
8a	3,55	265	250	98 %
8c	3,04	344	255	95 %

Synthèse du 8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole 9



❖ Protocole expérimental :

La 4-méthoxyphénylhydrazine (10 g, 57 mmol, 1 éq) et la 4-pipéridone (8,8 g, 57 mmol, 1 éq) sont dissoutes dans l'éthanol saturé en HCl (100 mL). Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux sous agitation pendant 1 h.

Après refroidissement, le précipité est isolé et lavé par l'acétonitrile chaud. Ce précipité est ensuite mis en suspension 30 min dans une solution de K₂CO₃ à 10 % (100 mL) afin de neutraliser l'acide chlorhydrique restant.

Après filtration et lavage, on obtient un solide de couleur beige (86 %).

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₂H₁₄N₂O

Masse molaire : 202 g.mol⁻¹

Aspect : Solide beige

Rf (DCM 9 / MeOH 1 ; NH₃) : 0,51

❖ Analyses :

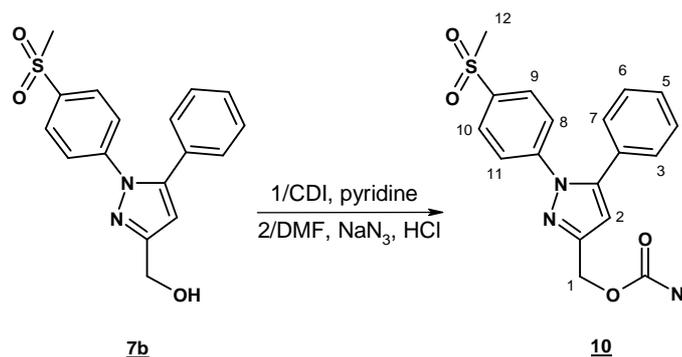
IR : 1592 cm⁻¹ v (NH indolique)

1460 cm⁻¹ v (méthoxy)

*RMN*¹H (DMSO - d₆) : δ (ppm) :

10,50 (s, 1H, H₅) ; 7,14 (d, 1H, H₆, J = 8,9 Hz) ; 6,81 (d, 1H, H₈, J = 2,2 Hz) ; 6,63 (dd, 1H, H₇, J_o = 8,9 Hz, J_m = 2,2 Hz) ; 3,81 (s, 1H, H₂) ; 3,73 (s, 3H, H₉) ; 3,00 (t, 2H, H₄, J = 5,5 Hz) ; 2,64 (t, 2H, H₃, J = 5,0 Hz) ; 2,27 (s, 1H, H₁)

Azidoformate de 1-(4-méthanesulfonylphényl) 5-phényl-1H-pyrazole-3-méthyle 10



❖ Protocole expérimental :

A une solution de 1-(4-méthanesulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1H-pyrazole (100 mg, 0,3 mmol, 1 éq) solubilisé dans le toluène (2 mL) est ajouté le carbonyldiimidazole (98,9 mg, 0,6 mmol, 2 éq) puis la pyridine (75 μ L, 0,9 mmol, 3 éq) à température ambiante.

Après 4 h de réaction, l'acétate d'éthyle est ajoutée (10 mL), et lavée par une solution aqueuse saturée en NaCl (3 x 50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée. Le résidu est alors repris dans le DMF (3 mL). Après ajout de NaN₃ (100 mg, 1,5 mmol, 5 éq), le milieu réactionnel est acidifié à pH = 3,5 par une solution d'acide chlorhydrique molaire. Après une nuit de réaction, le milieu réactionnel est dilué dans l'eau (40 mL), et les composés organiques extraits par l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL), qui est ensuite lavée par l'eau (50 mL) puis l'eau saturée en chlorure de sodium (50 mL). Après séchage sur MgSO₄ puis concentration sous vide de la phase organique, le produit est obtenu pur par reprise dans l'éther avec un rendement de 96 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₈H₁₅N₅O₄S

Masse molaire : 397 g.mol⁻¹

Aspect : poudre jaune

R_f (AcOEt 8 / Cyclo 2) : 0,46

Pureté CLHP : 98 %

❖ Analyses :

RMN ¹H (DMSO - d₆) : δ (ppm) :

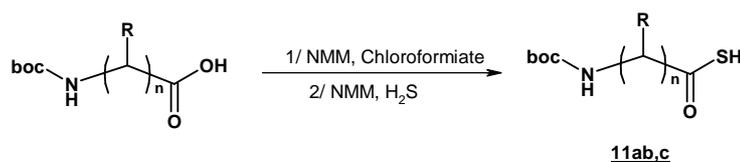
7,90 (d, 2H, H_{9,10}, J = 8,6 Hz) ; 7,50 (d, 2H, H_{8,11}, J = 8,6 Hz) ; 7,43 – 7,39 (m, 3H, H_{4,5,6}) ; 7,30 – 7,27 (m, 2H, H_{3,7}) ; 6,79 (s, 1H, H₂) ; 5,31 (s, 2H, H₁) ; 3,26 (s, 3H, H₁₂)

MH⁺ = 398 g.mol⁻¹

RMN ¹³C (DMSO - d₆) : δ (ppm) :

46,87 ; 66,68 ; 112,48 ; 128,84 ; 131,62 ; 132,15 ; 132,39 ; 132,50 ; 132,73 ; 143,04 ; 146,56 ; 147,75 ; 151,42

Synthèse acides aminés thiocarboxyliques 11a,b,c



❖ Protocole expérimental :

A une solution d'acide aminé protégé par une fonction BOC en N-terminal (3 mmol, 1 éq) solubilisé dans le DCM (5 mL) est ajouté la N-méthylmorpholine (0,72 mL, 6,6 mmol, 2,2 éq) puis le chloroformate d'éthyle (0,31 mL, 3,3 mmol, 1,1 éq). Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, un bullage de H₂S est lancé. Après 5 minutes, la N-méthylmorpholine (0,72 mL, 6,6 mmol, 2,2 éq) est ajoutée, en maintenant le bullage de H₂S. Après 10 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est concentré, le résidu repris dans l'acétate d'éthyle (10 mL) et lavé par une solution de HCl molaire (10 mL). Après séchage sur MgSO₄, la phase organique est concentrée. Le produit est conservé tel quel pour la suite des réactions.

<i>Composé</i>	<i>R</i>	<i>n</i>	<i>Nom</i>	<i>Rendement</i>
11a	H	1	BOC-glycine acide thiocarboxylique	85 %
11b	CH ₃	1	BOC-alanine acide thiocarboxylique	99 %
11c	H	2	BOC-β-alanine acide thiocarboxylique	98 %

❖ Réactifs :

<i>Composé</i>	<i>Réactant</i>	<i>Masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>Masse (g)</i>
11a	BOC-glycine	175	0,525
11b	BOC-alanine	189	0,567
11c	BOC-β-alanine	189	0,567

❖ Caractéristiques :

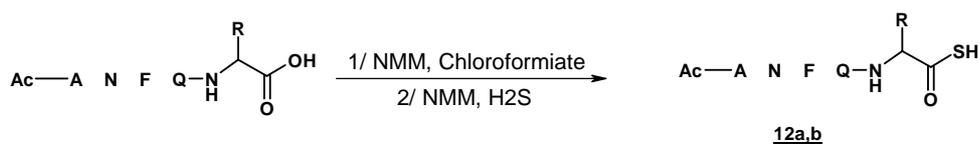
<i>Composé</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>Aspect</i>
11a	C ₇ H ₁₃ NO ₃ S	191	Huile jaune
11b	C ₈ H ₁₅ NO ₃ S	205	Huile jaune
11c	C ₈ H ₁₅ NO ₃ S	205	Huile jaune

❖ Analyses :

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>% tampon B</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
11a	37	192	222	98 %
11b	44	206	223	99 %
11c	50,6	206	223	96 %

Synthèses des peptides thioacides carboxyliques 12a,b



❖ Protocole expérimental :

A une solution de peptide acétylé en N-terminal (0,05 mmol, 1 éq) solubilisé dans un mélange de DMF (15 mL) et d'ACN (5 mL) est ajoutée la N-méthylmorpholine (16,5 µL, 0,15 mmol, 3 éq) puis le chloroformiate d'éthyle (9,5 µL, 0,1 mmol, 2 éq) à -45°C. Après 10 minutes d'agitation, un bullage de H₂S est lancé et le milieu est laissé remonter à température ambiante. Après 5 minutes, la N-méthylmorpholine (16,5 µL, 0,15 mmol, 3 éq) est ajoutée, en maintenant le bullage de H₂S. Après 10 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est concentré. Le produit est utilisé tel quel immédiatement pour la suite des réactions.

Composé	R	Nom	Rendement
12a	H	Ac-ANFQG thioacide carboxylique	n/a
12b	CH ₃	Ac-ANFQA thioacide carboxylique	n/a

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (mg)
12a	Ac-ANFQG-OH	577	28,8
12b	Ac-ANFQA-OH	591	29,5

❖ Caractéristiques :

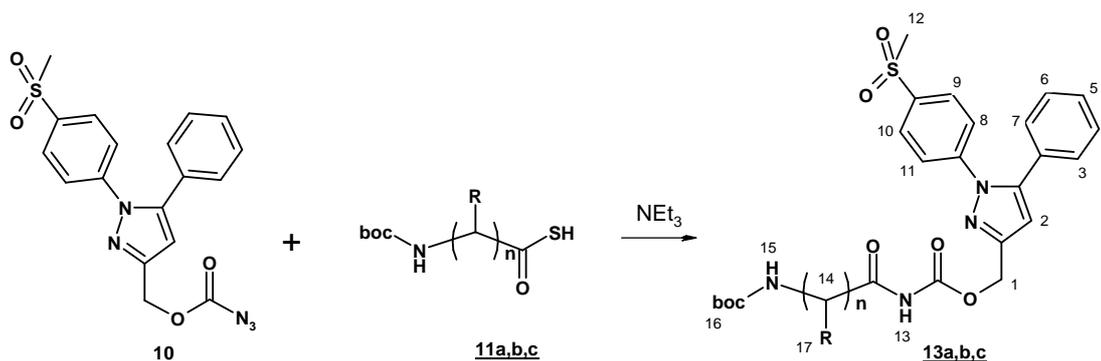
Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect
12a	C ₂₅ H ₃₅ N ₇ O ₈ S	593	Huile jaune
12b	C ₂₆ H ₃₇ N ₇ O ₈ S	607	Huile jaune

❖ Analyses :

LC/MS :

Composé	% tampon B	MH ⁺ (g.mol ⁻¹)	Pureté (%)	λ _{max} (nm)
12a	29,3	594,6	89	215
12b	33,3	607,7	92	215

Synthèse des acides aminés couplés à un diarylpyrazole **13a,b,c**



❖ Protocole expérimental :

L'acide thiocarboxylique (0,25 mmol, 2 éq) est ajouté à une solution d'azidoformiate **10** (50 mg, 0,125 mmol, 1éq) solubilisé dans le DMF (9 mL). Après ajout de triéthylamine (26,5 µL, 0,19 mmol, 1,5 éq), le milieu est laissé à réagir à température ambiante pendant 2h30.

Le milieu réactionnel est alors versé dans l'eau (80 mL), et les composés organiques extraits par l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). La phase organique est lavée par l'eau (50 mL), l'eau saturée en sel (50 mL), puis séchée sur MgSO₄ et concentrée. Le résidu ainsi obtenu est purifié par chromatographie préparative.

Composé	R	n	Nom	Rendement
13a	H	1	Ester {2-[1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthoxycarbonylamino]-2-oxo-éthyl} tert-butylque	65 %
13b	CH ₃	1	Ester {2-[1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthoxycarbonylamino]-1-méthyl-2-oxo-éthyl} tert-butylque	86 %
13c	H	2	Ester {2-[1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthoxycarbonylamino]-3-oxo-propyl} tert-butylque	84 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (mg)
13a	BOC-glycine acide thiocarboxylique	191	47,7
13b	BOC-alanine acide thiocarboxylique	205	51,2
13c	BOC- β-alanine acide thiocarboxylique	205	51,2

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect
13a	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₇ S	528	Poudre blanche
13b	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₇ S	542	Poudre blanche
13c	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₇ S	542	Poudre blanche

❖ Analyses :

RMN¹H :

Composé	Solvant	δ (ppm)
13a	CDCl ₃	7,83 – 7,78 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,6 Hz) ; 7,67 (s, 1H, H ₁₃) ; 7,42 – 7,38 (d, 2H, H _{8,11} , J = 8,6 Hz) ; 7,31 – 7,23 (m, 3H, H _{4,5,6}) ; 7,16 – 7,12 (m, 2H, H _{3,7}) ; 6,51 (s, 1H, H ₂) ; 5,21 (s, 2H, H ₁) ; 5,07 (s, 1H, H ₁₅) ; 4,26 (d, 2H, H ₁₄ , J = 5,4 Hz) ; 2,96 (s, 3H, H ₁₂) ; 1,36 (s, 9H, H ₁₆)
13b	CDCl ₃	8,24 (s, 1H, H ₁₃) ; 7,85 – 7,80 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,6 Hz) ; 7,44 – 7,40 (d, 2H, H _{8,11} , J = 8,6 Hz) ; 7,33 – 7,26 (m, 3H, H _{4,5,6}) ; 7,19 – 7,14 (m, 2H, H _{3,7}) ; 6,56 (s, 1H, H ₂) ; 5,24 (s, 2H, H ₁) ; 4,97 (s, 1H, H ₁₅) ; 4,60 (qt, 1H, H ₁₄ , J = 6,7 Hz) ; 2,98 (s, 3H, H ₁₂) ; 1,37 (s, 9H, H ₁₆) ; 1,36 (d, 3H, H ₁₇ , J = 7,0 Hz)
13c	CDCl ₃	7,93 – 7,89 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,6 Hz) ; 7,58 (s, 1H, H ₁₃) ; 7,52 – 7,49 (d, 2H, H _{8,11} , J = 8,6 Hz) ; 7,42 – 7,36 (m, 3H, H _{4,5,6}) ; 7,27 – 7,2 (m, 2H, H _{3,7}) ; 6,61

	(s, 1H, H ₂) ; 5,30 (s, 2H, H ₁) ; 5,11 (s, 1H, H ₁₅) ; 3,46 (q, 2H, H ₁₄ , J = 5,8 Hz) ; 3,07 (s, 3H, H ₁₂) ; 3,00 (t, 2H, H _{14'} , J = 5,8 Hz) ; 1,44 (s, 9H, H ₁₇)
--	--

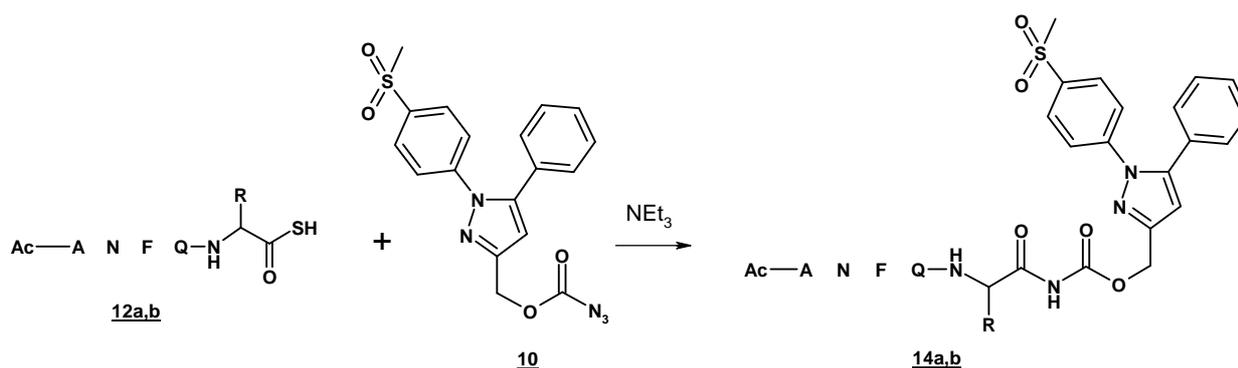
RMN ¹³C :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	<i>δ (ppm)</i>
<u>13a</u>	CDCl ₃	30,04 ; 46,27 ; 47,08 ; 63,34 ; 110,10 ; 127,00 ; 130,19 ; 130,55 ; 130,74 ; 130,98 ; 131,15 ; 140,79 ; 145,58 ; 146,71 ; 150,25 ; 157,716
<u>13b</u>	CDCl ₃	17,41 ; 28,22 ; 44,48 ; 61,31 ; 109,29 ; 125,19 ; 127,51 ; 128,38 ; 128,75 ; 128,92 ; 129,14 ; 129,44 ; 138,93 ; 143,83 ; 144,84 ; 148,71 ; 150,63
<u>13c</u>	CDCl ₃	28,36 ; 36,90 ; 44,50 ; 61,37 ; 109,16 ; 125,19 ; 128,41 ; 128,76 ; 128,97 ; 129,21 ; 139,01 ; 143,83 ; 144,91

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>% tampon B</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>13a</u>	64,3	529	262	96 %
<u>13b</u>	64,8	543	262	100 %
<u>13c</u>	65,5	543	262	96 %

Couplage diarylpyrazole et peptide 14a,b



❖ Protocole expérimental :

A une solution de peptide thioacide carboxylique (0,05 mmol, 1 éq) solubilisé dans le DMF (9 mL) est ajouté l'azidoformiate (20 mg, 0,05 mmol, 1 éq) solubilisé dans du DMF (1 mL). Après ajout de triéthylamine (22 µL, 0,15 mmol, 3 éq), le milieu est laissé à réagir à température ambiante pendant 2 heures. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie préparative sur colonne C18 puis C4. Après lyophilisation, le produit est obtenu pur.

Composé	R	Nom	Rendement
14a	H	Ac-ANFQG-N-(C=O)-DAP	41 %
14b	CH ₃	Ac-ANFQA-N-(C=O)-DAP	32 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (mg)
14a	Ac-ANFQG-SH	593	29,5
14b	Ac-ANFQA-SH	607	30,3

❖ Caractéristiques :

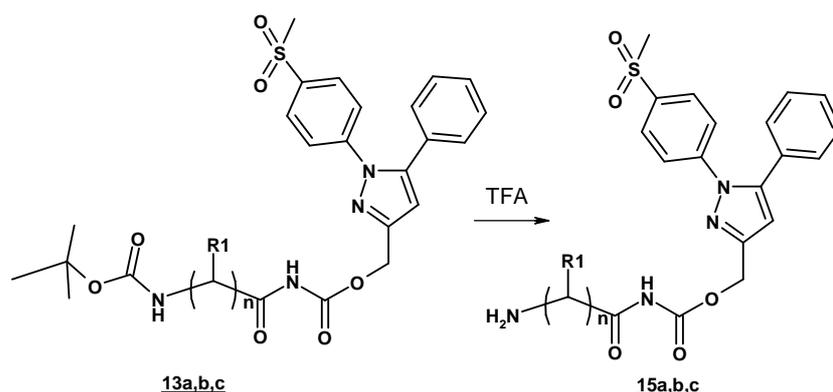
Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect
14a	C ₄₄ H ₅₂ N ₁₀ O ₁₂ S	944	Poudre blanche
14b	C ₄₅ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₂ S	958	Poudre blanche

❖ Analyses :

LC/MS :

Composé	% tampon B	MH ⁺ (g.mol ⁻¹)	Pureté	λ _{max} (nm)
14a	47,6	945	99 %	263
14b	53,6	959	99 %	262

Acide aminé lié à un diarylpyrazole 15a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'acide aminé lié à un diarylpyrazole protégé par un boc (0,1 mmol) est solubilisé dans un mélange de DMF (2 mL) et d'acide trifluoroacétique (2 mL). Après 30 min d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans de l'eau acide (30 mL), qui est lavée par de l'acétate d'éthyle (2 x 20 mL). Après lyophilisation de la phase aqueuse, le produit déprotégé est obtenu pur et est très hygroscopique.

Composé	R	n	Nom	Rendement
15a	H	1	1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthylate de 2-aminoacétyle	95 %
15b	CH ₃	1	1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthylate de 2-aminopropionyle	97%
15c	H	2	1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthylate de 3-aminopropionyle	92 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (mg)
15a	2-[1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthoxycarbonylamino]-2-oxo-éthylate de tert-butyle	528	52,8
15b	2-[1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthoxycarbonylamino]-1-méthyl-2-oxo-éthylate de tert-butyle	542	54,2
15c	3-[1-(4-méthylsulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazol-3-ylméthoxycarbonylamino]-3-oxo-propylate de tert-butyle	542	54,2

❖ Caractéristiques :

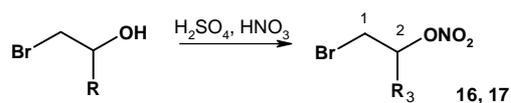
Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect
15a	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₅ S	428	Poudre jaune
15b	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₅ S	442	Poudre jaune
15c	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₅ S	442	Poudre jaune

❖ Analyses :

LC/MS :

Composé	% tampon B	MH ⁺ (g.mol ⁻¹)	λ _{max} (nm)
15a	45,9	429	261,1
15b	46,4	443	261,2
15c	46,4	443	261,1

Synthèse des bromonitrooxyalcanes 16, 17



❖ Protocole expérimental :

L'alcool β bromé (8 mmol, 1 éq) est versé goutte à goutte dans un mélange H_2SO_4 90 % (3 mL) / HNO_3 70 % (1,5 mL) préalablement refroidi à 0 °C. Après 2 h de réaction à cette température, le milieu réactionnel est repris par l'eau (100 mL).

Le produit est extrait par le dichlorométhane (3 x 50 mL), qui est ensuite séché sur CaCl_2 avant concentration. Le produit est utilisé dans les réactions suivantes sans purification préalable.

Composé	R	Nom
<u>16</u>	H	1-bromo-2-nitrooxyéthane
<u>17</u>	CH_3	1-bromo-2-nitrooxypropane

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Masse (g)
<u>16</u>	2-bromoéthanol	125	1
<u>17</u>	1-bromopropan-2-ol	139	1,11

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Aspect
<u>16</u>	$\text{C}_2\text{H}_4\text{BrNO}_3$	170	Huile jaune
<u>17</u>	$\text{C}_3\text{H}_6\text{BrNO}_3$	184	Huile jaune

❖ Analyses :

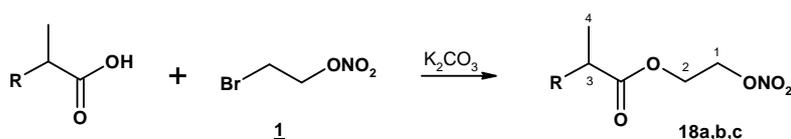
IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
<u>16</u>	1635 – 1279	ester nitrique
<u>17</u>	1632 - 1278	ester nitrique

RMN ^1H :

Composé	Solvant	δ (ppm)
<u>16</u>	CDCl_3	4,76 (t, 2H, H_2 , $J = 6,4$ Hz) ; 3,56 (t, 2H, H_1 , $J = 6,4$ Hz)
<u>17</u>	CDCl_3	5,25 (m, 1H, H_2), 3,48 (d, 2H, H_1 , $J = 4,4$ Hz), 1,48 (d, 3H, H_3 , $J = 6,0$ Hz)

Synthèse des esters nitrooxyéthyles de profènes 18a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'acide carboxylique (1,15 mmol, 1,1 éq) est solubilisé dans le diméthylformamide (15 mL), en présence de K_2CO_3 (0,32 g, 2,3 mmol, 2,2 éq). Après 15 min d'agitation à température ambiante, le 1-bromo-2-nitrooxyéthane (0,18 g, 1,05 mmol, 1 éq) est ajouté.

Après 20 h, le milieu réactionnel est dilué dans l'eau (100 mL). La phase organique est extraite par l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL), lavée par l'eau (100 mL) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl (100 mL). Après séchage sur $MgSO_4$ et concentration, le mélange obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
18a		2-(3-benzoylphényl)propionate de 2-nitrooxyéthyle	(Hept 8 / AcOEt 2)	16 %
18b		2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate de 2-nitrooxyéthyle	(Hept 8 / AcOEt 2)	45 %
18c		2-(6-chloro-9H-carbazol-2-yl)propionate de 2-nitrooxyéthyle	(Hept 65 / AcOEt 35)	47 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Masse (g)
18a	Kétoprofène	254	0,29
18b	Suprofène	260	0,3
18c	Carprofène	273	0,31

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Aspect	R _f
18a	$C_{18}H_{17}NO_6$	343	Huile jaune	(Cyclo 5 / AcOEt 5) 0,64
18b	$C_{16}H_{15}NO_6S$	349	Huile jaune	(Cyclo 5 / AcOEt 5) 0,64
18c	$C_{17}H_{15}ClN_2O_5$	362	Poudre blanche	(Cyclo 5 / AcOEt 5) 0,55

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
18a	1740	CO ester
	1636 et 1281	Ester nitrique
18b	1738	CO ester
	1633 et 1280	Ester nitrique
18c	1733	CO ester
	1639 et 1284	Ester nitrique

RMN ¹H :

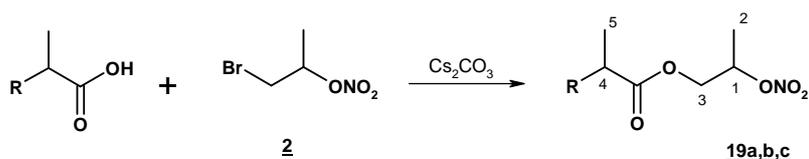
Composé	Solvant	δ (ppm)
18a	$CDCl_3$	7,85 – 7,46 (m, 9H, H_{arom}) ; 4,65 (t, 2H, H_1 , J = 4,3 Hz) ; 4,39 (t, 2H, H_2 , J = 4,6 Hz) ; 3,85 (q, 1H, H_3 , J = 7,3 Hz) ; 1,55 (d, 1H, H_4 , J = 7,0 Hz)
18b	$CDCl_3$	7,75 (d, 2H, $H_{5,8}$, J = 8,2 Hz) ; 7,68 (d, 1H, H_9 , J = 5,0 Hz) ; 7,66 (d, 1H, H_{11} , J = 5,0 Hz) ; 7,44 (d, 2H, $H_{6,7}$, J = 8,2 Hz) ; 7,17 (s, 1H, H_{10}) ; 4,66 (t, 2H, H_1 ,

<u>18c</u>	CDCl ₃	J = 4,3 Hz) ; 4,40 (t, 2H, H ₂ , J = 4,3 Hz) ; 3,85 (q, 1H, H ₃ , J = 7,0 Hz) ; 1,61 (d, 3H, H ₄ , J = 7,0 Hz) 8,08 (sl, 1H, H ₁₁) ; 8,00 (m, 2H, H _{arom}) ; 7,39 – 7,17 (m, 4H, H _{arom}) ; 4,64 (m, 2H, H ₁) ; 4,39 (m, 2H, H ₂) ; 3,95 (q, 1H, H ₃ , J = 7,5 Hz) ; 1,59 (d, 3H, H ₄ , J = 7,5 Hz)
-------------------	-------------------	--

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>18a</u>	4,07	344	250	98 %
<u>18b</u>	3,97	350	255	97 %
<u>18c</u>	4,31	391	255	97 %

Synthèse des esters 2-nitrooxypropyliques de profènes 19a,b,c



❖ Protocole expérimental :

Le profène (1,5 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le diméthylformamide (20 mL) en présence de Cs₂CO₃ (0,98 g, 3 mmol, 2 éq). Après 15 min d'agitation à température ambiante, le 1-bromo-2-nitrooxypropane (0,41 g, 2,25 mmol, 1,5 éq) est ajouté.

Après 6 h de réaction, le milieu réactionnel est versé dans l'eau (100 mL), puis extrait par l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). La phase organique est alors lavée par l'eau saturée en NaCl (50 mL), séchée sur MgSO₄ puis concentrée. L'huile ainsi obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
19a		2-(3-benzoylphényl)propionate de 2-nitrooxypropyle	(Hept 75 / AcOEt 25)	54 %
19b		2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate de 2-nitrooxypropyle	(Hept 75 / AcOEt 25)	50 %
19c		2-(6-chloro-9H-carbazol-2-yl)propionate de 2-nitrooxypropyle	(Hept 75 / AcOEt 25)	34 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)
19a	Kétoprofène	254	0,38
19b	Suprofène	260	0,39
19c	Carprofène	273	0,41

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect	R _f
19a	C ₁₉ H ₁₉ NO ₆	357	Huile jaune	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,73
19b	C ₁₇ H ₁₇ NO ₆ S	363	Huile jaune	(Hept 75 / AcOEt 25) 0,57
19c	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₂ O ₅	376,5	Huile jaune	(Hept 75 / AcOEt 25) 0, 56

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm ⁻¹)	Fonctions
19a	1731 1630 - 1275	CO ester Ester nitrique
19b	1740 1630 - 1278	CO ester Ester nitrique
19c	1740 1631 - 1279	CO ester Ester nitrique

RMN ¹H :

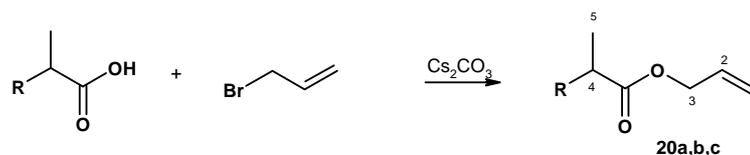
Composé	Solvant	δ (ppm)
19a	CDCl ₃	7,83 – 7,42 (m, 9H, H _{arom}) ; 5,29 (m, 1H, H ₁) ; 4,20 (m, 2H, H ₃) ; 3,86 (q, 1H, H ₄ , J = 7,3 Hz) ; 1,56 (d, 3H, H ₅ , J = 7,3 Hz) ; 1,31 (d, 3H, H ₂ , J = 6,4 Hz)
19b	CDCl ₃	7,87 (d, 2H, H _{6,7} , J = 8,2 Hz) ; 7,75 (d, 1H, H ₁₀ , J = 5,0 Hz) ; 7,67 (d, 1H, H ₁₂ , J = 5,0 Hz) ; 7,43 (d, 2H, H _{8,9} , J = 8,2 Hz) ; 7,18 (t, 1H, H ₁₁ , J = 5,0 Hz) ; 5,31

<u>19c</u>	CDCl ₃	(m, 1H, H ₁) ; 4,33 (m, 2H, H ₃) ; 3,86 (q, 1H, H ₄ , J = 7,0 Hz) ; 1,58 (d, 3H, H ₅ , J = 7,0 Hz) ; 1,32 (d, 3H, H ₂ , J = 6,5 Hz) 8,08 (sl, 1H, H ₁₂) ; 7,97 (d, 2H, H _{10,11} , J = 7,9 Hz) ; 7,37 (sl, 3H, H _{7,8,9}) ; 7,18 (d, 1H, H ₆ , J = 7,8 Hz) ; 5,30 (m, 1H, H ₁) ; 4,34 (m, 2H, H ₃) ; 4,16 (q, 1H, H ₄ , J = 7,0 Hz) ; 1,61 (d, 3H, H ₅ , J = 7,0 Hz) ; 1,28 (d, 3H, H ₂ , J = 6,4 Hz)
-------------------	-------------------	--

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>19a</u>	4,22	358	250	99 %
<u>19b</u>	4,10	364	255	99 %
<u>19c</u>	4,43	377	245	96 %

Synthèse des esters allyliques 20a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'acide carboxylique (2 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le diméthylformamide (20 mL) en présence de Cs_2CO_3 (1,3 g, 4 mmol, 2 éq). Après 30 min d'agitation à température ambiante, le bromure d'allyle (2,66 g, 2,2 mmol, 1,1 éq) est ajouté au milieu réactionnel.

Après 16 h à température ambiante, le milieu réactionnel est versé dans l'eau (100 mL) et extrait par l'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase organique est lavée par l'eau saturée en NaCl (100 mL) puis séchée sur MgSO_4 .

Les produits bruts ainsi obtenus sont purifiés par chromatographie sur gel de silice.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
20a		2-(3-benzoylphényl)propionate d'allyle	(Hept 9 / AcOEt 1)	50 %
20b		2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate d'allyle	(Hept 85 / AcOEt 15)	43 %
20c		2-(6-chloro-9H-carbazol-2-yl)propionate d'allyle	(Hept 8 / AcOEt 2)	62 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactants	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Masse (g)
20a	Kétoprofène	254	0,5
20b	Suprofène	260	0,52
20c	Carprofène	273	0,55

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Aspect	R _f
20a	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$	294	Huile orange	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,69
20b	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{S}$	300	Huile incolore	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,74
20c	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$	313,5	Huile incolore	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,72

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
20a	1733 1659	CO ester CO cétone
20b	1733 1635	CO ester CO cétone
20c	1719	CO ester

RMN ^1H :

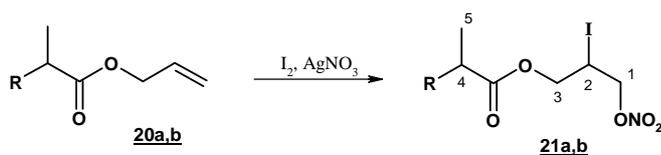
Composé	Solvant	δ (ppm)
20a	CDCl_3	7,80 – 7,44 (m, 9H, H_{arom}) ; 5,90 (m, 1H, H_2) ; 5,25 (t, 2H, H_1 , $J = 5,1$ Hz) ; 4,59 (d, 2H, H_3 , $J = 5,1$ Hz) ; 3,86 (q, 1H, H_4 , $J = 7,3$ Hz) ; 1,58 (d, 3H, H_5 , $J = 7,3$ Hz)
20b	CDCl_3	7,87 (d, 2H, $\text{H}_{6,7}$, $J = 8,2$ Hz) ; 7,75 (d, 1H, H_{10} , $J = 5,0$ Hz) ; 7,66 (d, 1H, H_{12} ,

<u>20c</u>	CDCl ₃	<p>J = 5,0 Hz) : 7,46 (d, 2H, H_{8,9}, J = 8,2 Hz) ; 7,17 (s, 1H, H₁₁) ; 5,91 (m, 1H, H₂) ; 5,22 (m, 2H, H₁) ; 4,61 (d, 2H, H₃, J = 5,6 Hz) ; 3,87 (q, 1H, H₄, J = 7,3 Hz) ; 1,58 (d, 3H, H₅, J = 7,3 Hz)</p> <p>8,11 (sl, 1H, H₁₂) ; 7,97 (m, 2H, H_{arom}) ; 7,40 - 7,20 (m, 4H, H_{arom}) ; 5,89 (m, 1H, H₂) ; 5,20 (m, 2H, H₁) ; 4,61 (sl, 2H, H₃) ; 3,94 (q, 1H, H₄, J = 7,3 Hz) ; 1,61 (d, 3H, H₅, J = 7,3 Hz)</p>
-------------------	-------------------	--

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>20a</u>	4,22	295	250	89 %
<u>20b</u>	4,10	301	255	92 %
<u>20c</u>	4,47	314	255	88 %

Synthèse des esters 2-iodo-3-nitrooxypropyliques **21a,b**



❖ Protocole expérimental :

A une suspension de AgNO_3 (0,187 g, 1,1 mmol, 1,1 éq) dans l'acétonitrile (20 mL) à 0 °C est ajouté l'ester allylique (1 mmol, 1 éq). Une solution de I_2 (0,254 g, 1 mmol, 1 éq) dans l'acétonitrile (25 mL) est alors ajoutée goutte à goutte. Après 1 h à 0 °C, le milieu réactionnel est amené en 1 h à température ambiante, puis laissé 2 h sous agitation.

Le milieu réactionnel est alors filtré sur célite, concentré, puis repris dans l'acétate d'éthyle (50 mL). Cette phase organique est lavée par l'eau (25 mL) puis par l'eau saturée en NaCl (25 mL) et séchée sur MgSO_4 .

Les produits bruts obtenus par évaporation du solvant sont purifiés par chromatographie sur gel de silice.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
21a		2-(3-benzoylphényl)propionate de 2-iodo-3-nitrooxypropyle	(Hept 85 / AcOEt 15)	50 %
21b		2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate de 2-iodo-3-nitrooxypropyle	(Hept 8 / AcOEt 2)	50 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol^{-1})	Masse (g)
21a	2-(3-benzoylphényl)propionate d'allyle	294	0,294
21b	2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate d'allyle	300	0,3

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol^{-1})	Aspect	Rf
21a	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{INO}_6$	483	Huile jaune	(Hept 8 / AcOEt 2) 0,33
21b	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{INO}_6\text{S}$	489	Huile jaune	(Hept 7 / AcOEt 3) 0,43

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
21a	1738 1642 – 1278 847	CO ester Ester nitrique C-I iode
21b	1740 1636 – 1278 845	CO ester Ester nitrique C-I iode

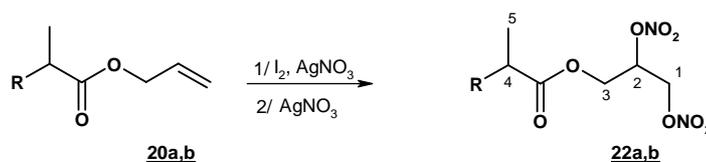
RMN ^1H :

Composé	Solvant	δ (ppm)
21a	CDCl_3	7,83 – 7,47 (m, 9H, H_{arom}) ; 4,71 – 4,28 (m, 4H, $\text{H}_{1,3}$) ; 3,87 (q, 1H, H_4 , $J = 7,3$ Hz) ; 3,21 (d, 1H, H_2 , $J = 6,9$ Hz) ; 1,59 (d, 3H, H_5 , $J = 7,3$ Hz)
21b	CDCl_3	7,87 (d, 2H, $\text{H}_{6,7}$, $J = 7,9$ Hz) ; 7,75 (d, 1H, H_{10} , $J = 5,0$ Hz) ; 7,67 (d, 1H, H_{12} , $J = 5,0$ Hz) ; 7,44 (d, 2H, $\text{H}_{8,9}$, $J = 7,9$ Hz) ; 7,19 (t, 1H, H_{11} , $J = 7,9$ Hz) ; 4,75 – 4,30 (m, 4H, $\text{H}_{1,3}$) ; 3,89 (q, 1H, H_4 , $J = 7,0$ Hz) ; 3,21 (m, 1H, H_2) ; 1,60 (d, 3H, H_5 , $J = 7,0$ Hz)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>21a</u>	4,45	484	250	98 %
<u>21b</u>	4,36	490	265	85 %

Synthèse des esters dinitrooxypropyliques des profènes 22a,b



❖ Protocole expérimental :

A une suspension de AgNO_3 (0,68 g, 4 mmol, 2 équ) dans l'acétonitrile (20 mL) à 0 °C est ajouté l'ester allylique (2 mmol, 1 équ). Une solution de I_2 (0,51 g, 2 mmol, 1 équ) dans l'acétonitrile (20 mL) est alors ajoutée goutte à goutte. Après 1 h à 0 °C, le milieu réactionnel est amené en 1 h à température ambiante. Après une nouvelle addition de AgNO_3 (1,36 g, 8 mmol, 4 équ), le milieu est porté à reflux.

Après 20 h à reflux, le milieu réactionnel est filtré sur célite, concentré, puis repris dans l'acétate d'éthyle (50 mL). Cette phase organique est alors lavée par l'eau (25 mL), par l'eau saturée en NaCl (25 mL) et séchée sur MgSO_4 .

Les produits bruts obtenus par évaporation du solvant sont purifiés par chromatographie sur gel de silice.

<i>Composé</i>	<i>R</i>	<i>Nom</i>	<i>Purification</i>	<i>Rendement</i>
22a		2-(3-benzoylphényl)propionate de 2,3-dinitrooxypropyle	(Hept 75 / AcOEt 25)	18 %
22b		2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate de 2,3-dinitrooxypropyle	(Hept 75 / AcOEt 25)	16 %

❖ Réactifs :

<i>Composé</i>	<i>Réactant</i>	<i>Masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>Masse (g)</i>
22a	2-(3-benzoylphényl)propionate d'allyle	294	0,59
22b	2-[4-thiophène-2-carbonyl]phényl]propionate d'allyle	300	0,60

❖ Caractéristiques :

<i>Composé</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse molaire (g.mol⁻¹)</i>	<i>Aspect</i>	<i>R_f</i>
22a	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9$	418	Huile jaune	(Hept 7 / AcOEt 3) 0,13
22b	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$	424	Huile jaune	(Hept 75 / AcOEt 25) 0,23

❖ Analyses :

IR :

<i>Composé</i>	<i>ν (cm⁻¹)</i>	<i>Fonctions</i>
22a	1742 1647 - 1271	CO ester ester nitrique
22b	1742 1640 - 1272	CO ester ester nitrique

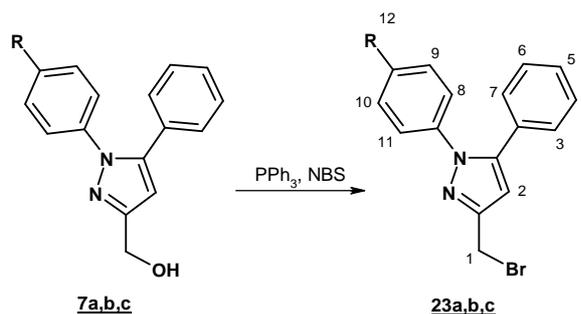
RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	<i>δ (ppm)</i>
22a	CDCl_3	7,83 – 7,44 (m, 9H, H_{arom}) ; 5,42 (m, 1H, H_2) ; 4,68 – 4,25 (m, 4H, $\text{H}_{1,3}$) ; 3,86 (q, 1H, H_4 , $J = 7,3$ Hz) ; 1,57 (d, 2H, H_5 , $J = 7,3$ Hz)
22b	CDCl_3	7,87 (d, 2H, $\text{H}_{6,7}$, $J = 8,2$ Hz) ; 7,76 (d, 1H, H_{10} , $J = 5,0$ Hz) ; 7,67 (d, 1H, H_{12} , $J = 3,8$ Hz) ; 7,43 (d, 2H, $\text{H}_{8,9}$, $J = 8,2$ Hz) ; 7,19 (t, 1H, H_{11} , $J = 4,9$ Hz) ; 5,43 (m, 1H, H_2) ; 4,70 – 4,25 (m, 4H, $\text{H}_{1,3}$) ; 3,89 (q, 1H, H_4 , $J = 7,0$ Hz) ; 1,59 (d, 3H, H_5 , $J = 7,0$ Hz)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>22a</u>	4,40	419	250	96 %
<u>22b</u>	4,24	425	255	97 %

Synthèse des 3-bromométhyl-1-aryl-5-phényl-1H-pyrazoles **23a,b,c**



❖ Protocole expérimental :

A une solution d'hydroxyméthyl-diarylpirazole (2,8 mmol, 1 éq) et de triphénylphosphine (1,84 g, 7 mmol, 2,5 éq) dans le dichlorométhane anhydre (50 mL) à 0 °C est ajouté le *N*-bromosuccinimide (5,6 mmol, 1 g, 2 éq). Le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante.

Après 4 h de réaction, le milieu est concentré à sec. Le résidu est repris par l'acétate d'éthyle (75 mL), lavé par l'eau (75 mL) puis par une solution aqueuse saturée en NaCl (75 mL), séché sur MgSO₄ puis concentré. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
23a	H	3-bromométhyl-1,5-diphényl-1H-pyrazole	(Cyclo 8 / AcOEt 2)	68 %
23b	SO ₂ CH ₃	3-bromométhyl-1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole	(Cyclo 5 / AcOEt 5)	85 %
23c	SO ₂ NH ₂	3-bromométhyl-1-(4-aminosulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole	(Cyclo 7 / AcOEt 3)	59 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)
23a	1,5-(diphényl)-3-hydroxyméthyl-1H-pyrazole	250	0,70
23b	1-(4-méthanesulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1H-pyrazole	328	0,92
23c	1-(4-aminosulfonylphényl)-3-hydroxyméthyl-5-phényl-1H-pyrazole	329	0,92

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect	R _f	Fusion (°C)
23a	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₂	313	Huile jaune	(Cyclo 8 / AcOEt 2) 0,41	-
23b	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₂ O ₂ S	391	Solide blanc	(Hept 4 / AcOEt 6) 0,3	158 – 159
23c	C ₁₆ H ₁₄ BrN ₃ O ₂	392	Huile jaune	(Hept 3 / AcOEt 7) 0,69	-

❖ Analyses :

IR :		
Composé	ν (cm ⁻¹)	Fonctions
23a	2956	CH aromatique
23b	3003	CH aromatique
23c	3297	amine primaire
23c	3094	CH aromatique

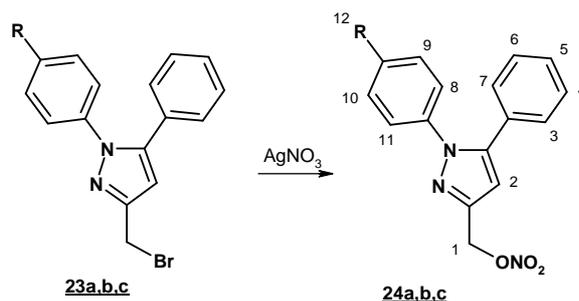
RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	δ (ppm)
23a	CDCl ₃	7,25 – 7,22 (m, 10H, H _{arom}) ; 6,61 (s, 1H, H ₂) ; 4,62 (s, 2H, H ₁)
23b	CDCl ₃	7,90 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,6 Hz) ; 7,50 (d, 2H, H _{8,11} , J = 8,6 Hz) ; 7,42 – 7,34 (m, 3H, H ₄₋₆) ; 7,27 – 7,23 (m, 2H, H _{3,7}) ; 6,62 (s, 1H, H ₂) ; 4,57 (s, 2H, H ₁) ; 3,06 (s, 3H, H ₁₂)
23c	DMSO – d ₆	7,84 – 7,81 (m, 2H, H ₁₂) ; 7,73 – 7,16 (m, 9H, H _{arom}) ; 6,79 (s, 1H, H ₂) ; 4,82 (s, 2H, H ₁)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>M / M+2 (g.mol⁻¹)</i>	λ_{max} (nm)
23a	3,50	392 (50 %) / 394 (50 %)	250

Synthèse des 3-nitrooxyméthyl-1-aryl-5-phényl-1H-pyrazoles 24a,b,c



❖ Protocole expérimental :

Le bromométhyl-diarylpyrazole (1 mmol, 1 éq) est solubilisé dans l'acétonitrile (25 mL) avant addition de AgNO_3 (0,34g, 2 mmol, 2 éq). Le milieu réactionnel est porté à reflux à l'abri de la lumière.

Après 5 h de réaction, le milieu réactionnel est filtré. Le filtrat est évaporé à sec, puis repris dans le dichlorométhane (50 mL) pour donner un précipité.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
24a	H	3-nitrooxyméthyl-1,5-diphényl-1H-pyrazole	Lavage par AcOEt	91 %
24b	SO_2CH_3	3-nitrooxyméthyl-1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole	Lavage par AcOEt	90 %
24c	SO_2NH_2	3-nitrooxyméthyl-1-(4-aminosulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole	Recristallisation dans l'acétone	94 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol^{-1})	Masse (g)
24a	3-bromométhyl-1,5-diphényl-1H-pyrazole	313	0,31
24b	3-bromométhyl-1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole	391	0,39
24c	3-bromométhyl-1-(4-aminosulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole	392	0,39

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol^{-1})	Aspect	Rf	Fusion ($^{\circ}\text{C}$)
24a	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	295	Solide jaune	(Cyclo 6 / AcOEt 4) 0,8	186-187
24b	$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	373	Solide blanc	(Hept 4 / AcOEt 6) 0,24	218-219
24c	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$	374	Solide blanc	(Hept 5 / AcOEt 5) 0,39	> 230

❖ Analyses :

IR :

Composé	ν (cm^{-1})	Fonctions
24a	1632 - 1285	Ester nitrique
24b	1640 - 1280	Ester nitrique
24c	1627 - 1280	Ester nitrique

RMN ^1H :

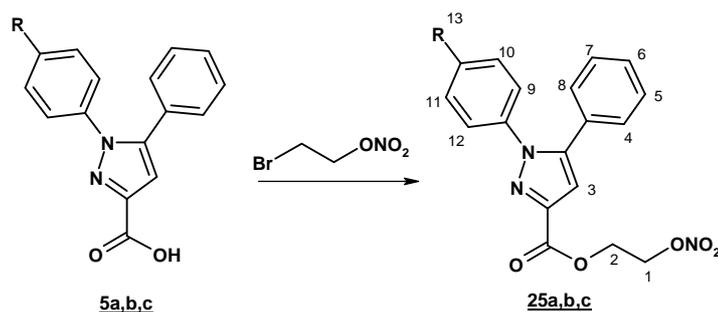
Composé	Solvant	δ (ppm)
24a	$\text{DMSO} - d_6$	7,40 – 7,21 (m, 10H, H_{arom}) ; 6,79 (s, 1H, H_2) ; 5,66 (s, 2H, H_1)

<u>24b</u>	DMSO – <i>d</i> ₆	7,95 (d, 2H, H _{9,10} , J = 7,4 Hz) ; 7,52 (d, 2H, H _{8,11} , J = 7,5 Hz) ; 7,41 (sl, 3H, H ₄₋₆) ; 7,29 (sl, 2H, H _{3,7}) ; 6,85 (s, 1H, H ₂) ; 5,68 (s, 2H, H ₁) ; 3,25 (s, 3H, H ₁₂)
<u>24c</u>	DMSO – <i>d</i> ₆	7,82 (d, 2H, H _{9,10} , J = 8,5 Hz) ; 7,48 – 7,39 (m, 7H, H _{4-6,8,11,12}) ; 7,28 (m, 2H, H _{3,7}) ; 6,84 (s, 1H, H ₂) ; 5,68 (s, 2H, H ₁)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺</i>	<i>Pureté</i>
<u>24a</u>	4,21	296	97 %
<u>24b</u>	3,76	374	99 %
<u>24c</u>	3,52	375	98 %

Synthèse des diaryl-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2-nitrooxyéthyle 25a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'acide carboxylique (0,38 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le DMF (15 mL) et mis en présence de Cs₂CO₃ (0,25 g, 0,76 mmol, 2 éq) 15 minutes avant d'ajouter le 1-bromo-2-nitrooxyéthane (0,1 g, 0,57 mmol, 1,5 éq).

Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est versé dans l'eau (100 mL) et extrait par l'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase organique est ensuite lavée par l'eau (50 mL), par l'eau saturée en NaCl (50 mL) puis séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le produit est purifié par CCE.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
25a	H	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2-nitrooxyéthyle	CCE (Hept 6 / AcOEt 4)	66 %
25b	SO ₂ CH ₃	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2-nitrooxyéthyle	CCE (Hept 3 / AcOEt 7)	85 %
25c	SO ₂ NH ₂	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2-nitrooxyéthyle	CCE (Hept 3 / AcOEt 7)	45 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)
25a	acide 1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	264	0,1
25b	acide 1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	342	0,13
25c	acide 1-(4-aminosulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	343	0,13

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect	R _f
25a	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₅	353	Huile jaune	(Hept 3 / AcOEt 7) 0,79
25b	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₇ S	431	Huile jaune	(Hept 3 / AcOEt 7) 0,53
25c	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₇ S	432	Huile Jaune	(Hept 3 / AcOEt 7) 0,54

❖ Analyses :

IR :

Composé	v (cm ⁻¹)	Fonctions
25a	1719 1278 et 1650	CO ester Ester nitrique
25b	1736 1281 et 1619	CO ester Ester nitrique
25c	1735 1284 et 1621	CO ester Ester nitrique

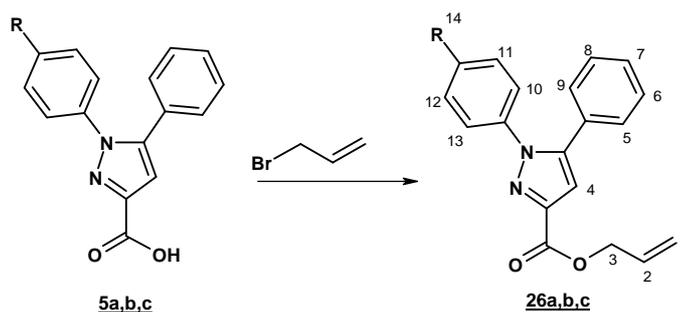
RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	<i>δ (ppm)</i>
<u>25a</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	7,47 – 7,24 (m, 10H, H _{arom}) ; 7,16 (s, 1H, H ₃) ; 4,88 (m, 2H, H ₁) ; 4,63 (m, 2H, H ₂)
<u>25b</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	8,0 (d, 2H, H _{10,11} , J = 6,7 Hz) ; 7,58 (d, 2H, H _{9,10} , J = 6,7 Hz) ; 7,42 (m, 3H, H _{5,6,7}) ; 7,30 (m, 2H, H _{4,8}) ; 7,20 (s, 1H, H ₃) ; 4,88 (m, 2H, H ₁) ; 4,64 (m, 2H, H ₂) ; 3,27 (s, 3H, H ₁₃)
<u>25c</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	7,88 (d, 2H, H _{10,11} , J = 7,2 Hz) ; 7,53 (m, 4H, H _{9,12,13}) ; 7,41 (m, 3H, H _{5,6,7}) ; 7,30 (m, 2H, H _{4,8}) ; 7,18 (s, 1H, H ₃) ; 4,88 (m, 2H, H ₁) ; 4,65 (m, 2H, H ₂)

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>25a</u>	4,28	354	250	98,9 %
<u>25b</u>	3,82	432	250	99 %
<u>25c</u>	3,66	433	250	97 %

Synthèse des diaryl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle 26a,b,c



❖ Protocole expérimental :

L'acide carboxylique (0,38 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le diméthylformamide (20 mL) et mis en présence de Cs₂CO₃ (0,25 g, 0,76 mmol, 2 éq) avant d'ajouter le bromure d'allyle (100 µL, 1,14 mmol, 3 éq).

Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est versé dans l'eau (100 mL) et extrait par l'acétate d'éthyle (2 x 50 mL). La phase organique est ensuite lavée par l'eau (50 mL), par l'eau saturée en NaCl (50 mL) puis séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le produit est purifié ou conservé en vue des prochaines réactions.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
26a	H	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle	-	95 %
26b	SO ₂ CH ₃	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle	-	91 %
26c	SO ₂ NH ₂	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle	CCE (Hept 4 / AcOEt 6)	63 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Masse (g)
26a	acide 1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	264	0,1
26b	acide 1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	342	0,13
26c	acide 1-(4-aminosulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylique	343	0,13

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Aspect	R _f
26a	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₂	304	Huile claire	(Hept 3/ AcOEt 7) 0,83
26b	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	382	Huile jaune	(Hept 3/ AcOEt 7) 0,67
26c	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	383	Huile Jaune	(Hept 3/ AcOEt 7) 0,59

❖ Analyses :

IR :

Composé	v (cm ⁻¹)	Fonctions
26a	1715	CO ester
26b	1714	CO ester
26c	1723	CO ester

RMN ¹H :

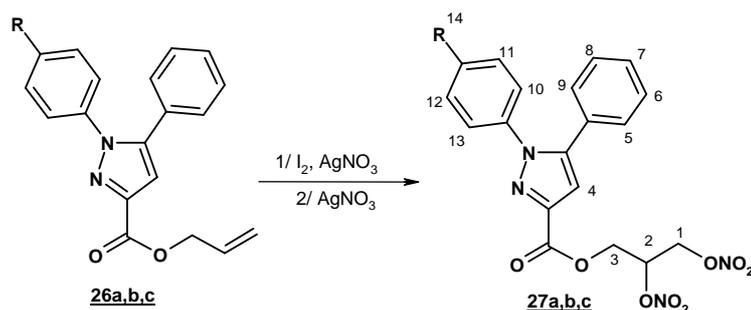
Composé	Solvant	δ (ppm)
26a	DMSO - d ₆	7,42 – 7,24 (m, 10H, H _{arom}) ; 7,16 (s, 1H, H ₄) ; 6,05 (m, 1H, H ₂) ; 5,45 (m, 2H, H ₃) ; 4,82 (d, 2H, H ₁ , J = 5,3 Hz)
26b	DMSO - d ₆	8,00 (d, 2H, H _{11,12} , J = 8,5 Hz) ; 7,61 (d, 2H, H _{10,13} , J = 8,5 Hz) ; 7,42 – 7,37 (m,

<u>26c</u>	DMSO - <i>d</i> ₆	3H, H _{6,7,8}) ; 7,33 – 7,30 (m, 2H, H _{5,9}) ; 7,21 (s, 1H, H ₄) ; 6,10 (m, 1H, H ₂) ; 5,38 (m, 2H, H ₃) ; 4,83 (d, 2H, H ₁ , J = 5,3 Hz) ; 3,28 (s, 3H, H ₁₄) 7,87 (d, 2H, H _{11,12} , J = 8,7 Hz) ; 7,51 (m, 4H, H _{10,13,14}) ; 7,42 – 7,39 (m, 3H, H _{6,7,8}) ; 7,33 – 7,29 (m, 2H, H _{5,9}) ; 7,19 (s, 1H, H ₄) ; 6,08 (m, 1H, H ₂) ; 5,39 (m, 2H, H ₃) ; 4,83 (d, 2H, H ₁ , J = 5,5 Hz)
-------------------	------------------------------	--

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>26a</u>	4,36	305	250	99 %
<u>26b</u>	3,98	383	250	97 %
<u>26c</u>	3,81	384	245	98 %

Synthèse des diaryl-1H-pyrazole-3-carboxylates de dinitrooxypropyle 27a,b,c



❖ Protocole expérimental :

A une suspension de AgNO_3 (0,51 g, 3 mmol, 2 éq) dans l'acétonitrile (30 mL) à 0 °C est ajouté l'ester allylique (1,5 mmol, 1 éq). Une solution de I_2 (0,38 g, 1,5 mmol, 1 éq) dans l'acétonitrile (30 mL) est alors ajoutée goutte à goutte. Après 1 h à 0 °C, le milieu réactionnel est amené en 1 h à température ambiante. Après une nouvelle addition de AgNO_3 (1 g, 6 mmol, 4 éq), le milieu est porté à reflux.

Après 20 h à reflux, le milieu réactionnel est filtré sur célite, concentré, puis repris dans l'acétate d'éthyle (100 mL). Cette phase organique est alors lavée par l'eau (50 mL), par l'eau saturée en NaCl (50 mL) et séchée sur MgSO_4 .

Les produits bruts obtenus par évaporation du solvant sont purifiés par chromatographie sur gel de silice.

Composé	R	Nom	Purification	Rendement
27a	H	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2,3-dinitrooxypropyle	Chromatographie (Hept 7 / AcOEt 3)	27 %
27b	SO_2CH_3	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2,3-dinitrooxypropyle	Chromatographie (Hept 6 / AcOEt 4)	30 %
27c	SO_2NH_2	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate de 2,3-dinitrooxypropyle	Chromatographie (Hept 5 / AcOEt 5)	32 %

❖ Réactifs :

Composé	Réactant	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Masse (g)
27a	1,5-diphényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle	304	0,46
27b	1-(4-méthanesulfonylphényl)-5-phényl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle	382	0,57
27c	5-phényl-1-(4-aminosulfonylphényl)-1H-pyrazole-3-carboxylate d'allyle	383	0,57

❖ Caractéristiques :

Composé	Formule brute	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Aspect	R _f
27a	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8$	428	Huile jaune	(Hept 7 / AcOEt 3) 0,28
27b	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$	506	Huile jaune	(Hept 4 / AcOEt 6) 0,43
27c	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$	507	Huile jaune	(Hept 4 / AcOEt 6) 0,57

❖ Analyses :

Composé	IR : ν (cm^{-1})	Fonctions
27a	1732 1278 et 1644	CO ester Ester nitrique
27b	1732 1280 et 1644	CO ester Ester nitrique
27c	1734 1281 et 1647	CO ester Ester nitrique

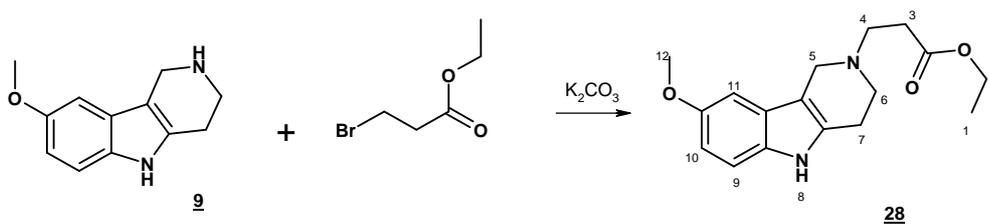
RMN ¹H :

<i>Composé</i>	<i>Solvant</i>	<i>δ (ppm)</i>
<u>27a</u>	DMSO – d6	7,47 – 7,24 (m, 10H, H _{arom}) ; 7,20 (s, 1H, H ₄) ; 5,81 (m, 1H, H ₂) ; 5,09 – 4,56 (m, 4H, H _{1,3})
<u>27b</u>	DMSO – d6	8,00 (d, 2H, H _{11,12} , J = 8,5 Hz) ; 7,61 (m, 2H, H _{10,13} , J = 8,7 Hz) ; 7,42 (m, 3H, H _{6,7,8}) ; 7,32 (m, 2H, H _{5,9}) ; 7,24 (s, 1H, H ₄) ; 5,82 (m, 1H, H ₂) ; 5,09 – 4,57 (m, 4H, H _{1,3}) ; 3,25 (s, 3H, H ₁₄)
<u>27c</u>	DMSO – d6	7,88 (d, 2H, H _{11,12} , J = 8,8 Hz) ; 7,52 (d, 2H, H _{10,13} , J = 8,7 Hz) ; 7,51 (s, 2H, H ₁₄) ; 7,41 (m, 3H, H _{6,7,8}) ; 7,30 (m, 2H, H _{5,9}) ; 7,23 (s, 1H, H ₄) ; 5,81 (s, 1H, H ₂) ; 5,10 – 4,58 (m, 4H, H _{1,3})

LC/MS :

<i>Composé</i>	<i>tr (min)</i>	<i>MH⁺ (g.mol⁻¹)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>	<i>Pureté</i>
<u>27a</u>	4,36	429	250	98,9 %
<u>27b</u>	4,03	507	250	99,2 %
<u>27c</u>	3,62	508	245	98 %

Synthèse du 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionate d'éthyle 28



❖ Protocole expérimental :

Le 8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (3 g ; 14,8 mmol ; 1 éq), l'acide 3-bromopropionique (2,95 g ; 16,3 mmol ; 1,1 éq) ainsi que K₂CO₃ (4,14 g ; 30 mmol ; 2 éq) sont dissous dans l'éthanol (20 mL), avant reflux sous agitation.

Après 24 h de réaction, le milieu est refroidi, filtré et concentré. L'huile ainsi obtenue est reprise par le dichlorométhane (150 mL) et lavée par l'eau (3 x 150 mL). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation, la phase organique est refroidie à -10 °C où la β-carboline précipite.

On obtient 4,13 g de cristaux de couleur jaune, soit un rendement de 91 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₇H₂₂N₂O₃

Masse molaire : 302 g.mol⁻¹

Aspect : Solide jaune

R_f(DCM 9 / MeOH 1) : 0,56

❖ Analyses :

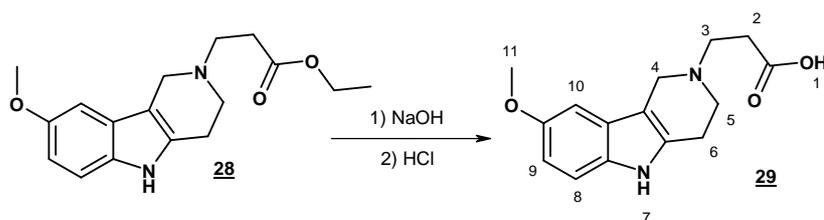
IR : 3389 cm⁻¹ v (NH indolique)

1730 cm⁻¹ v (CO ester)

RMN¹H (CDCl₃) : δ (ppm) :

7,88 (s, 1H, H₈) ; 7,16 (m, 1H, H₉) ; 6,86 (s, 1H, H₁₁) ; 6,77 (m, 1H, H₁₀) ; 4,42 (m, 2H, H₂) ; 3,86 (s, 3H, H₁₂) ; 3,75 (s, 2H, H₅) ; 3,02 (t, 2H, H₄, J = 5,5 Hz) ; 3,93 (m, 2H, H₇) ; 2,85 (m, 2H, H₆) ; 2,69 (t, 2H, H₃, J = 5,5 Hz) ; 1,26 (m, 3H, H₁)

Synthèse de l'acide 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propionique 29



❖ Protocole expérimental :

Le 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propanoate d'éthyle (4,13 g, 13,7 mmol, 1 éq) est solubilisé dans le méthanol (50 mL). Parallèlement, NaOH (2,8 g, 70 mmol, 5,1 éq) est dissoute dans un minimum d'eau, puis ajoutée à la solution de méthanol. Après 1 h de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré. L'huile ainsi obtenue est reprise dans l'eau (100 mL) et lavée par le dichlorométhane.

Un précipité blanc est obtenu après neutralisation de la phase aqueuse par la soude 1N.

On obtient l'acide 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propionique sous forme de solide blanc par filtration avec un rendement de 75 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₅H₁₈N₂O₃

Masse molaire : 274 g.mol⁻¹

Aspect : Solide blanc

R_f : Produit insoluble

Fusion (°C) > 230°C

❖ Analyses :

IR : 3156 cm⁻¹ v (NH indolique)

1650 cm⁻¹ v (CO acide)

RMN¹H (DMSO - *d*₆ + D₂O) : δ (ppm) :

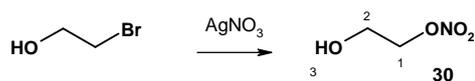
10,62 (s, 1H, H₁) ; 7,15 (d, 1H, H₈, J_o = 8,5 Hz) ; 6,87 (d, 1H, H₁₀, J_m = 2,5 Hz) ; 6,65 (dd, 1H, H₉, J_o = 8,7 Hz, J_m = 2,4 Hz) ; 3,76 (s, 3H, H₁₁) ; 3,71 (s, 2H, H₄) ; 3,03 (t, 2H, H₅, J = 3,2 Hz) ; 2,97 (t, 2H, H₃, J = 5,8 Hz) ; 2,83 (t, 2H, H₆, J = 4,1 Hz) ; 2,48 (t, 2H, H₂, J = 6,7 Hz)

LC/MS :

tr : 2,23 min

MH⁺ : 275 g/mol⁻¹

Synthèse du 2-(nitrooxy)-1-éthanol 30



❖ Protocole expérimental :

A une suspension de AgNO_3 (4,1 g ; 24 mmol ; 1,5 éq) dans l'acétonitrile (30 mL) est ajouté le 2-bromoéthanol (2 g ; 16 mmol ; 1 éq). Après reflux sous agitation pendant 5 h, à l'abri de la lumière, le milieu réactionnel est ensuite refroidi à 25 °C, puis concentré. L'huile obtenue est reprise dans l'eau (50 mL). Le précipité formé est filtré, et le filtrat est extrait par l'éther (2 x 100 mL). La phase organique est ensuite séchée sur CaCl_2 , filtrée puis concentrée. L'huile obtenue est conservée à -10 °C à l'abri de la lumière.

On obtient le 2-(nitrooxy)-1-éthanol avec un rendement de 80 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_4$

Masse molaire : 107 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : Huile jaune

R_f (DCM 9 / MeOH 1) : 0,70

❖ Analyses :

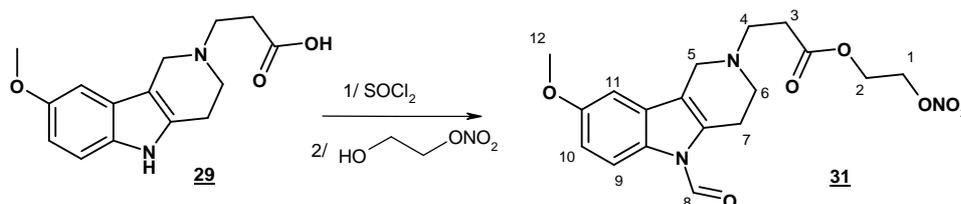
IR : 3352 cm^{-1} v (OH primaire)

1627 et 1279 cm^{-1} v (Ester nitrique)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) :

4,59 (t, 2H, H₁, J = 4,6 Hz) ; 3,92 (t, 2H, H₂, J = 4,4 Hz) ; 2,65 (sl, 1H, H₃)

Synthèse du 3-(5-formyl-8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionate de 2-nitrooxyéthyle 31



❖ Protocole expérimental :

L'acide 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionique (0,5 g, 1,8 mmol, 1 éq) est introduit avec SOCl₂ (0,53 g, 4,5 mmol, 2,5 éq) dans un mélange de dichlorométhane (25 mL) et de diméthylformamide (5 mL). Après 2 h de réaction à 0 °C, une solution de dichlorométhane (5 mL) contenant du 2-(nitrooxy)-1-éthanol (0,246 g, 2 mmol, 1,1 éq) est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. Les solvants sont évaporés après 4 h de réaction à température ambiante.

Le résidu huileux obtenu est repris dans l'eau (200 mL) et la solution est amenée à pH = 8 par une solution de NaOH 1N. Cette phase aqueuse est extraite par l'acétate d'éthyle (3 x 250 mL) la phase organique est ensuite lavée par l'eau saturée en NaCl, séchée sur MgSO₄ puis concentrée.

Le produit est isolé par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM 5 / AcOEt 5) avec un rendement de 50 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₈H₂₁N₃O₇

Masse molaire : 391 g.mol⁻¹

Aspect : Huile jaune

R_f (DCM 5 / AcOEt 5) : 0,25

❖ Analyses :

IR : 1738 cm⁻¹ ν (CO ester)

1637 cm⁻¹ ν (CO amide)

1280 cm⁻¹ ν (Ester nitrique)

*RMN*¹H (CDCl₃) : δ (ppm) :

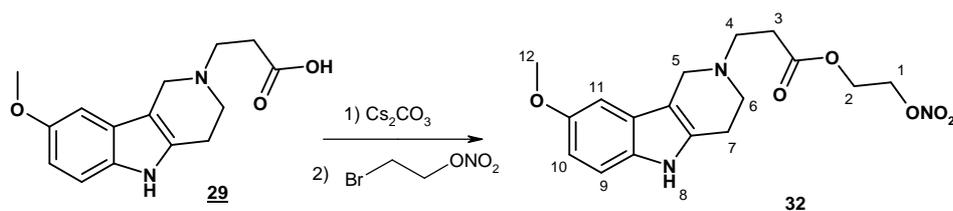
10,11 (s, 1H, H₈) ; 7,72 (s, 1H, H₁₁) ; 7,15 (d, 1H, H₉, J_o = 8,8 Hz) ; 6,90 (dd, 1H, H₁₀, J_o = 8,8 Hz, J_m = 2 Hz) ; 4,89 (s, 2H, H₅) ; 4,69 (t, 2H, H₃, J = 4,1 Hz) ; 4,42 (t, 2H, H₂, J = 4,7 Hz) ; 3,90 (s, 3H, H₁₂) ; 3,35 (t, 2H, H₁, J = 5,8 Hz) ; 3,20 (t, 2H, H₇, J = 5,8 Hz) ; 3,05 (t, 2H, H₆, J = 6,4 Hz) ; 2,65 (t, 1H, H₄, J = 6,7 Hz)

LC/MS :

tr : 3,46 min

MH⁺ : 392 g.mol⁻¹

Synthèse du 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-b]indol-2-yl)propionate de nitrooxyéthyle 32



❖ Protocole expérimental :

L'acide 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propionique (0,2 g, 0,73 mmol, 1 équ) est dissous dans le diméthylformamide (4 mL) en présence de Cs₂CO₃ (0,2 g, 1,45 mmol, 2 équ). Après 30 min d'agitation à température ambiante, le nitrooxybromoéthanol est ajouté (0,15 g, 0,88 mmol, 1,2 équ).

Après 15 h d'agitation, le milieu réactionnel est versé dans l'eau (60 mL), extrait ensuite par l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). La phase organique ainsi obtenue est lavée par une solution de K₂CO₃ à 5 % (100 mL), par l'eau saturée en NaCl (100 mL), séchée sur MgSO₄ puis concentrée.

Le 3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propionate de nitrooxyéthyle est obtenu sous la forme d'une huile orange avec un rendement de 76 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₁₇H₂₁N₃O₅

Masse molaire : 363 g.mol⁻¹

Aspect : Huile orange

R_f (DCM 9 / EtOH 1) : 0,70

❖ Analyses :

IR : 1738 cm⁻¹ v (CO ester)

1635 et 1280 cm⁻¹ v (ONO₂)

*RMN*¹H (CDCl₃) : δ (ppm) :

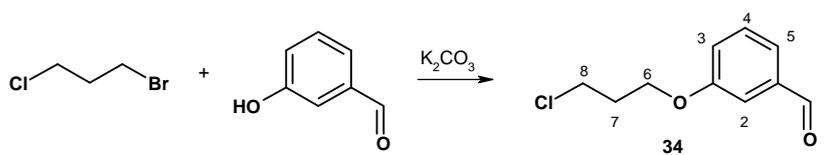
7,72 (s, 1H, H₉) ; 7,15 (d, 1H, H₁₁, J_m = 8,8 Hz) ; 6,90 (dd, 1H, H₁₀, J_m = 8,8 Hz, J_o = 2 Hz) ; 4,67 (m, 2H, H₂) ; 4,39 (m, 2H, H₁) ; 3,85 (s, 3H, H₁₂) ; 3,73 (s, 2H, H₅) ; 3,00 (t, 2H, H₃, J = 7,3 Hz) ; 2,90 (t, 2H, H₇, J = 5,4 Hz) ; 2,85 (t, 2H, H₆, J = 5,0 Hz) ; 2,7 (t, 2H, H₄, J = 7,3 Hz)

LC/MS :

Tr = 2,58 min

MH⁺ = 394 g.mol⁻¹

Synthèse du 3-(3-chloropropoxy)benzaldéhyde 34



❖ Protocole expérimental :

Le 3-hydroxybenzaldéhyde (5 g, 41 mmol, 1 éq) et K_2CO_3 (17 g, 123 mmol, 3 éq) sont introduits dans l'acétonitrile (70 mL), puis le mélange est porté à reflux sous agitation pendant 30 min. Le 1-bromo-3-chloropropane (8 mL, 82 mmol, 2 éq) est ensuite ajouté. Après 24 h de reflux, la solution est refroidie, filtrée puis concentrée.

L'huile brune ainsi obtenue est reprise par le dichlorométhane, lavée par NaOH 1N (2 x 150 mL) afin d'éliminer l'excès de 3-hydroxybenzaldéhyde, par l'eau (1 x 150 mL), puis par l'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée. L'huile obtenue est séparée par chromatographie sur gel de silice (Cyclo 9 / AcOEt 1).

On isole ainsi une huile légèrement visqueuse de couleur orangée, avec un rendement de 90 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : $C_{10}H_{11}ClO_2$

Masse molaire : 198 g.mol^{-1}

Aspect : Huile orange

Rf (Hept 7 / AcOEt 3) : 0,47

❖ Analyses :

IR : 3030 cm^{-1} v (NH indolique)

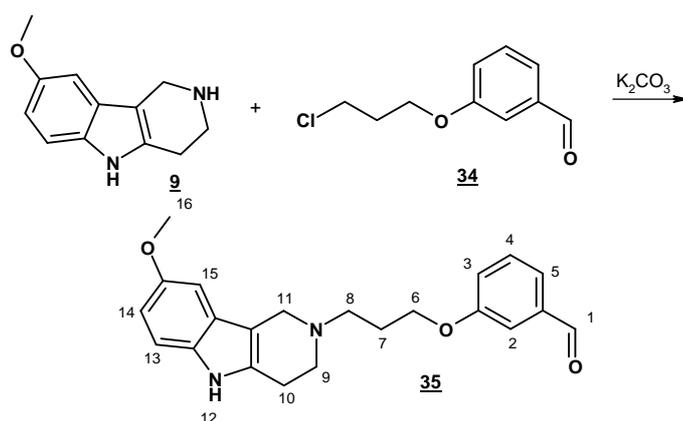
1698 cm^{-1} v (CO aldéhyde)

1260 cm^{-1} v (CO ester vinylique)

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ (ppm) :

10,00 (s, 1H, H_1) ; 7,49 (m, 3H, $H_{3,5}$) ; 7,42 (d, 1H, H_2 , $J_m = 2,3 \text{ Hz}$) ; 7,21 (td, 1H, H_4 , $J_o = 9,1 \text{ Hz}$, $J_m = 2,9 \text{ Hz}$) ; 4,19 (t, 2H, H_6 , $J = 5,8 \text{ Hz}$) ; 3,76 (t, 2H, H_8 , $J = 6,4 \text{ Hz}$) ; 2,32 (q, 2H, H_7 , $J = 6,1 \text{ Hz}$)

Synthèse du 3-[3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propyloxy]benzaldéhyde **35**



❖ Protocole expérimental :

Le 8-méthoxy-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (2,32 g, 11,7 mmol, 2 éq), et le 3-(3-chloropropoxy)benzaldéhyde (1,18 g, 5,8 mmol, 1 éq) sont solubilisés dans le diméthylformamide anhydre (50 mL). Après ajout de K_2CO_3 (1,6 g, 11,7 mmol, 2 éq), le milieu est chauffé à 80 °C sous agitation pendant 24 h.

Il est ensuite versé goutte à goutte dans l'eau (500 mL), avant extraction par l'acétate d'éthyle (5 x 200 mL). La phase organique est isolée, lavée par NaOH 1N (2 x 200 mL) puis par l'eau (1 x 100 mL), séchée sur $MgSO_4$ et concentrée. L'huile marron ainsi obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM 95 / EtOH 5).

On obtient le 3-[3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propyloxy]benzaldéhyde sous forme d'une huile jaune avec 20 % de rendement.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : $C_{22}H_{24}N_2O_3$

Masse molaire : $364 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : Huile jaune

R_f (DCM 9 / EtOH 1) : 0,53

❖ Analyses :

IR : 1693 cm^{-1} v (aldéhyde)

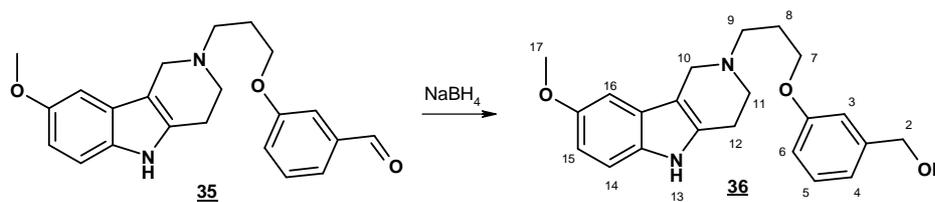
1482 cm^{-1} v (méthoxy)

1262 cm^{-1} v (ester vinylique)

RMN 1H ($CDCl_3$) : δ (ppm) :

10,00 (s, 1H, H_1) ; 8,00 (s, 1H, H_{12}) ; 7,45 (m, 2H, $H_{4,5}$) ; 7,40 (m, 1H, H_6 , $J = 1,8 \text{ Hz}$) ; 7,20 (m, 1H, H_3) ; 7,15 (d, 1H, H_{15} , $J = 8,8 \text{ Hz}$) ; 6,90 (d, 1H, H_{13} , $J = 2,3 \text{ Hz}$) ; 6,80 (dd, 1H, H_{14} , $J_2 = 8,8 \text{ Hz}$, $J_3 = 2,3 \text{ Hz}$) ; 4,15 (t, 2H, H_6 , $J = 6,1 \text{ Hz}$) ; 3,85 (s, 3H, H_{16}) ; 3,75 (s, 2H, H_{11}) ; 2,90 (m, 6H, $H_{8,9,10}$) ; 2,20 (qt, 2H, H_7 , $J = 6,7 \text{ Hz}$)

Synthèse du 2-[3-(3-hydroxyméthylphénoxy)propyl]-8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indole
36



❖ Protocole expérimental :

Le 3-[3-(8-méthoxy-1,3,4,5-tétrahydropyrido[4,3-*b*]indol-2-yl)propoxy]benzaldehyde (0,07 g, 0,19 mmol, 1 éq) est dissous dans l'éthanol (10 mL) et refroidi à 0 °C. On ajoute alors goutte à goutte sous agitation NaBH₄ (0,01 g, 0,26 mmol, 1,4 éq).

Après 45 min de réaction et retour à température ambiante, NaBH₄ est hydrolysé par une solution de HCl 1N. L'éthanol est ensuite évaporé avant ajout d'eau (100 mL) ; la phase aqueuse est extraite par le dichlorométhane (2 x 50 mL).

Après séchage la phase organique est évaporée pour donner une huile de couleur verte avec un rendement de 86 %.

❖ Caractéristiques :

Formule brute : C₂₂H₂₆N₂O₃

Masse molaire : 366 g.mol⁻¹

Aspect : Huile verte

R_f (DCM 9 / EtOH 1) : 0,28

❖ Analyses :

IR : 3666 cm⁻¹ v (OH)

1710 cm⁻¹ v (CO ester)

RMN¹H (CDCl₃) : δ (ppm) :

8,00 (s, 1H, H₁₃) ; 7,25 (d, 1H, H₁₄, J_o = 8,5 Hz) ; 7,15 (d, 1H, H₁₅, J_o = 8,7 Hz) ; 7,00 – 6,70 (m, 5H, H₃₋₆, H₁₆) ; 4,62 (s, 2H, H₂) ; 4,10 (t, 2H, H₇, J = 6,1 Hz) ; 3,86 (s, 3H, H₁₇) ; 3,72 (s, 2H, H₁₀) ; 2,85 (m, 6H, H_{9,11,12}) ; 2,14 (m, 2H, H₈)

Optimisation du concept d'inhibition de la cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate

L'acide acétylsalicylique, molécule dérivée d'extraits de saule, est utilisé depuis des milliers d'années comme anti-inflammatoire et analgésique. La découverte au cours des années 80 de la cyclooxygénase, cible de cet inhibiteur enzymatique, a relancé la recherche de nouveaux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). C'est la mise en évidence de l'existence de plusieurs isoformes de la COX et l'attribution des effets pharmacologiques des inhibiteurs de cyclooxygénase à ces différents isoformes qui a permis l'émergence de nouvelles thérapeutiques minimisant les effets secondaires gastriques des AINS.

Bien qu'encore controversé, l'intérêt de ce type de composés dans la pathologie cancéreuse a été récemment montré, en particulier dans le cancer de la prostate. Notre étude consiste en l'optimisation de composés inhibiteurs de cyclooxygénase afin de les rendre plus efficaces dans la chimioprévention et la chimiothérapie de ce type de maladie.

Tout d'abord, la vectorisation d'un inhibiteur sélectif COX-2 par un peptide pouvant être reconnu et clivé par l'antigène prostatique spécifique (protéase active uniquement au niveau de la prostate), et capable, après ce clivage, d'amorcer une réaction intramoléculaire conduisant à la libération du principe actif, nous a paru pertinente dans le cadre d'une thérapie ciblée. La conception, la synthèse et l'étude d'un espaceur novateur permettant de lier l'inhibiteur COX au peptide et d'obtenir ce type de réarrangement ont ainsi été menées et ont débouché sur des résultats prometteurs.

En parallèle, l'adjonction d'une seconde entité active à un composé inhibiteur COX sous la forme d'une *prodrug* a été envisagée. Le monoxyde d'azote NO, radical messenger ubiquitaire, possède des propriétés pharmacologiques étonnantes dans un grand nombre de tissus, que ce soit en vasodilatation, protection des muqueuses gastriques mais également dans le cadre du traitement d'un cancer. Synthétiser un nombre important de composés, inhibiteurs sélectifs ou non de COX-2, pouvant, après métabolisation libérer à la fois NO et l'inhibiteur nous a semblé intéressant, en particulier compte tenu de la controverse actuelle sur les modes d'actions réels de ces composés. Après leurs synthèses, l'analyse approfondie du devenir métabolique de ces molécules a dû être menée pour tenter de comprendre leur prise en charge par le système enzymatique. C'est par le biais de différentes évaluations pharmacologiques aussi variées que l'étude de la vasodilatation aortique *ex-vivo* ou la résonance paramagnétique électronique, que les cinétiques de métabolisation ont pu être abordées ; et c'est en réalisant des mesures d'inhibitions enzymatiques (sur sang humain) et de prolifération cellulaire (sur lignées cancéreuses humaines) que le potentiel thérapeutique de nos composés a pu être estimé.

Enfin, la combinaison de ces deux approches par la conception et la synthèse de composés inhibiteurs de cyclooxygénase / donneurs de NO vectorisés a été abordée.

Optimization of cyclooxygenase inhibition applied to prostate cancer treatment

Acetylsalicylic acid, a molecule found in willow bark's extracts, has been used for thousands of years as an anti-inflammatory and analgesic agent. During the 80's, the discovery of cyclooxygenase as a target for this enzyme inhibitor revived the interest in non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) research. The existence of several isoforms of COX has been proven more recently, and each one has been associated with different effects NSAIDs can have. This led to the emergence of therapeutics targeting a single isoform, in an attempt to lower the side effects of non-specific drugs.

Even if still discussed, the usefulness of this new type of molecules in the cancer pathology has recently been showed, particularly on prostate cancer cells. Our study consists in optimizing cyclooxygenase inhibitors to achieve more efficacy in chemotherapy and chemoprevention of this kind of disease.

First of all, the use of a peptide vector that can be recognized and cleaved by the prostate specific antigen (a protease active exclusively in the prostate) while carrying a COX-2 inhibitor and capable of, after cleavage followed by intramolecular rearrangement, releasing the active moiety appealed to us in a targeted therapy approach. The conception, synthesis and study of a novel spacer allowing us to link the COX-2 inhibitor to a peptide while permitting a cleaving – rearrangement sequence to occur after PSA recognition were conducted and gave promising results.

In parallel, adding to a COX inhibitor an other active moiety under the form of a prodrug was looked into. Nitric oxide (NO), an ubiquitous radical messenger, displays surprising pharmacological properties in a wide array of tissues, be it as a vasodilator, gastric mucosa protector and even in cancer chemotherapy. The synthesis of a wide panel of innovative compounds, COX-2 selective or not, able to release both NO and the inhibitor seemed interesting, especially when considering the amount of contradictory bibliographic data presenting the mode of action of this type of drugs. Once obtained, the in-depth analysis of the metabolic pathway underwent by our molecules had to be studied in order to shed light on the biological mechanisms underlying their effects. Using various techniques, such as *ex vivo* vasodilatation experiments on rat aorta strips and electron spin resonance measurements, we were able to access metabolization kinetics of these prodrugs; while classical enzymatic inhibition assays on human whole blood and proliferation assays on human prostatic cancer cell lines revealed the therapeutic interest of our compounds.

Finally, combining the peptide vector and the NO donor on a cyclooxygenase inhibitor was attempted.