

# Etude du pouvoir inhibiteur de molécules thérapeutiques usuelles sur les propriétés oxydantes des neutrophiles et de la myéloperoxydase

Thèse soumise par

**Pauline Nyssen**

en vue de l'obtention  
du diplôme de Docteur en Sciences

Année académique 2023-2024

Université de Liège  
Faculté des Sciences  
Département de Physique  
Unité de recherche CESAM  
Laboratoire de Spectroscopie Biomédicale

**Composition du Jury :**

Pr. Maryse Hoebeke	PROMOTEUR
Dr. Ange Mouithys-Mickalad	CO-PROMOTEUR
Pr. Alain Seret	PRÉSIDENT
Pr. Stéphane Dorbolo	SECRÉTAIRE
Pr. Marie Erard	
Pr. Bernard Gallez	
Pr. Frédéric Kerff	

# Remerciements

*"Si vous réussissez, c'est parce qu'à un moment, quelque part, quelqu'un vous a donné un exemple ou une idée qui vous a guidé dans la bonne direction. Souvenez-vous que vous gardez cette dette à vie jusqu'à ce que vous aidiez quelqu'un de moins chanceux tout comme vous avez pu l'être" Melinda Gates*

Je souhaiterais avant tout remercier les membres de mon jury de thèse, Madame Marie Erard et Messieurs Bernard Gallez, Frédéric Kerff, Stéphane Dorbolo et Alain Seret. Merci à vous d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'y apporter vos critiques. J'en suis très honorée. Je voudrais également remercier Madame Paulette Charlier pour avoir fait partie de mon comité de thèse, pour l'attention apportée à mon travail et pour ses conseils.

Tout d'abord, à ma promotrice, Maryse Hoebeke, un immense merci pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein du laboratoire de Spectroscopie Biomédicale. Merci de m'avoir accueillie et encadrée avec bienveillance depuis tant d'années, de mon stage de master, jusqu'à mon mémoire et ensuite ma thèse. Je vous remercie pour votre confiance, pour l'autonomie que vous m'avez permis d'acquérir et vos encouragements tout au long de ces années. Votre écoute et vos conseils m'ont permis d'évoluer aussi bien professionnellement que personnellement. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, aussi bien du point de vue scientifique que pédagogique.

A Ange Mouithys-Mickalad, mon co-promoteur, ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans vous, sans votre soutien infaillible et vos précieux conseils. Merci pour tout ce temps que vous m'avez consacré et toutes les connaissances que vous m'avez transmises. Votre savoir inépuisable est une source d'inspiration et cela a été un réel plaisir de travailler sous votre supervision. Je ne saurais jamais assez vous exprimer ma gratitude.

J'ai eu la chance depuis mon mémoire et durant ces sept années de travailler au sein du laboratoire du CORD. Un immense merci à Thierry, Ariane, Justine, Julien, Madame Deby et Monsieur Serteyn de m'avoir accueillie dans une ambiance joyeuse et bienveillante. Merci pour tout le temps que vous m'avez accordé et pour la formation que vous m'avez donnée. Votre aide indispensable m'a permis de pouvoir réaliser cette thèse dans un domaine éloigné de ma formation initiale. Je garderai un souvenir chaleureux de toutes ces heures passées au labo en votre compagnie.

Je voudrais également remercier sincèrement les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer durant ces années de thèse. Merci de m'avoir donné la possibilité de découvrir diverses techniques expérimentales qui sont venues enrichir ce travail. Je commencerai par Mesdames Sabine Van Doorslaer et Ilenia Serra de l'Université d'Anvers, pour l'accès à la plateforme de spectroscopie RPE. Je vous remercie pour votre accueil et le temps que vous m'avez accordé. Merci à Monsieur Anthony Maho pour m'avoir permis de réaliser les différentes mesures de voltammétrie exposées dans ce travail et pour le partage de ses connais-

sances. Je remercie également chaleureusement Messieurs André Matagne et Romain Malempré pour leur accompagnement lors de l'utilisation de la technique de spectroscopie d'absorption stopped-flow et pour leur aide précieuse à la rédaction de mon second article. Pour finir, merci à Messieurs Eric Sauvage et Johan Wouters, qui au début de ma thèse m'ont accompagnée dans l'étude de modélisation moléculaire. Merci pour tous vos conseils.

Durant ce cheminement long et semé d'embûches qu'est la réalisation d'une thèse de doctorat, j'ai eu la chance d'être extrêmement bien accompagnée. Merci Julie pour tes encouragements et ton oreille attentive. On a commencé cette aventure ensemble et nous voilà maintenant à la fin, après sept années qui ont parfois semblé interminables mais qui au final sont passées tellement vite. Merci pour ta volonté sans faille qui a toujours été un exemple.

Merci Thomas pour ton aide inestimable et pour tout le temps que tu m'as accordé en relisant ce travail. Merci pour ces heures de discussion sur notre vision (parfois fort pessimiste) du monde, où on ne voyait pas le temps passer. Tes connaissances et ta curiosité m'inspirent chaque jour et me donnent envie, maintenant que mon esprit est plus léger, de m'ouvrir à de nouvelles choses. J'espère qu'on continuera encore longtemps à refaire le monde.

Merci à Clémentine, ma seule collègue à avoir partagé mon bureau. Ta présence, ta bonne humeur et ton optimisme à toute épreuve ont été une bouffée d'air frais durant ces derniers mois difficiles que sont ceux consacrés à la rédaction. Sans oublier tes connaissances illimitées de LaTeX qui m'ont sauvée.

Mon poste d'assistante m'a donné la chance, en parallèle de la recherche, de pouvoir encadrer un grand nombre d'étudiants que ce soit en séances de répétitions, remédiations ou travaux pratiques. J'ai fait partie d'une chouette équipe dynamique. Merci à Pierre-Xavier, Pauline et Elodie, ce fut un vrai plaisir de travailler à vos côtés. Un immense merci à Jacqueline pour avoir chouchouté tous les assistants durant de nombreuses années. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tous tes encouragements. Merci pour toutes les chiques sans lesquelles je n'aurais pas pu survivre !

Je remercie également les membres du département de physique et plus particulièrement la super équipe du premier étage. Merci à Christelle, Carine, Christine, Alexis, Christophe, Florence et Monsieur Dreesen pour votre aide, les temps de midi partagés et tous les moments agréables qui ont ponctué ces sept années.

Hélène, Gaëlle, Blandine, Anne, Camille et Anne-Françoise, merci pour votre amitié depuis plus de quinze ans ! Merci pour tous ces moments, toutes ces soirées, ces papotages et commérages. Toutes vos réussites ont été et seront encore une source d'inspiration.

Je termine ces remerciements par les personnes les plus importantes, mes parents et ma soeur. Merci d'avoir cru en moi depuis toujours. Merci de m'avoir poussée à toujours donner le meilleur de moi-même. Merci d'avoir supporté mon mauvais caractère et mes sautes d'humeur durant cette période de rédaction et même avant... Je vous dédie cette thèse. Merci maman, je n'y serais pas arrivée sans toi.

Merci à Patchou...





# Résumé

La réponse inflammatoire est un mécanisme de défense essentiel à l'organisme. Une réaction inadaptée de ce système provoque une accumulation et une surstimulation des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire. Si la surproduction de molécules oxydantes qui en résulte ne peut être régulée par le système antioxydant endogène, les dégâts oxydatifs au niveau des tissus environnant la zone inflammatoire sont amplifiés et favorisent l'apparition de diverses pathologies chroniques. Leur traitement reste à ce jour un défi. C'est pourquoi de nombreuses études visent à mettre au point des traitements adaptés en investiguant notamment l'action inhibitrice de divers composés envers les mécanismes cellulaires ou enzymatiques caractéristiques du phénomène inflammatoire. Dans cette optique, le repositionnement des médicaments est une voie privilégiée afin d'accélérer le processus long et complexe qui consiste à développer un nouveau traitement. La découverte de propriétés immunomodulatrices pourrait ouvrir à certaines molécules une perspective d'utilisation dans le traitement de pathologies inflammatoires.

Partant de ce constat, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de trois groupes de molécules ayant déjà une utilité thérapeutique et ayant également montré des propriétés antioxydantes : les analgésiques et anesthésiants (morphine et propofol), les hypocholestérolémiantes (statines) et les anticancéreux. Une démarche multidisciplinaire, associant différentes techniques expérimentales complémentaires : spectroscopies d'absorption, de fluorescence et RPE, voltammétrie cyclique et modélisation moléculaire, a permis d'étudier leur capacité inhibitrice envers différents mécanismes oxydants de deux marqueurs importants de l'inflammation, à savoir les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) et l'enzyme myéloperoxydase (MPO). Une approche expérimentale a été mise en place et répétée pour chaque molécule d'intérêt retenue. Tout d'abord, afin d'obtenir des informations essentielles à la compréhension des éventuels mécanismes d'action sur la MPO et les PMNs, la capacité réductrice des molécules a été évaluée grâce à la détermination de leur potentiel d'oxydoréduction. Leur aptitude à piéger des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des radicaux a également été estimée. La deuxième partie de la démarche expérimentale s'est ensuite concentrée sur les PMNs. Les effets des composés d'intérêt sur différents mécanismes caractéristiques de ces cellules, à savoir la flambée respiratoire et la dégranulation, ont été explorés. Enfin, l'étude s'est intéressée à la MPO en évaluant l'activité inhibitrice des molécules d'intérêt sur les cycles de chloration et de peroxydase et en analysant leurs mécanismes d'action.

La méthodologie mise en place tout au long de ce travail a fourni des informations permettant de sélectionner les molécules dont les propriétés immunomodulatrices intéressantes laissent entrevoir des possibilités d'utilisation dans le cadre du traitement contre l'inflammation.



# Abstract

The inflammatory response is an essential defense mechanism for the body. An inadequate reaction of this system leads to an accumulation and over-stimulation of immune cells at the inflammatory site. If the resulting overproduction of oxidative molecules can not be regulated by the endogenous antioxidant system, oxidative damage to the tissues surrounding the inflammatory site leads to the onset of various chronic pathologies. Their treatment remains a challenging task. This is why numerous studies aim to develop suitable treatments, notably by investigating the inhibitory action of various compounds on the cellular or enzymatic mechanisms characteristic of the inflammatory phenomenon. With this in mind, drug repositioning is an ideal way of speeding up the long and complex process of developing a new treatment. The discovery of immunomodulatory properties could open the new prospect of some molecules being used in the treatment of inflammatory pathologies.

On this basis, the work carried out as part of this thesis assessed the anti-inflammatory properties of three groups of molecules which already have a therapeutic use and have also demonstrated antioxidant properties : analgesic and anaesthetic compounds (morphine and propofol), cholesterol-lowering agents (statins) and anticancer drugs. A multi-disciplinary approach, combining various complementary experimental techniques : absorption, fluorescence and EPR spectroscopies, cyclic voltammetry and molecular modeling, has enabled us to study their inhibitory capacity towards different oxidative mechanisms of two key inflammatory markers, namely neutrophil polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and the enzyme myeloperoxidase (MPO). For each molecule of interest studied, the following approach was followed. Firstly, in order to obtain essential information for understanding their potential mechanisms of action on MPO and PMNs, the reducing capacity of the molecules was estimated, by determining their redox potential. Their action as reactive oxygen species (ROS) and radicals scavengers was also studied. The second part of the experimental approach focused on PMNs. The effects of the compounds on different mechanisms characteristic of these cells, namely respiratory burst and degranulation, were explored. Finally, the study focused on MPO, assessing the inhibitory activity of the molecules of interest on chlorination and peroxidase cycles and analyzing their mechanisms of action.

The methodology implemented in this work has provided information which enables us to select molecules with interesting immunomodulatory properties that suggest a potential use in the treatment of inflammation.



# Table des matières

Remerciements	i
Résumé	v
Abstract	vii
Table des matières	ix
Liste des abréviations	xv
<b>Introduction</b>	<b>3</b>
<b>Notions théoriques et démarche expérimentale</b>	<b>9</b>
<b>1 Le processus inflammatoire</b>	<b>11</b>
1.1 Les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles . . . . .	11
1.1.1 Phagocytose, dégranulation et formation du NET . . . . .	12
1.1.2 La flambée respiratoire . . . . .	14
1.2 La myéloperoxydase . . . . .	17
1.2.1 Structure de l'enzyme . . . . .	18
1.2.2 Activité oxydante de l'enzyme . . . . .	20
1.2.3 Cibles principales de la MPO . . . . .	24
1.2.4 Sites d'action de la MPO . . . . .	24
1.3 Les pathologies inflammatoires . . . . .	25
1.3.1 Lien entre MPO, PMNs et pathologies . . . . .	25
1.3.2 Exemples de pathologies liées à l'inflammation . . . . .	26
1.3.3 Inhibition de la MPO . . . . .	30
1.3.4 Inhibition des PMNs . . . . .	32
<b>2 Stratégie expérimentale</b>	<b>35</b>
2.1 Etude de l'activité réductrice et antioxydante . . . . .	35
2.1.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction . . . . .	36
2.1.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS . . . . .	37
2.1.3 Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde . . . . .	38
2.1.4 Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet . . . . .	40
2.1.5 Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux . . . . .	41
2.2 Etude de l'action sur l'activité oxydante des PMNs . . . . .	42
2.2.1 Isolement des PMNs . . . . .	42
2.2.2 Viabilité cellulaire . . . . .	43

2.2.3	Inhibition de la production d'anions superoxydes . . . . .	43
2.2.4	Inhibition de la dégranulation . . . . .	44
2.2.5	Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés . . . . .	44
2.3	Etude de l'action sur l'activité oxydante de la MPO . . . . .	46
2.3.1	Modélisation moléculaire - Docking . . . . .	46
2.3.2	Interaction avec le cycle de peroxydase . . . . .	47
2.3.3	Interaction avec le cycle de chloration . . . . .	47
2.3.4	SIEFED . . . . .	48
<b>Résultats et discussion</b>		<b>51</b>
<b>3</b>	<b>Morphine</b>	<b>53</b>
3.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	53
3.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	54
3.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	54
3.4	Choix de la morphine . . . . .	56
3.5	Etude de l'action réductrice et antioxydante . . . . .	57
3.5.1	Détermination du potentiel d'oxydoréduction . . . . .	57
3.5.2	Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS . . . . .	58
3.5.3	Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde . . . . .	59
3.5.4	Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet . . . . .	61
3.5.5	Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux . . . . .	63
3.6	Etude de l'action sur l'activité oxydante des PMNs . . . . .	64
3.6.1	Viabilité cellulaire . . . . .	64
3.6.2	Inhibition de la production d'anions superoxydes . . . . .	64
3.6.3	Inhibition de la dégranulation . . . . .	67
3.6.4	Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés . . . . .	67
3.7	Etude de l'action sur l'activité oxydante de la MPO . . . . .	69
3.7.1	Modélisation moléculaire - Docking . . . . .	69
3.7.2	Interaction avec le cycle de peroxydase . . . . .	69
3.7.3	Interaction avec le cycle de chloration . . . . .	71
3.7.4	SIEFED . . . . .	73
3.8	Conclusion . . . . .	75
<b>4</b>	<b>Propofol</b>	<b>79</b>
4.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	79
4.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	80
4.3	Métabolites et dérivés d'oxydation . . . . .	80
4.3.1	Propofol- $\beta$ -glucuronide - PPFQ . . . . .	81
4.3.2	1-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide - PPFQ-1-G et 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide - PPFQ-4-G . . . . .	81
4.3.3	4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-sulfate - PPFQ-4-S . . . . .	82
4.3.4	2,6-diisopropyl-1,4-quinone - PPFQ . . . . .	82
4.3.5	3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone - PPFQDQ . . . . .	83
4.4	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	83
4.4.1	Propofol . . . . .	83
4.4.2	PPFQ . . . . .	85
4.4.3	PPFQ-1-G et PPFQ-4-G . . . . .	85
4.4.4	PPFQ et PPFQDQ . . . . .	85
4.5	Choix du propofol et de ses dérivés . . . . .	85

4.6	Etude de l'action réductrice et antioxydante . . . . .	87
4.6.1	Détermination du potentiel d'oxydoréduction . . . . .	87
4.6.2	Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS . . . . .	92
4.6.3	Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde . . . . .	94
4.6.4	Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet . . . . .	103
4.6.5	Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux . . . . .	104
4.6.6	Bilan de l'action réductrice et antioxydante du propofol et de ses mé- tabolites . . . . .	105
4.7	Etude de l'action sur l'activité oxydante des PMNs . . . . .	106
4.7.1	Viabilité cellulaire . . . . .	106
4.7.2	Inhibition de la production d'anions superoxydes . . . . .	106
4.7.3	Inhibition de la dégranulation . . . . .	111
4.7.4	Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés . . .	113
4.7.5	Bilan de l'action du propofol et de ses métabolites sur les PMNs . . .	114
4.8	Etude de l'action sur l'activité oxydante de la MPO . . . . .	115
4.8.1	Modélisation moléculaire - Docking . . . . .	115
4.8.2	Interaction avec le cycle de peroxydase . . . . .	118
4.8.3	Interaction avec le cycle de chloration . . . . .	120
4.8.4	SIEFED . . . . .	123
4.8.5	Spectroscopie d'absorption - Stopped-flow . . . . .	125
4.8.6	Bilan de l'action du propofol et de ses métabolites sur la myéloperoxydase	127
4.9	Conclusion . . . . .	129
<b>5</b>	<b>Anticancéreux</b> . . . . .	<b>133</b>
5.1	Molécules anticancéreuses . . . . .	135
5.2	Choix des molécules . . . . .	136
5.3	Hydroxyurée . . . . .	137
5.4	6-Thioguanine . . . . .	138
5.4.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	139
5.4.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	139
5.4.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	140
5.5	5-Fluorouracile . . . . .	141
5.5.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	142
5.5.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	142
5.5.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	142
5.6	Cladribine . . . . .	142
5.6.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	143
5.6.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	143
5.6.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	143
5.7	Melphalan . . . . .	144
5.7.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	144
5.7.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	144
5.7.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	145
5.8	Crizotinib . . . . .	145
5.8.1	Propriétés physico-chimiques . . . . .	146
5.8.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	146
5.8.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	146
5.9	Etude de l'action réductrice et antioxydante . . . . .	146
5.9.1	Détermination du potentiel d'oxydoréduction . . . . .	146
5.9.2	Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS . . . . .	152
5.9.3	Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde . . . . .	155

5.9.4	Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet . . . . .	162
5.9.5	Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux . . . . .	165
5.9.6	Bilan de l'action réductrice et antioxydante des molécules anticancéreuses	167
5.10	Etude de l'action sur l'activité oxydante des PMNs . . . . .	167
5.10.1	Inhibition de la production d'anions superoxydes . . . . .	167
5.10.2	Viabilité cellulaire . . . . .	170
5.10.3	Inhibition de la dégranulation . . . . .	171
5.10.4	Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés . . .	172
5.10.5	Bilan de l'action des molécules anticancéreuses sur les PMNs . . . . .	173
5.11	Etude de l'action sur l'activité oxydante de la MPO . . . . .	174
5.11.1	Modélisation moléculaire - Docking . . . . .	174
5.11.2	Interaction avec le cycle de peroxydase . . . . .	179
5.11.3	Interaction avec le cycle de chloration . . . . .	182
5.11.4	SIEFED . . . . .	185
5.11.5	Etude complémentaire de l'action inhibitrice de la 6-thioguanine . . .	187
5.11.6	Bilan de l'action des molécules anticancéreuses sur la myéloperoxydase	193
5.12	Conclusion . . . . .	195
<b>6</b>	<b>Statines</b>	<b>199</b>
6.1	Structure et propriétés physico-chimiques . . . . .	200
6.2	Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques . . . . .	200
6.3	Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires . . . . .	202
6.4	Choix des statines . . . . .	203
6.4.1	Statines naturelles . . . . .	204
6.4.2	Statines synthétiques . . . . .	207
6.4.3	Conclusion . . . . .	213
6.5	Etude de l'action réductrice et antioxydante . . . . .	213
6.5.1	Détermination du potentiel d'oxydoréduction . . . . .	213
6.5.2	Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS . . . . .	216
6.5.3	Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde . . . . .	217
6.5.4	Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet . . . . .	217
6.5.5	Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux . . . . .	220
6.5.6	Bilan de l'action réductrice et antioxydante des statines . . . . .	221
6.6	Etude de l'action sur l'activité oxydante des PMNs . . . . .	222
6.6.1	Inhibition de la production d'anions superoxydes . . . . .	222
6.6.2	Viabilité cellulaire . . . . .	225
6.6.3	Inhibition de la dégranulation . . . . .	226
6.6.4	Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés . . .	227
6.6.5	Bilan de l'action des statines sur les PMNs . . . . .	228
6.7	Etude de l'action sur l'activité oxydante de la MPO . . . . .	229
6.7.1	Interaction avec le cycle de peroxydase . . . . .	229
6.7.2	Interaction avec le cycle de chloration . . . . .	230
6.7.3	SIEFED . . . . .	232
6.7.4	Bilan de l'action des statines sur la myéloperoxydase . . . . .	233
6.8	Conclusion . . . . .	233

---

<b>Conclusion générale</b>	<b>235</b>
<b>Annexes</b>	<b>241</b>
<b>A Résumé des résultats</b>	<b>243</b>
<b>B Morphine</b>	<b>245</b>
B.1 Etude de l'interaction entre les métabolites glucuronides de la morphine et le site actif de la myéloperoxydase par modélisation moléculaire . . . . .	245
<b>C Propofol</b>	<b>249</b>
C.1 Synthèse des métabolites du propofol . . . . .	249
C.2 Etude de l'interaction entre les métabolites du propofol et le site actif de la myéloperoxydase par modélisation moléculaire . . . . .	251
<b>D Stratégie expérimentale - Aspects techniques</b>	<b>255</b>
D.1 Etude de l'activité réductrice et antioxydante . . . . .	255
D.2 Etude de l'action sur l'activité oxydante des PMNs . . . . .	258
D.3 Etude de l'action sur l'activité oxydante de la MPO . . . . .	261
D.4 Analyse statistique des données expérimentales . . . . .	264
<b>E Théorie des techniques expérimentales</b>	<b>265</b>
E.1 Voltammétrie . . . . .	265
E.2 Spectroscopie d'absorption UV-visible . . . . .	273
E.3 Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique . . . . .	277
E.4 Modélisation moléculaire - docking . . . . .	292
<b>F Etude de l'interaction du dérivé quinone du propofol (PPFQ) avec le site actif de la myéloperoxydase par spectroscopie RPE basse température</b>	<b>295</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>303</b>



# Liste des abréviations

6-TGN : nucléotide de la 6-thioguanine  
ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADPA : l'acide anthracène-9,10-dipropionique  
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens  
AKT : protéine kinase B  
ALK : kinase du lymphome anaplasique  
APF : 3'-(p-aminophenyl)-fluorescéine  
ARN : acide ribonucléique  
Arg : arginine  
Asp : aspartate  
ATP : adénosine triphosphate  
BHA : butylhydroxyanisole  
BHT : butylhydroxytoluène  
BSA : albumine de sérum bovin  
CdATP : 2-chlorodésoxyadénosine-5'-triphosphate  
COX-2 : cyclo-oxygénase 2  
DFT : théorie de la fonctionnelle de la densité  
DMF : N,N-diméthylformamide  
DMPO : 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle  
DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique  
EDTA : acide éthylènediaminetrétraacétique  
ERK : extracellular signal-regulated kinases  
ESH : électrode standard à hydrogène  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
fMLP : N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine  
FRAP : ferric reducing antioxidant power  
FRP : récepteur du formyl-peptide  
Glu : glutamate  
GTP : guanosine triphosphate  
HBSS : tampon Hank's balanced salt solution  
HCl : chlorure d'hydrogène  
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
His : histidine  
HMG-CoA réductase : hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase  
HOCl : acide hypochloreux  
IL-6 : interleukine 6  
IL-8 : interleukine 8  
L-012 : 8-amino-5-chloro-7-phenyl-pyridol[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione

LDL : lipoprotéine de basse densité  
LPS : lipopolysaccharide  
MAPK : protéine kinase activée par des agents mitogènes  
Met : méthionine  
MICI : pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin  
MPO : myéloperoxydase  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NET : neutrophil extracellular trap  
NOX : NADPH oxydase  
PAMP : pathogen-associated molecular pattern  
PBS : tampon phosphate salin  
PKC : protéine kinase  
PLC : phospholipide C  
PLD : phospholipide D  
PMA : phorbol myristate acétate  
PMNs : leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles  
pNPP : *p*-nitrophenyl phosphate  
pNP : *p*-nitrophénol  
PPF : propofol, 2,6-diisopropylphénol  
PPFQ : 2,6-diisopropyl-1,4-p-benzoquinone  
PPFDQ : 3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone  
PPFG : propofol- $\beta$ -glucuronide  
PTK : protéine tyrosine kinase  
RNOS : espèces réactives de l'azote  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
SCE : électrode au calomel saturée  
TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale  
Tween 20 : monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane





---

# Introduction

---



L'inflammation est un processus complexe, faisant intervenir un ensemble de mécanismes cellulaires, enzymatiques et chimiques étroitement intriqués. Ceux-ci ont pour but d'empêcher l'invasion des tissus par divers agents pathogènes (virus, bactéries, microbes,...). Parmi les différentes cellules du système immunitaire impliquées, les leucocytes et, plus particulièrement, les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) jouent un rôle essentiel en apportant, au niveau du site inflammatoire, un ensemble d'enzymes cytotoxiques ainsi que des médiateurs chimiques (chimokines, cytokines,...). Les PMNs et ces enzymes produisent diverses espèces oxydantes telles que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des radicaux afin de détruire les micro-organismes invasifs. Le spectre des enzymes participant à l'inflammation est large (peroxydases, métalloprotéinases, élastases, collagénases, lactoferrine, lysozyme,...), mais parmi celles-ci, la myéloperoxydase (MPO) joue particulièrement un rôle majeur. Elle génère des espèces oxydantes grâce notamment à son cycle de peroxydase mais surtout du fait de sa propriété unique, son cycle d'halogénéation. Celui-ci produit principalement un oxydant puissant, l'acide hypochloreux. La myéloperoxydase et les PMNs sont des marqueurs importants de l'inflammation. En effet, ils se retrouvent en grande concentration dans les tissus inflammés.

Le système immunitaire offre une défense essentielle à l'organisme. Il est régulé grâce à un système antioxydant complémentaire, composé d'un ensemble d'enzymes et de molécules endogènes ou exogènes à l'organisme. Cependant, différentes causes (facteur génétique, maladie auto-immune, exposition prolongée à des substances nocives, inflammation non traitée, stress, ...) peuvent induire une réponse inadaptée du système immunitaire comme une surstimulation de la réponse inflammatoire. Celle-ci déclenche alors une accumulation de cellules immunitaires telles que les PMNs et leur stimulation excessive. Ce qui entraîne une libération incontrôlée d'enzymes oxydantes. Le système antioxydant est alors dépassé. La surproduction de ROS et de radicaux induit des dégâts aux tissus sains environnants, provoquant l'apparition de pathologies inflammatoires.

Actuellement, l'inflammation aiguë est traitée efficacement, notamment grâce aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Par contre, en cas d'inflammation chronique, c'est-à-dire un état inflammatoire s'installant plus lentement mais durablement dans le temps sur des périodes de plusieurs mois ou plusieurs années, l'établissement de traitements efficaces reste encore un défi à relever. Cette recherche fait toujours l'objet de nombreuses publications scientifiques. Ces travaux explorent différentes pistes telles que le blocage de divers mécanismes caractéristiques des cellules du système inflammatoire (les voies de signalisation des cytokines, la phagocytose, la dégranulation, la nétose, ...) ou encore l'inhibition de diverses enzymes (cyclooxygénases, peroxydases, lipoxygénases, kinases, ...). Les PMNs et la MPO étant détectés en grande concentration dans les tissus lésés, ils peuvent donc être considérés comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cadre du traitement de pathologies inflammatoires.

La modulation, voire l'inhibition de l'action oxydante de la myéloperoxydase est une voie qui retient particulièrement l'attention. Le *virtual screening* représente un outil intéressant et efficace pour identifier des inhibiteurs de l'enzyme. En effet, grâce à la modélisation moléculaire, il permet de sélectionner parmi des bibliothèques contenant une grande variété de molécules, celles qui présentent une structure et des groupements chimiques leur permettant de pénétrer dans le site actif de l'enzyme et de s'y lier. Ces composés, qui offrent théoriquement la possibilité de former un complexe avec la MPO, peuvent alors être synthétisés et leur action inhibitrice évaluée grâce à différentes études *in vitro*. Diverses molécules ont franchi l'étape de ces différents tests et ont été retenues pour des analyses précliniques *in vivo*. Malheureusement, la découverte de leur toxicité aux posologies nécessaires à leur action anti-inflammatoire n'a pu permettre de passer au stade des tests cliniques. Les thioxanthines

en sont un exemple.

Afin de répondre cette importante problématique, le choix des inhibiteurs potentiels étudiés dans le cadre de cette thèse a été réalisé parmi des composés présentant déjà une utilité clinique avérée et ayant également montré une action antioxydante *in vitro* ou *in vivo*. La connaissance de leur posologie et de leur toxicité est un atout essentiel qui permet notamment d'accélérer les étapes lors de la mise au point d'un traitement potentiel. En effet, la conception d'un nouveau médicament est un processus très long et complexe. Il peut prendre environ dix ans, entre le début de la recherche fondamentale du mécanisme d'action de la molécule et l'autorisation de mise sur le marché par l'Agence Européenne du Médicament (AEM). Le repositionnement des médicaments est une démarche en plein essor. Il s'agit de rechercher une nouvelle utilité pour un médicament, afin de traiter des pathologies totalement différentes n'ayant pas de rapport supposé avec la cible initiale de la molécule. Dans le cas de ce travail, la découverte de propriétés immunomodulatrices permettra, pour certaines molécules, d'ouvrir une perspective d'utilisation dans le traitement de pathologies inflammatoires. Pour d'autres, l'ajout d'une propriété anti-inflammatoire à leur action clinique première leur fournira un atout supplémentaire qui pourrait permettre de privilégier leur utilisation par rapport à d'autres composés.

Au total, dix-huit molécules ont été sélectionnées parmi trois catégories de médicaments. Leur action immunomodulatrice a été évaluée grâce à une approche multidisciplinaire faisant intervenir diverses techniques d'analyse (techniques spectroscopiques, modélisation moléculaire, voltammétrie cyclique). Initialement, ce travail était centré sur l'inhibition de l'activité oxydante de la MPO par une sélection de molécules et sur l'étude de leurs mécanismes d'action. Cependant, l'activité de l'enzyme étant étroitement liée à celle des PMNs, les recherches ont été élargies afin d'évaluer également l'action des composés sur différentes propriétés des cellules, à savoir la production de ROS et le phénomène de dégranulation. Afin de compléter les résultats obtenus et d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action des molécules étudiées, une analyse de l'activité antioxydante des inhibiteurs a aussi été réalisée en déterminant leur capacité de piégeage de radicaux et de ROS.

Dans un premier temps, le travail s'est focalisé sur des composés utilisés principalement dans les unités de soins intensifs, à savoir la morphine (molécule analgésique) et le propofol (molécule anesthésiante), dont les propriétés antioxydantes sont déjà bien connues. En effet, de nombreuses pathologies inflammatoires (septicémie, COVID-19, etc.) pouvant mener les patients en soins intensifs, il était intéressant d'évaluer l'action potentiellement anti-inflammatoire de ces deux composés très fréquemment utilisés dans la sédation et le traitement de la douleur. Le but était ainsi de déterminer leur impact dans le traitement de l'inflammation pour éventuellement privilégier leur utilisation.

Le projet s'est ensuite étoffé grâce à l'étude de l'action sur la MPO de six statines, molécules hypocholestérolémiantes. Ces molécules font partie des médicaments les plus vendus et, de ce fait, font l'objet de nombreuses recherches visant à évaluer leur potentiel dans différents domaines autres que le traitement de l'excès de cholestérol. Certaines statines ont par exemple montré un intérêt dans le traitement du cancer. C'est pourquoi une évaluation de leur capacité immunomodulatrice a été réalisée.

Enfin, le lien étroit existant entre cancer et inflammation a mené au choix d'investiguer l'action potentiellement anti-inflammatoire de molécules anticancéreuses. Une propriété immunomodulatrice pourrait présenter pour ces composés un atout majeur dans le traitement du cancer. Les composés anticancéreux sont caractérisés par une grande variété de structures

chimiques. Six composés présentant une taille, une structure et des fonctions chimiques pouvant permettre l'interaction avec la MPO ont été sélectionnés.

La première partie de cette thèse est divisée en deux chapitres. Le premier aborde les notions théoriques à propos du phénomène inflammatoire, nécessaires à la bonne compréhension de ce travail. Il décrit l'implication intriquée des PMNs, de la MPO et des ROS dans le processus inflammatoire. Les différents rôles des PMNs sont passés en revue : la capture des micro-organismes invasifs par l'intermédiaire de la phagocytose et de la nétose ainsi que leur dégradation via la libération d'enzymes cytotoxiques, appelée dégranulation, sans oublier la production de ROS, c'est-à-dire la flambée respiratoire. L'implication du complexe enzymatique NADPH oxydase dans cette dernière est également détaillée, de même que le rôle de la myéloperoxydase, grâce à son action oxydante, à travers ses deux cycles de peroxydase et d'halogénéation. La description de l'intervention des PMNs et de la MPO dans diverses pathologies inflammatoires ainsi que l'exposé des stratégies éventuelles d'inhibition de leur action oxydante terminent ce premier chapitre.

Le second détaille l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de cette thèse. Une combinaison de différentes techniques spectroscopiques (résonance paramagnétique électronique (RPE), absorption UV-visible classique et *stopped-flow*, et fluorescence) a été associée à la modélisation moléculaire et à la voltammétrie cyclique. Cette section reprend étape par étape le déroulement des expériences menées en précisant leur pertinence par rapport à l'étude réalisée. La première étape des recherches a consisté à étudier les propriétés antioxydantes des différentes molécules d'intérêt. Plus précisément, leur capacité de piégeage de radicaux et de différents ROS (anion superoxyde, oxygène singulet et acide hypochloreux) a été estimée, ainsi que leur pouvoir réducteur via la détermination de leur potentiel d'oxydoréduction. Par la suite, l'impact des molécules d'intérêt sur la production d'anions superoxydes par des PMNs activés a fait l'objet d'une évaluation. Il était également intéressant de voir si ces molécules peuvent empêcher la libération de MPO par les cellules. L'action inhibitrice des molécules sur l'action oxydante de l'enzyme elle-même a aussi été examinée. Enfin, la capacité d'insertion au sein du site actif, la possibilité de former un complexe avec l'enzyme ainsi que l'échange d'électrons avec les intermédiaires redox des cycles de la MPO ont également fait l'objet d'études.

La deuxième partie de ce manuscrit est divisée en quatre chapitres, chacun étant consacré à un des groupes de molécules testées, à savoir : la morphine, le propofol et ses dérivés, les anticancéreux et les statines. Chaque chapitre comprend en préambule une description de l'utilisation thérapeutique, de la pharmacocinétique, de la pharmacodynamique ainsi que des propriétés anti-inflammatoires déjà établies du groupe de molécules en question. Viennent ensuite, l'ensemble des résultats obtenus ainsi que leur discussion et interprétation détaillées. Ces quatre chapitres ont été rédigés de manière à pouvoir être lus de façon indépendante.

La conclusion générale revient quant à elle sur les principaux résultats intéressants à retenir, ainsi que sur les perspectives d'études complémentaires qui pourraient les enrichir.



---

# Notions théoriques et démarche expérimentale

---



# Chapitre 1

## Le processus inflammatoire

L'inflammation est une réaction localisée d'un tissu à la suite de l'agression de micro-organismes tels que des bactéries, des microbes, des protozoaires, des virus, des cellules infectées ou des cellules tumorales. Elle a pour rôle essentiel de les éliminer et d'empêcher la dégradation tissulaire, grâce à une cascade de processus biochimiques et enzymatiques. Pour y parvenir, des cellules spécialisées du tissu conjonctif, les mastocytes, sécrètent des médiateurs chimiques (histamine et sérotonine) provoquant la vasodilatation des capillaires sanguins au niveau du tissu lésé. L'augmentation de l'apport en sang provoque le gonflement et la rougeur de la zone enflammée. La perméabilité accrue des vaisseaux sanguins permet la colonisation du tissu par les leucocytes, également appelés globules blancs. Plusieurs types de globules blancs interviennent dans le processus inflammatoire : les macrophages, les polymorphonucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes. Chaque leucocyte joue un rôle précis, permettant la destruction des agents pathogènes. Les macrophages et les lymphocytes vont, grâce à des récepteurs transmembranaires spécifiques, reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern). Les PAMPs sont des molécules exprimées à la surface des pathogènes comme les lipopolysaccharides (LPS), l'acide lipotéichoïque, la flagelline, les peptidoglycanes. La détection des PAMPs induit l'activation des diverses voies de signalisation intracellulaire conduisant à la production et à la libération des cytokines pro-inflammatoires (l'interleukine-1 et -12, l'interféron gamma, le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ , ...). Ces cytokines permettent la communication entre les différentes cellules du système immunitaire inné et permettent notamment le recrutement et l'activation des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs). [1, 2, 3]

### 1.1 Les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles

Les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) comptent parmi les globules blancs les plus abondants dans le sang. Ils représentent entre 50% et 70% des leucocytes circulant [6]. Leur taille est comprise entre 10 et 14  $\mu\text{m}$ . Ces globules blancs doivent leur nom, d'une part, à leur noyau plurilobé qui peut avoir des formes variables et, d'autre part, aux granules contenus dans leur cytoplasme présentant une affinité avec les colorants neutres (figure 1.1). Ces granules contiennent des enzymes ayant des propriétés cytotoxiques et peuvent être classés en trois catégories. [7]

- Les granules primaires (ou azurophiles) contiennent une peroxydase appelée myéloperoxydase ainsi que d'autres protéines comme des élastases, des défensines, des cathépsines, ... Il s'agit des premiers granules formés dans les PMNs, déjà au stade myéloblaste (première cellule de la lignée myéloïde granulocytaire).

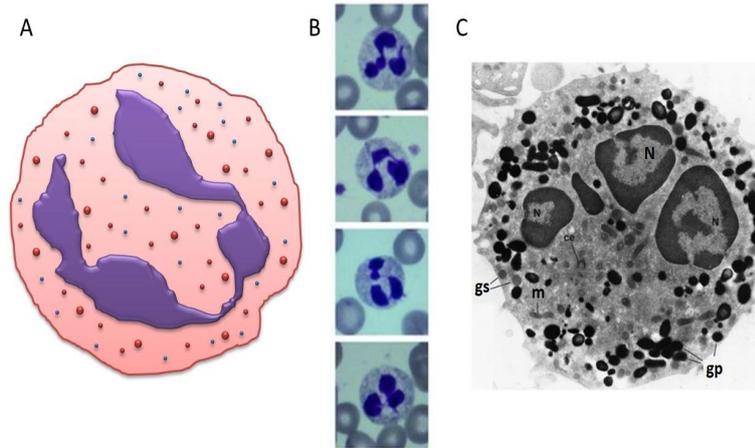


FIGURE 1.1 – A. Schéma d'un leucocyte polymorphonucléaire neutrophile (PMN), avec son noyau plurilobé et ses granules cytoplasmiques. B. PMNs humains par microscopie optique (Image originale de Fingerhut et al. [4]). C. PMN humain par microscopie électronique (N : noyau, gp : granule primaire, gs : granule secondaire, m : mitochondrie) (Image originale de Witko-Sarsat et al. [5]).

- Les granules secondaires (ou spécifiques) contiennent des substances antimicrobiennes, des lysozymes, de la collagénase, de la lactoférine, des cathélicidines, de la transcobalamine 1 et des protéines membranaires. Ces granules sont plus petits que les granules primaires et sont également plus nombreux dans le cytoplasme.

- Les granules tertiaires (ou granules à gélatinase) contiennent des enzymes comme des gélatinases, capables de dégrader les tissus en hydrolysant le collagène.

Les PMNs circulent dans le sang avec une durée de vie variant entre environ 8 et 12h [1, 6]. Ils sont attirés au niveau du site inflammatoire par chimiotactisme. En effet, les cellules de la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins sont activées par les cytokines pro-inflammatoires, appelées chémokines, et libèrent des molécules d'adhésion (P-sélectine, E-sélectine). Les PMNs vont interagir avec ces enzymes et adhérer aux cellules de l'endothélium [1]. Les PMNs vont alors ramper et rouler le long de l'endothélium et traverser la paroi des vaisseaux sanguins par diapédèse, afin d'atteindre le site inflammatoire (figure 1.2) [8].

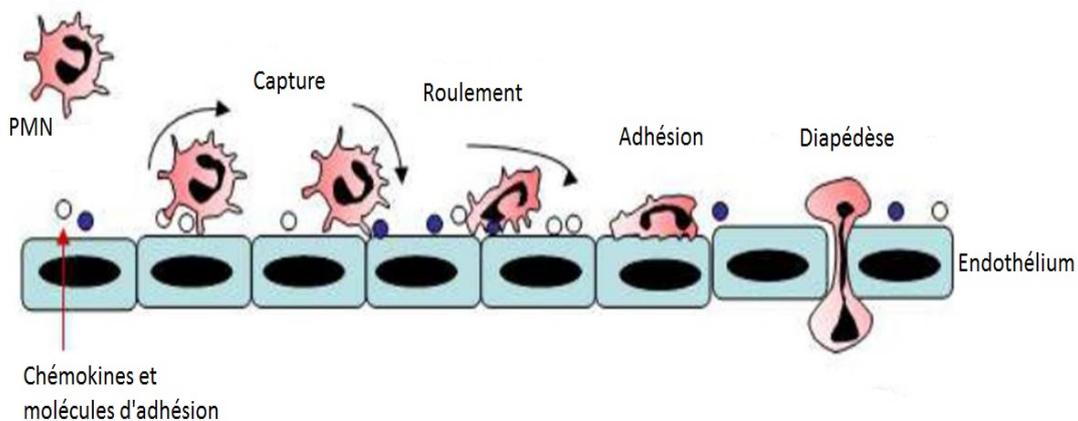


FIGURE 1.2 – Schéma de la migration des PMNs à travers la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins. (Image originale de S. Lakbakbi [8])

### 1.1.1 Phagocytose, dégranulation et formation du NET

Au niveau du site inflammatoire, les PMNs déclenchent différents mécanismes (figure 1.3) pour piéger et éliminer les sources de la réponse inflammatoire (agents pathogènes, cellules cancéreuses, débris cellulaires).

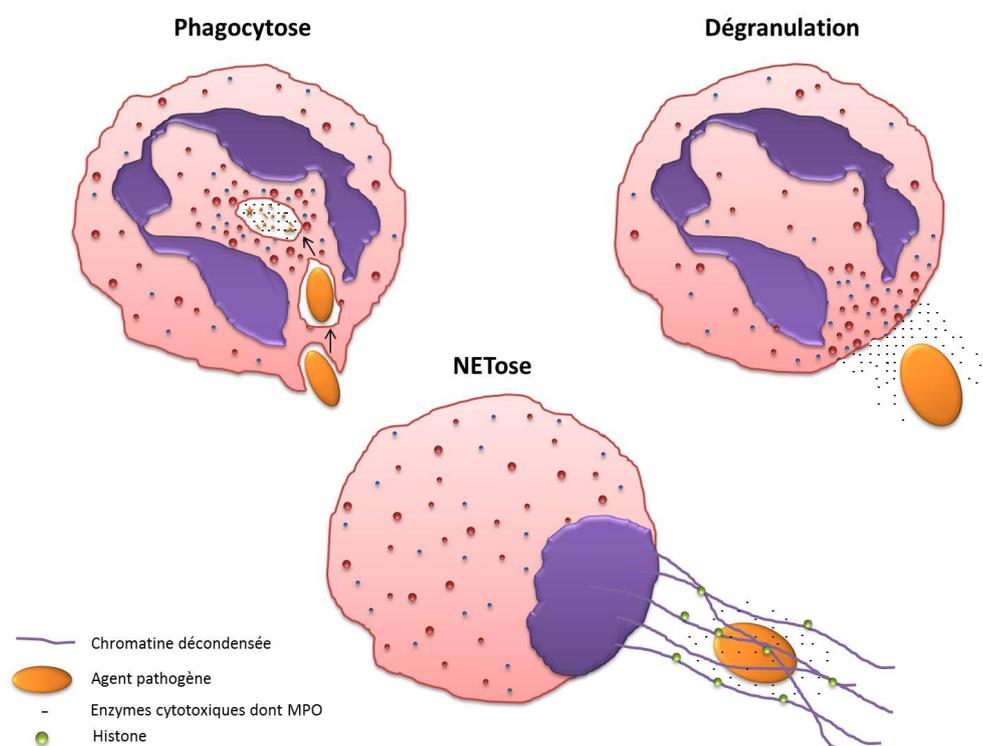


FIGURE 1.3 – Schéma des trois mécanismes d'élimination des agents pathogènes par les PMNs : phagocytose, dégranulation et nêtose. (Image inspirée de Gierlikowska et al. [1])

Le premier mécanisme est la phagocytose, non spécifique, des micro-organismes tels que les microbes, les cellules mortes et les débris cellulaires [9, 10]. Il existe deux mécanismes pour l'internalisation de l'élément cible (figure 1.4). Le premier, appelé mécanisme Zipper, est celui privilégié pour la phagocytose. Il nécessite l'interaction entre les nombreux récepteurs présents au niveau de la membrane des PMNs et des ligands situés à la surface de l'agent pathogène ciblé. Cette interaction séquentielle entre les récepteurs et les ligands permet d'entourer étroitement l'agent à phagocyter en guidant progressivement le déploiement de la membrane du PMN [1, 9, 11]. Le second mécanisme, appelé macropinocytose, permet de phagocyter des bactéries du type *Salmonelle* ou *Shigella*. Celles-ci sécrètent des substances qui, une fois reconnues par le PMN, induisent la transduction de signaux intracellulaires provoquant la formation de protusions membranaires de façon non spécifique autour de l'élément. Cela se fait grâce à la polymérisation de l'actine et à la réorganisation du cytosquelette de la cellule [1, 9, 11]. Quel que soit le mécanisme, l'élément infectieux est emprisonné dans une vésicule appelée phagosome, après la reformation de la membrane plasmique du PMN.

Par la suite, la maturation du phagosome repose sur la fusion des granules lysosomiaux et la libération de leur contenu d'enzymes protéolytiques et hydrolytiques pour former ainsi le phagolysosome. Ce mécanisme s'appelle la dégranulation. La libération du contenu des granules se produit de façon séquentielle : granules tertiaires, secondaires et pour finir primaires. Les granules peuvent également fusionner avec la membrane plasmique du PMN et provoquer une libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Cela permet notamment d'atta-

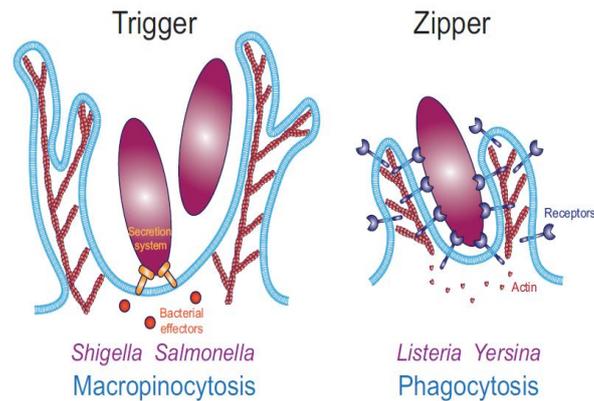


FIGURE 1.4 – Mécanismes de phagocytose de micro-organismes pathogènes par les PMNs : macro-pinocytose et mécanisme Zipper. (Image originale de Jaumouille et al. [9])

quer et de dégrader les organismes trop volumineux pour être phagocytés, ou encore d'éliminer des tissus lésés. Cependant, la dégranulation extracellulaire est à double tranchant car elle peut provoquer la dégradation de tissus sains environnants [1, 12, 13]. Le déplacement des granules vers la membrane plasmique se fait grâce au cytosquelette d'actine. Cela se poursuit par l'attache des granules à la face interne de la bicouche lipidique membranaire et la fusion complète des granules avec la membrane. La translocation et la fusion des granules requièrent l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), via les canaux calciques, et l'hydrolyse d'ATP et de GTP [12].

L'interaction des PMNs avec des molécules stimulatrices (cytokines, formyl peptide (fMLP), phorbol myristate acétate (PMA), ...) induit la phagocytose et la dégranulation [14, 15]. Or, un troisième mécanisme, appelé nêtose, a également été identifié. En effet, certaines cytokines comme l'interleukine-8, provoquent la libération dans le milieu extracellulaire du NET (Neutrophil Extracellular Trap), composé de chromatines décondensées formant un complexe avec des protéines granulaires et cytoplasmiques (histones, myéloperoxydase, élastase,...). Le NET permet la séquestration des agents pathogènes et empêche leur accumulation et dissémination. Les protéines cytotoxiques permettent leur dégradation [1, 16, 17, 18].

## 1.1.2 La flambée respiratoire

La libération du contenu des granules dans le phagosome ou le milieu extracellulaire est accompagnée d'une augmentation de la consommation en oxygène, appelée flambée respiratoire. L'oxygène consommé permet de générer des espèces activées de l'oxygène (ROS). Celles-ci sont subdivisées en deux catégories, la première étant celle des radicaux libres, c'est-à-dire des molécules ou ions contenant un ou plusieurs électrons non appariés, comme l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ). La seconde catégorie comprend des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ) et le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). [19, 20]

### 1.1.2.1 La NADPH oxydase

Lors de la flambée respiratoire, le complexe protéique NADPH oxydase joue un rôle clé. En effet, il catalyse l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en  $\text{NADP}^+$ . L'électron ainsi libéré réduit l'oxygène en anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) [20, 21, 22] :



La NADPH oxydase est un complexe enzymatique situé dans la membrane plasmique d'un grand nombre de cellules (leucocytes neutrophiles et éosinophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, ...). L'ensemble des enzymes de type NADPH oxydase sont reprises sous le terme NOX. Le complexe se trouvant dans les cellules phagocytaires (dont les PMNs) est appelé NOX2. Il est composé de l'assemblage de six éléments distincts. Deux sous-unités protéiques membranaires (p22<sup>phox</sup> et Gp91<sup>phox</sup>) forment un hétérodimère, un flavocytochrome, appelé cytochrome b<sub>558</sub>. Quatre composants (p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et Rac2) se trouvent quant à eux initialement dans le cytoplasme.

La NADPH oxydase peut se trouver dans différents états. Le premier est l'état de repos, retrouvé dans les PMNs circulant dans le sang et dans lesquels les différents éléments du complexe sont disséminés entre la membrane et le cytoplasme. Le complexe protéique est donc inactif. Ensuite, l'activation des PMNs par des cytokines (Il-8, TNF $\alpha$ ,...) ou des agents comme le fMLP ou le PMA va provoquer l'amorçage de la formation du complexe protéique (figure 1.5). L'état activé est atteint lorsque l'ensemble des protéines est assemblé et peut dès lors induire l'oxydation du NADPH cytosolique [20, 23, 24, 25, 26, 27].

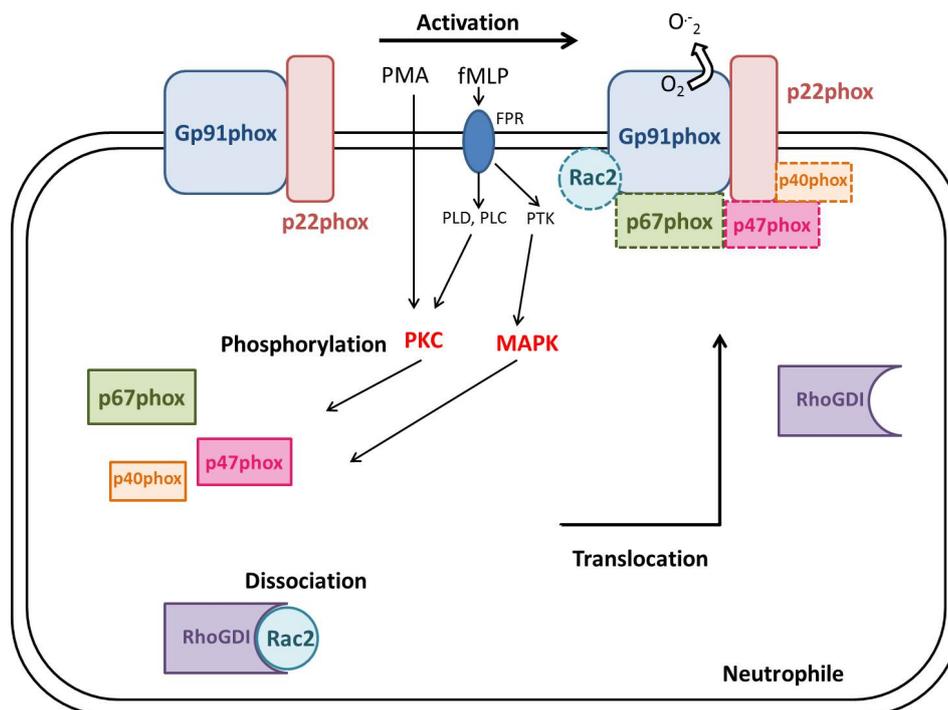


FIGURE 1.5 – Activation du complexe NADPH oxydase par le fMLP ou le PMA. Le PMA traverse la membrane plasmique et peut activer directement les isoformes de la protéine kinase C (PKC) et des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK). Le fMLP, quant à lui, se lie aux récepteurs du formyl-peptide (FPR) provoquant une cascade de mécanismes, comme l'activation des phospholipides D (PLD) et C (PLC) et des protéines tyrosine kinase (PTK). Ces phospholipides et protéines vont activer les PKC et les MAPK. Ces kinases vont phosphoryler les sous-unités cytosoliques p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et p47<sup>phox</sup>. Celles-ci vont migrer vers la membrane plasmique et s'associer aux sous-unités membranaires p22<sup>phox</sup> et Gp91<sup>phox</sup>. Le complexe NADPH oxydase activé va ensuite catalyser la formation d'anions superoxydes à partir de l'oxygène moléculaire. Image basée sur les schémas de Vermot et al. [23] et Belambri et al. [24]

L'activation du complexe NADPH oxydase nécessite la phosphorylation de l'ensemble des sous-unités et la translocation, c'est-à-dire le déplacement, des protéines cytosoliques vers le cytochrome  $b_{558}$  dans la membrane. En effet, l'activation du PMN va induire différentes voies d'activation intracellulaire déclenchant l'activation de kinases (PKC, MAPK) (figure 1.5). Ces protéines vont catalyser la phosphorylation des sous-unités de la NADPH oxydase. Les kinases vont phosphoryler des sérines au niveau du  $p47^{phox}$  afin de révéler le site de liaison SH3 et permettre sa translocation vers la membrane et sa liaison avec le  $p22^{phox}$ . Cela favorise également l'attachement des deux sous-unités  $p40^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ , elles aussi préalablement phosphorylées pour dévoiler leur site de liaison au complexe, et plus précisément au  $Gp91^{phox}$ . Cette sous-unité est également phosphorylée pour favoriser sa liaison avec les différentes autres sous-unités. L'activation du PMN provoque également la dissociation du complexe protéique Rac2GDP-RhoGDI provoquant la libération du Rac2, une petite protéine qui vient se lier au  $Gp91^{phox}$  et au  $p67^{phox}$ . L'assemblage de l'ensemble des sous-unités est nécessaire pour permettre le fonctionnement du complexe protéique et maintenir sa stabilité.[20, 23, 24, 25, 26, 28]

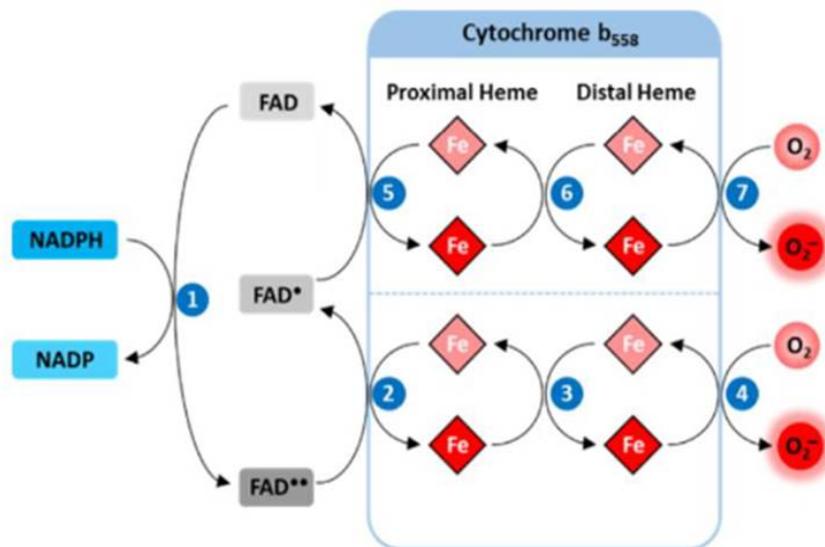


FIGURE 1.6 – Mécanisme du transfert d'électrons catalysé par la sous-unité membranaire  $Gp91^{phox}$ , afin de produire l'anion superoxyde à partir du substrat NADPH. Le NADPH transfère deux électrons au FAD, le réduisant en  $FADH_2$ . Les électrons sont transférés en trois phases, successivement à l'hème proximal, à l'hème distal et pour finir à une molécule d'oxygène afin de former l'anion superoxyde. A partir d'une molécule de NADPH, deux molécules d'anion superoxyde sont formées. (Image originale de Vermot et al. [23])

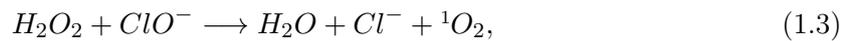
Le flavocytochrome  $b_{558}$  est le centre catalytique du complexe protéique. Le  $Gp91^{phox}$  est inséré dans la membrane et permet le transfert d'électrons entre le NADPH cytosolique et l'oxygène présent dans le phagosome ou le milieu extracellulaire. Il est composé de six hélices insérées dans la membrane. La troisième et la cinquième hélice contiennent deux structures hémiques avec un noyau de fer en leur centre. La partie cytosolique de la protéine présente le site de liaison pour le FAD (flavine adénine dinucléotide) et la NADPH. Le transfert transmembranaire d'électrons peut être décomposé en sept étapes représentées sur la figure 1.6. Dans un premier temps, le NADPH réduit le FAD en  $FADH_2$ . Ensuite le  $FADH_2$  cède un électron à l'hème proximal (celui le plus proche du cytoplasme) et devient un radical semiquinone. L'électron est ensuite transféré vers l'hème distal et est cédé ensuite à l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Après avoir cédé son électron, l'hème proximal est à nouveau disponible pour oxyder une seconde fois le radical semiquinone en FAD et produire à nouveau l'anion superoxyde. [20, 23, 24, 25, 26]

### 1.1.2.2 La production de ROS

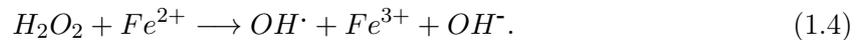
L'anion superoxyde est le précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène dans le phagosome comme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  :



La dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène peut être soit spontanée, soit catalysée par une métalloprotéine, la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène peut alors également réagir avec d'autres composés pour donner notamment l'oxygène singulet  $^1O_2$  :



et le radical hydroxyle, grâce à la présence d'ions métalliques comme l'ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ) via la réaction de Fenton :



Ces espèces activées de l'oxygène sont très réactives, notamment les radicaux libres en raison de leur instabilité et du besoin d'associer leur électron non apparié. Elles vont entrer en jeu lors de la destruction des micro-organismes en induisant des dommages oxydatifs. C'est le cas, par exemple, de l' $H_2O_2$  qui possède un pouvoir bactéricide direct mais qui est également le substrat naturel d'enzymes, les peroxydases, comme la myéloperoxydase. Ainsi, il permet sous l'action catalytique de ces enzymes de générer des composés oxydants puissants. Quant à l'anion superoxyde, en plus de donner le peroxyde d'hydrogène, il réagit dans le phagolysosome avec des radicaux nitroxyles (oxyde nitrique)  $NO\cdot$  produits par la NO synthase et forme le peroxyde nitrite  $ONOO^-$ , espèce réactive de l'azote [29] :



Les ROS et leurs produits jouent donc un rôle essentiel dans les mécanismes de défense immunitaire. Les phospholipides et les protéines composant les membranes plasmiques des bactéries ou des virus sont les premières cibles des espèces activées de l'oxygène. En effet, celles-ci peuvent par exemple, provoquer la peroxydation lipidique, c'est-à-dire l'oxydation des chaînes d'acides gras insaturés formant les phospholipides. Le lipide qui se retrouve ainsi à l'état radicalaire, peut alors réagir avec du dioxygène afin de former un radical peroxyde ( $OO\cdot$ ), qui va à son tour oxyder les protéines transmembranaires. Les ROS peuvent également oxyder les protéines et, plus précisément, certains acides aminés privilégiés (acides aminés soufrés : cystéine, méthionine ; et acides aminés aromatiques : tyrosine, tryptophane, phénylalanine), menant à des dommages irréversibles. L'altération de ces protéines et lipides provoque des effets néfastes sur les organismes touchés. En effet, cela entraîne la modification de la perméabilité membranaire ou encore la destruction des protéines de transport permettant l'échange d'ions et de molécules entre les milieux intra- et extracellulaires, nécessaires à la survie des organismes. Les oxydants puissants comme le peroxyde nitrite, peuvent également induire des dommages aux molécules d'ADN en les fragmentant. [30, 31]

## 1.2 La myéloperoxydase

Compte tenu du grand nombre d'enzymes cytotoxiques contenues dans leurs granules, les PMNs disposent, en plus du système de production d'espèces réactives de l'oxygène, de plusieurs autres systèmes producteurs d'espèces oxydantes essentielles à la défense immunitaire innée. La myéloperoxydase (MPO) constitue l'un d'eux. En effet, elle est présente en grande

concentration (2 à 5 % en poids) dans les granules primaires et est, par conséquent, l'enzyme la plus abondante dans les PMNs. [32, 33, 34, 35]

L'ensemble des peroxydases animales sont reprises dans la superfamille des "peroxydase-cyclo-oxygénases". Celle-ci est divisée en sept familles dont celle des "Chordata peroxydases" comprenant la myéloperoxydase, ainsi que la lactoperoxydase et l'éosinophile peroxydase. [36, 37] Ces enzymes jouent un rôle antimicrobien important dans le processus inflammatoire en produisant des espèces radicalaires via leurs activités peroxydasiques et d'halogénéation. Leur activité est également étroitement liée à la production de ROS. [32, 34, 35]

### 1.2.1 Structure de l'enzyme

Le précurseur de l'enzyme est une protéine de 75 à 80 kDa, N-glycosylée dans le réticulum endoplasmique pour former une apoproMPO de 90 kDa. Cette forme est inactive. C'est également dans le réticulum endoplasmique que l'apoproMPO incorpore un groupe prosthétique hémique pour donner la proMPO de 90 kDa. Celle-ci sort du réticulum et se trouve alors dans un compartiment pré-granulaire où elle est transformée dans la forme mature de l'enzyme. [34, 37]

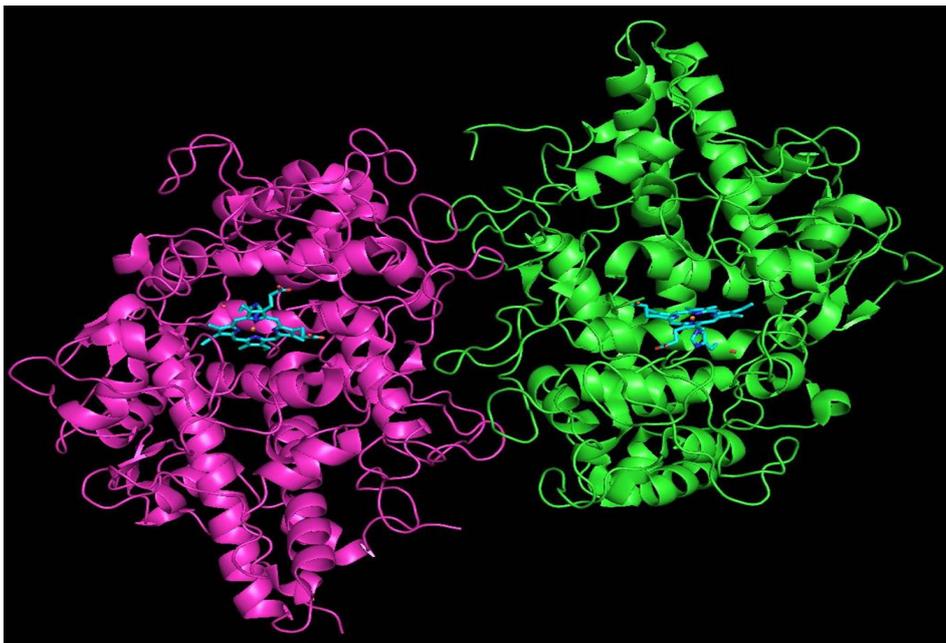


FIGURE 1.7 – Structure dimérique de la myéloperoxydase. Chaque monomère (vert et rose) contient un hème (bleu) avec en son centre un atome de fer coordonné avec les quatre atomes d'azote de la porphyrine et deux histidines, l'une proximale et l'autre distale. (PDB : 4C1M [38])

La MPO est un homodimère symétrique formé de deux hémi-enzymes identiques et indépendantes du point de vue fonctionnel, contenant chacune un hème et reliées par un pont disulfure. Les hèmes sont distants de 50 Å. Chaque hémi-enzyme est composée de deux sous-unités. La première est une chaîne légère de 15 kDa tandis que la seconde est une chaîne lourde et glycosylée dont le poids moléculaire varie entre 59 et 64 kDa. Le poids moléculaire total de l'enzyme est compris entre 120 et 150 kDa (figure 1.7). [34]

L'hème, qui est un dérivé de la protoporphyrine IX, contient en son centre un atome de fer à l'état d'oxydation +III ( $\text{Fe}^{3+}$ ). A l'état fondamental, le fer est à l'état *high spin* (voir

annexe E, E.3.3). A pH neutre, le noyau de fer forme un complexe hexacoordonné avec les quatre atomes d'azote de la porphyrine et deux histidines, une proximale (His 336) et une distale (His 95). L'histidine proximale est liée de façon covalente au fer et l'histidine distale est reliée par ponts hydrogène via une molécule d'eau. La spectroscopie Raman [39] a montré qu'à pH acide, inférieur à 3, le fer perd son sixième ligand, suite à la protonation de l'histidine distale. La perte de cette liaison entraîne une diminution de la contrainte sur l'hème. L'hème est associé de façon covalente au reste de l'enzyme, en plus de la liaison par l'histidine 336. En effet, la myéloperoxydase présente deux liaisons ester entre les carbones des groupements méthyles 1 et 5 des cycles pyrroles A et C de l'hème et les acides aminés glutamate (Glu242) et aspartate (Asp94). La MPO est la seule enzyme qui présente également une liaison ionique sulfonium entre l'atome de soufre de l'acide aminé méthionine (Met 243) et le carbone  $\beta$  du groupe vinyle du cycle pyrrole A. Du fait des contraintes associées aux liaisons, la porphyrine de la MPO est non-planaire. En effet, sa structure est distordue. Les cycles pyrroles A et C sont légèrement orientés vers le côté distal, induisant une structure arquée de la porphyrine et déplaçant le noyau de fer au-dessus du plan de l'hème. La liaison sulfonium serait associée à l'activité d'halogénéation de l'enzyme, propriété exclusive de celle-ci [34, 39, 40, 41, 35].

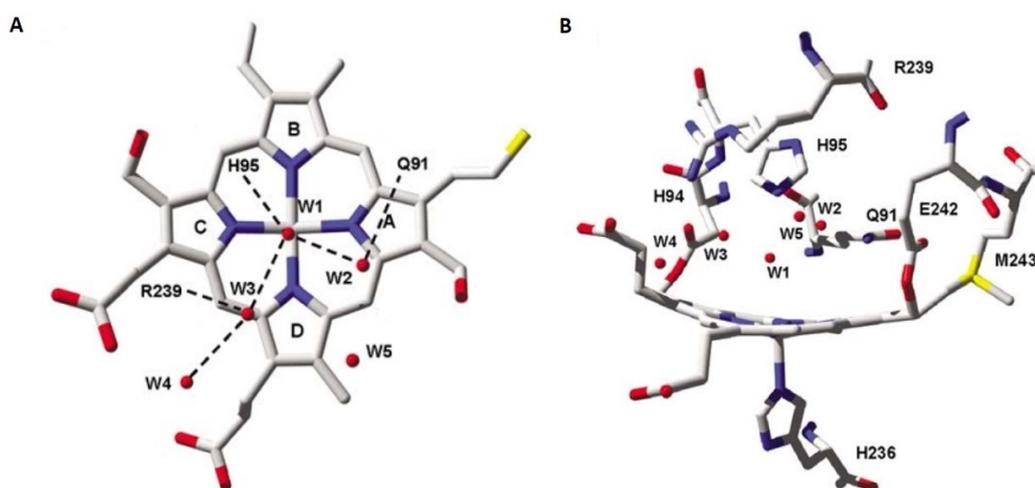


FIGURE 1.8 – Représentation du réseau de molécules d'eau au sein du site actif de la MPO : A. Vision du dessus de l'hème avec la représentation des ponts hydrogène entre les molécules d'eau B. Vision latérale du site actif montrant notamment la courbure du plan de l'hème et la liaison ionique sulfonium avec la méthionine (Met 243). Image originale de Malle et al. [41]

Le site actif de l'enzyme est constitué de la structure hémique et d'acides aminés (histidine distale (His 95), arginine (Arg 239) et glutamine (Glu 102)). L'histidine distale et le résidu arginine de l'apoprotéine jouent un rôle essentiel lors de l'interaction entre l'enzyme et son substrat naturel  $H_2O_2$ . Le site actif est situé à la base d'une cavité, appelée poche hémique, d'environ 15 Å de profondeur et 10 Å de diamètre. Un canal hydrophobe forme la jonction entre cette cavité et la surface de l'enzyme. La disposition du site actif ainsi que du canal ne permet que l'accès de molécules de petites tailles, inférieures ou légèrement supérieures à un dipeptide [42, 43, 41]. La poche hémique contient un réseau de cinq molécules d'eau reliées entre elles par ponts hydrogène (figure 1.8). La présence de ces molécules libres rigidifie la zone hémique distale. La faible mobilité des molécules d'eau semble jouer un rôle essentiel dans le positionnement et la fixation de petits substrats anioniques comme le  $Cl^-$ , ainsi que l'incorporation de l'atome d'oxygène pour former l'acide hypochloreux (voir section 1.2.2.1). [41, 44, 45, 46, 47, 35]

### 1.2.2 Activité oxydante de l'enzyme

Lorsque la MPO est libérée dans le phagolysosome ou dans le milieu extracellulaire, son rôle majeur est de catalyser l'oxydation de substrats grâce à ses cycles d'halogénéation et de peroxydase en consommant son substrat naturel, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), produit par la NADPH oxydase (figure 1.9). L'action oxydante de la MPO dépend d'un grand nombre de facteurs tels que la production de l' $H_2O_2$ , la concentration en substrats et le pH.

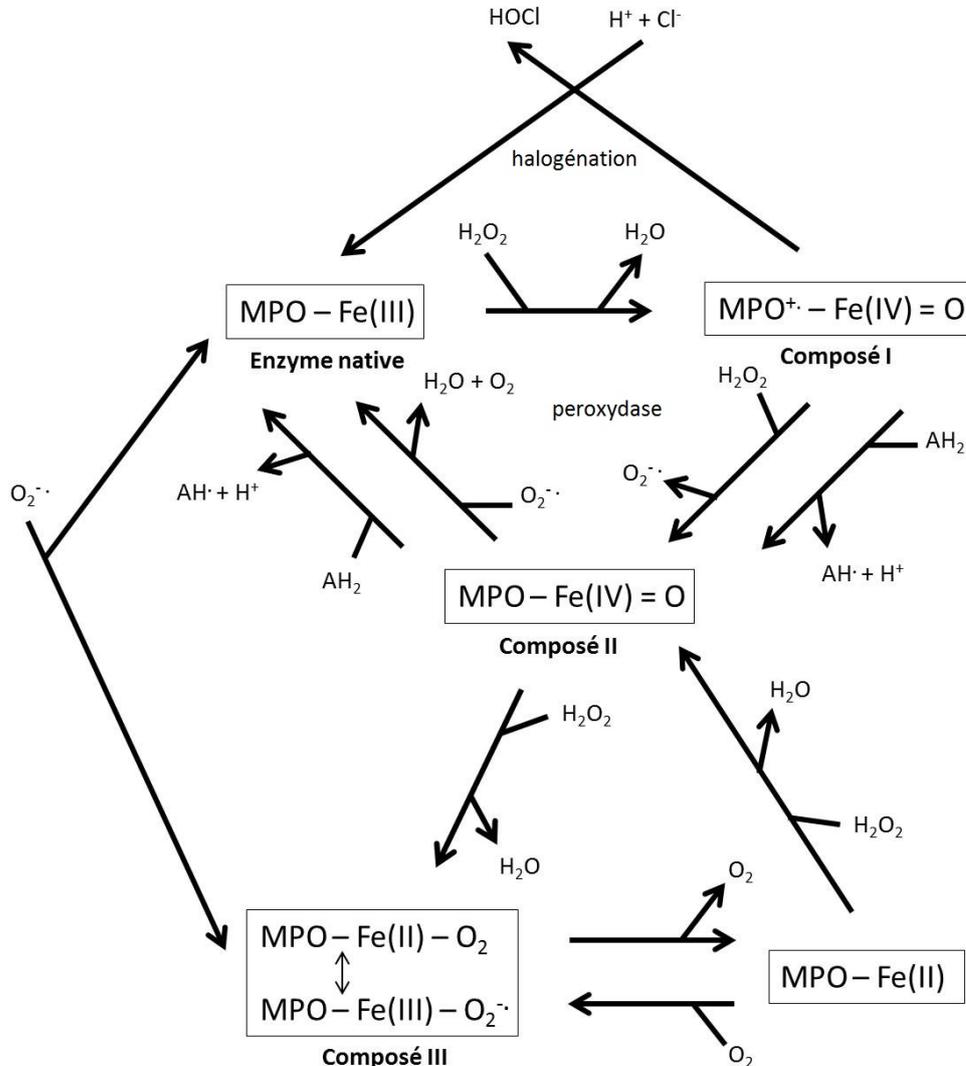


FIGURE 1.9 – Schéma des cycles de peroxydase et de chloration de la myéloperoxydase (MPO).

#### 1.2.2.1 Cycle d'halogénéation

L'activité principale de la MPO consiste à catalyser l'oxydation des ions halogénures ( $Cl^-$ ,  $Br^-$  et  $I^-$ ) et pseudohalogénures ( $SCN^-$ ) pour produire les acides hypohalogénés associés : l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ), l'acide hypobromeux ( $HOBr$ ), l'acide hypoiodéux ( $HOI$ ) et l'acide hypothiocyanique ( $HOSCN$ ), composés extrêmement oxydants.

L'enzyme native, notée  $MPO-Fe(III)$ , peut réagir avec le  $H_2O_2$  afin de former le composé I, un cation radicalaire  $MPO^+-Fe(IV)=O$ , par une double oxydation (1). Le  $H_2O_2$  réagit directement au niveau du site actif de l'enzyme, afin de donner un atome de fer dans l'état

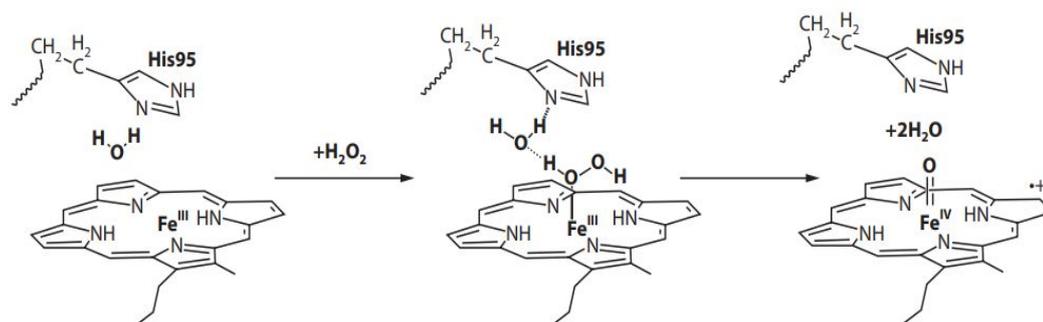
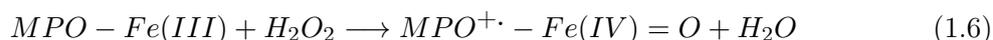
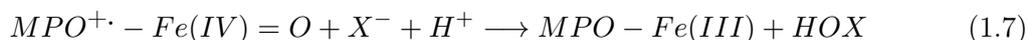


FIGURE 1.10 – Positionnement du peroxyde d'hydrogène dans le site actif de la MPO permettant la formation du composé I. Le peroxyde d'hydrogène se lie par pont hydrogène avec l'histidine 95 via une molécule d'eau. Image originale de L. V. Forbes et A. J. Kettle [45]

d'oxydation IV sur lequel est lié un atome d'oxygène par une double liaison. Pour y parvenir, la molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$  se lie au niveau du site actif à l'aide de deux acides aminés, l'His95 et l'Arg239 (figure 1.10). La partie radicalaire de ce composé est localisée sur la structure porphyrique. Cette forme radicalaire de la MPO est extrêmement réactive et possède, par conséquent, une courte durée de vie. En effet, le composé I possède un temps de demi-vie d'environ 100 ms. [32, 45, 48, 49, 50, 51]



Le composé I peut catalyser l'oxydation à deux électrons des ions halogénures  $\text{X}^-$  en acide hypohalogéneux HOX, et redonner l'enzyme native (2) :



L'activité d'halogénéation est une caractéristique unique de la MPO. Cette propriété est liée à la présence d'une liaison ionique sulfonium entre la Met 243 et le groupement vinyle du cycle pyrrole A de l'hème. La charge positive de l'atome de soufre de la Met 243 déstabilise électrostatiquement l'hème ferrique. En effet, l'effet attracteur d'électrons de la liaison diminue la densité électronique du noyau de fer. Cet effet est accentué par la distorsion du plan de l'hème via ses liaisons avec l'apoprotéine. Tous ces phénomènes influencent les potentiels redox des différents couples de composés de l'enzyme et donnent des valeurs positives :

- $E^0$  (composé I/enzyme native (FeIII)) = 1,16 V
- $E^0$  (composé II/composé I) = 1,35 V
- $E^0$  (enzyme native (FeIII)/composé II) = 0,97 V
- $E^0$  (enzyme native (FeIII)/(FeII)) = 5 mV

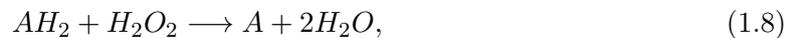
contrairement aux autres types de peroxydases. Effectivement, les potentiels redox des couples acide hypohalogéneux/ion halogénure sont inférieurs au potentiel du couple composé I/enzyme native (FeIII) ( $E^0$  (HOCl/ $\text{Cl}^-$ ) = 1,08 V,  $E^0$  (HOBr/ $\text{Br}^-$ ) = 0,93 V et  $E^0$ (HOI/ $\text{I}^-$  = 0,57 V, à pH 7), ce qui permet l'oxydation des ions halogénures. De plus, la présence du réseau rigide de molécules d'eau dans la poche hémique distale aide l'interaction entre les ions halogénures et le composé I. En effet, les ions se lient à l'oxygène du centre oxoferryle en se substituant à

une molécule d'eau. [39, 40, 46, 47, 52, 53]

L'ion halogénure le plus présent dans le plasma est l'ion chlorure (100-140 mM) ( $\text{Br}^-$  (20-100  $\mu\text{M}$ ) et  $\text{I}^-$  (0,1-0,6 $\mu\text{M}$ )). Le  $\text{Cl}^-$  étant le substrat favorable pour le composé I, on parle principalement de cycle de chloration qui produit l'acide hypochloreux HOCl [54]. Le HOCl représente l'espèce oxydante la plus puissante générée par les PMNs. Il interagit avec de nombreux composés chimiques présents dans le phagolysosome ou le milieu extracellulaire, selon plusieurs voies réactionnelles, afin de former des composés réactifs comme des ROS ou des RNOS. Le HOCl interagit notamment avec l'anion superoxyde pour donner une autre espèce réactive de l'oxygène, le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ). Le HOCl forme également des espèces nitrantes en réagissant avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ). L'HOCl peut aussi interagir avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Mallet pour former l'oxygène singulet. Le HOCl permet d'oxyder mais aussi de chlorer des molécules biologiques composant les bactéries ou les virus. Il réagit avec les atomes d'azote et de soufre des molécules organiques de l'environnement, comme des protéines, contenant des acides aminés méthionines, cystéines ou des groupements thiols, amines, amides [35, 55, 56, 57]. L'HOCl peut également interagir avec des bases nucléiques pour former des composés halogénés stables comme la 5-chlorocytosine ou le 5-chlorouracile, marqueurs de la dégradation de l'ADN au niveau des sites inflammatoires [58, 59].

### 1.2.2.2 Cycle de peroxydase

La MPO fait partie des peroxydases, des enzymes qui catalysent l'oxydation de substrats donneurs d'électrons, notés  $\text{AH}_2$ , par le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction du type



où  $\text{H}_2\text{O}_2$  joue le rôle d'oxydant et  $\text{AH}_2$  le rôle de réducteur, selon un processus en trois étapes [34, 41].

L'enzyme native, notée MPO-Fe(III), réagit avec le peroxyde d'hydrogène afin de former le composé I, un radical cationique  $\text{MPO}^{+\cdot}\text{-Fe(IV)=O}$  (équation 1.6). Le composé I peut ensuite réagir avec un substrat réducteur ( $\text{AH}_2$ ), pour donner le composé II, MPO-Fe(IV)=O, par un mécanisme de transfert d'un seul électron (3). Le substrat oxydé se retrouve alors à l'état radicalaire  $\text{AH}\cdot$ .



Selon la nature du substrat intervenant dans le cycle, différentes espèces radicalaires  $\text{AH}\cdot$  sont formées et peuvent également intervenir dans la destruction des micro-organismes étrangers. Le composé II est, quant à lui, stable et non radicalaire. Enfin, le composé II, présentant également un pouvoir oxydant, peut réagir avec un substrat du type  $\text{AH}_2$  et donc revenir à la forme native de l'enzyme (4).



Le fer à l'état ferryl (Fe(IV)) retourne à son état ferrique (Fe(III)). Ce cycle est appelé cycle de peroxydase (figure 1.9) et se répète tant que l'enzyme se trouve en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un substrat réducteur. Ce cycle n'est pas exclusif à la MPO mais existe pour d'autres peroxydases comme la peroxydase de Raifort ou *horseradish peroxidase* (HRP). Le cycle catalyse l'oxydation d'un grand nombre de substrats réducteurs tels que les

nitrites, la tyrosine, l'ascorbate, etc. Les radicaux ainsi formés peuvent à leur tour provoquer l'oxydation de molécules biologiques d'intérêt, comme des phospholipides composant les membranes cellulaires [34], ou la nitration des résidus de protéines via des tyrosines, tryptophanes,... [35, 60, 61] Le peroxyde d'hydrogène est également capable de jouer le rôle de substrat réducteur dans le cycle. En effet, le composé I peut aussi réagir avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former le composé II et produire une espèce réactive de l'oxygène, l'anion superoxyde, qui a la capacité d'induire par différentes voies réactionnelles, la formation d'autres ROS. De même, l'anion superoxyde peut réagir avec le composé II pour reformer l'enzyme native.

L'enzyme native est capable également de réagir avec un composé réducteur, comme l' $\text{O}_2^-$ , pour former le composé III (5). Cette transformation est réversible. Ce composé III est un équilibre entre l'enzyme, dont l'hème contient un atome de fer à l'état d'oxydation +2 associé à une molécule de dioxygène, et l'enzyme native associée à l'anion superoxyde. Ce composé III peut également apparaître suite à l'interaction du composé II avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (6). Enfin, en présence de dioxygène, le composé III a aussi la possibilité de donner une autre forme de l'enzyme dont l'atome de fer est à l'état ferreux (+2) (7). Celui-ci peut reformer le composé II en réagissant avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (8). Le composé III a été détecté aussi bien dans le phagosome des PMNs que dans le milieu extracellulaire. Ce composé catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en di- et tri-tyrosine et de différents phénols en leur forme hydroquinone. [32, 34, 48]

Bien qu'étant le substrat naturel de la myéloperoxydase, le peroxyde d'hydrogène peut, lorsqu'il est en excès, agir comme inhibiteur suicide de l'enzyme. Effectivement, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec le composé III et former des espèces réactives (oxygène singulet, radical hydroxyle) qui vont détruire l'hème et inactiver l'enzyme. [62]

### 1.2.2.3 Influence du pH sur l'activité de l'enzyme

Comme évoqué précédemment, la MPO possède une activité de chloration et de peroxydase. L'affinité du composé I, commun aux deux cycles oxydants envers, d'une part, les ions halogénures pour le cycle de chloration et, d'autre part, les substrats réducteurs pour le cycle de peroxydase, dépend du pH du milieu et de la concentration en substrat. De façon générale, l'activité de chloration augmente lorsque le pH diminue alors que l'action de peroxydase est quasi constante de pH 5 à 8. [54]

Le pH des fluides biologiques est compris entre 7 et 7,4. Par conséquent, dans le milieu extracellulaire, la MPO fonctionne majoritairement via son activité peroxydasique et on n'observe qu'une faible concentration en HOCl. L'ajout d'un excès d'ions  $\text{Cl}^-$  (10 fois) par rapport aux substrats de peroxydase n'inhibe la peroxydation que de 30% à pH 7. Lorsqu'on diminue le pH à 6, une concentration physiologique (100-140 mM) de  $\text{Cl}^-$  inhibe totalement le cycle de peroxydase. Plus le pH diminue, plus la concentration nécessaire en  $\text{Cl}^-$  pour une inhibition totale diminue également. [51, 54, 63]

A pH acide, comme au sein du phagosome des PMNs ou dans certaines lésions inflammatoires, le cycle de chloration domine le cycle de peroxydase. A pH 5, une concentration en substrats réducteurs 100 fois plus élevée qu'à pH 7,4 est nécessaire pour inhiber totalement la chloration. A pH acide, l'affinité du composé I est dirigée vers les ions halogénures. L'interaction des ions avec l'enzyme est favorisée par la protonation de l'histidine distale du site actif, His 95. A pH acide, inférieur à 6, la protonation de l'histidine permet l'interaction entre l'acide aminé et la charge négative de l'ion et donne lieu à la liaison de celui-ci. [51, 54, 63]

#### 1.2.2.4 Rôle de l'anion superoxyde

L'anion superoxyde joue un rôle essentiel dans le processus inflammatoire. Etant produit par le complexe protéique NADPH oxydase (NOX2), l'anion superoxyde est le précurseur du substrat naturel de la MPO, le peroxyde d'hydrogène, essentiel au déclenchement de l'activité oxydante de l'enzyme. L'anion superoxyde peut lui-même servir de substrat pour la MPO. En réagissant avec l'enzyme native, il forme le composé III qui, lui-même, peut donner l'enzyme à l'état ferreux, inactive pour la production de HOCl (figure 1.9). L'anion superoxyde joue également le rôle d'un agent réducteur pour le composé II afin de régénérer l'enzyme native. Il peut donc jouer un rôle de stimulateur de l'activité catalytique de la MPO et notamment de la production de HOCl, en empêchant l'accumulation de l'état peu réactif qu'est le composé II. [64, 65]

#### 1.2.3 Cibles principales de la MPO

Du fait de ses activités d'halogénéation et de peroxydase, la MPO produit un grand nombre d'espèces oxydantes : HOCl, HOBr, HOI, HOSCN, NO<sup>•</sup>, ONOO<sup>-</sup>, ROS et radicaux. Ces espèces ont pour cible de nombreuses molécules biologiques composant les agents pathogènes et les tissus environnants (protéines, lipides, glycoprotéines, ADN, ARN,...).

Les acides aminés libres ainsi que ceux au sein de protéines sont les cibles principales. Ceux majoritairement oxydés par l'HOCl sont les méthionines et les cystéines. La lysine, le tryptophane, l'histidine, la tyrosine et les groupes aminés terminaux sont également touchés. Par exemple, la formation de 3-chloro-tyrosine est un marqueur spécifique de l'activité oxydante de la MPO. Le HOCl réagit avec les atomes d'azote et de soufre des molécules organiques comme les thiols, les thioéthers, les amines, les amides ou le glutathion. Le HOCl réagit rapidement avec les sucres aminés, même lorsqu'ils sont incorporés dans des glycoprotéines et des protéoglycanes. [35, 66, 56, 57, 67, 68, 69]

Au sein de l'ADN et de l'ARN, la MPO provoque des dommages menant à des ruptures simple ou double brin. L'HOCl peut réagir avec des bases nucléiques pour former des composés halogénés stables comme la 5-chlorocytosine ou le 5-chlorouracile. [58, 59]

Grâce à son cycle de peroxydase, la MPO oxyde le nitrite NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former du NO<sub>2</sub>. Celui-ci provoque la nitration d'acides aminés tyrosine libres en nitrotyrosine. La tyrosine est également un substrat pour le cycle de peroxydase. Les radicaux tyrosyles formés peuvent à leur tour oxyder les groupements tyrosyles contenus dans des protéines et les lipides plasmiques. Le NO<sub>2</sub> est également impliqué dans le phénomène de peroxydation lipidique des lipoprotéines de basse densité (LDL). La MPO peut également oxyder des phénols pour former des radicaux phénoxylys. Le glutathion est également un bon substrat pour l'enzyme. Les radicaux formés peuvent provoquer l'oxydation de phospholipides composant la membrane des cellules. Le HOCl peut également réagir avec des acides gras insaturés et le cholestérol pour générer des hydroperoxydes lipidiques et des chlorhydrines de cholestérol. [35, 32, 33, 69, 70, 68, 71, 72, 73, 74]

#### 1.2.4 Sites d'action de la MPO

##### 1.2.4.1 Phagosome

Lors du phénomène de dégranulation, qui suit la phagocytose de l'agent pathogène par le PMN, les différents granules lysosomiaux fusionnent avec la paroi du phagosome et libèrent leur

contenu d'enzymes protéolytiques et hydrolytiques, dont la MPO. La concentration en MPO peut atteindre 1 mM dans le phagolysosome. [75] Le complexe protéique NADPH oxydase étant situé dans la membrane plasmique du neutrophile, il peut libérer sa production d'anions superoxydes au sein du phagosome. Ce phénomène permet le déclenchement de l'activité oxydante de la MPO et la destruction de l'agent pathogène [1, 23]. Des études montrent que le phagosome est caractérisé par un pH acide. A la suite de la phagocytose de l'agent pathogène, l'augmentation temporaire du pH intraphagosomal jusque 7,5-7,6 est suivie d'une chute du pH. Les valeurs atteintes varient entre 4,7 et 6. [54, 76, 77]

#### 1.2.4.2 Milieu extracellulaire

En plus d'être libérés dans le phagosome, une partie des granules dispersent leur contenu, et notamment la MPO, dans le milieu extracellulaire afin d'attaquer les organismes qui ne peuvent pas être phagocytés par les PMNs, comme des parasites ou des champignons. Environ 30% de la MPO se retrouve dans le milieu extracellulaire [78]. De plus, la phagocytose des agents pathogènes et leur destruction dans le phagolysosome provoquent la mort des PMNs. Celle-ci s'accompagne d'une libération de MPO dans le milieu extracellulaire. [32, 34, 54, 79]

La MPO libérée dans le milieu extracellulaire peut pénétrer la circulation sanguine et se lier fortement à la paroi vasculaire. En effet, la MPO va interagir avec la matrice extracellulaire des cellules endothéliales grâce à son caractère cationique [69, 35]. La matrice extracellulaire couvre la membrane plasmique des cellules et est composée de fibres de collagène et de glycoprotéines, les protéoglycanes, associées à des protéines et des chaînes de sulfate d'héparane. La MPO va venir se fixer au sulfate d'héparane. La rétention de la MPO au sein de cette matrice conduit ensuite à la migration de l'enzyme vers la région subendothéliale où elle est bloquée mais toujours active [80, 35]. Ce phénomène peut partiellement expliquer l'impact négatif de la MPO dans diverses pathologies inflammatoires [81, 82, 83].

### 1.3 Les pathologies inflammatoires

#### 1.3.1 Lien entre MPO, PMNs et pathologies

Les ROS jouent un rôle essentiel dans un grand nombre de mécanismes biologiques, comme la transduction du signal cellulaire, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ou encore les processus de défense immunitaire. Afin de contrôler la production de ces espèces réactives ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $HOCl$ ) ou de radicaux, les défenses antioxydantes permettent un équilibre entre leur production et leur destruction. Ces défenses sont constituées de systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase,...) et de molécules antioxydantes comme les vitamines A, C ou E, les polyphénols, le glutathion, les oligoéléments (sélénium), les protéines (ferritine), etc. Les molécules antioxydantes peuvent être produites soit directement par l'organisme soit être apportées grâce à l'alimentation. Les antioxydants permettent de diminuer, voire d'inhiber l'action oxydante des ROS, notamment en réduisant les radicaux. Ces réactions d'oxydoréduction génèrent l'état radicalaire de la molécule antioxydante, qui est plus stable et donc moins réactive. Les molécules antioxydantes à l'état radicalaire peuvent également s'associer pour former des composés non radicalaires. Certaines molécules antioxydantes peuvent aussi avoir une action directe sur les enzymes, par exemple la MPO, qui interviennent dans la production des ROS. [84, 85, 86, 87]

Une production excessive de ROS, incontrôlée par l'organisme, via une surstimulation du système immunitaire et/ou une défaillance des mécanismes antioxydants, induit un stress

oxydatif [88]. Celui-ci est impliqué dans diverses pathologies comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le cancer, l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde, la pyélonéphrite, les maladies inflammatoires digestives et respiratoires, les allergies,... [33, 89, 90, 91, 92, 93]. Les causes de la réponse inadaptée du système immunitaire sont multiples : inflammation aiguë non traitée, génétique, exposition prolongée à diverses substances (polluants, alcool, fumée de tabac, produits chimiques irritants,...), stress, maladie auto-immune,... La famille des NADPH oxydases (NOX) est la source principale de ROS dans l'organisme dans le cas de l'inflammation aiguë, tandis que la mitochondrie représente la source prépondérante en situation chronique [94]. Les NOX se situent dans la membrane des cellules phagocytaires, comme les PMNs notamment. Les pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques sont associées à une infiltration et une accumulation de PMNs dans les tissus. La surstimulation des PMNs provoque la libération importante de ROS dans le milieu extracellulaire, accompagnée d'une libération excessive de MPO. Comme évoqué précédemment, la MPO libérée va se fixer au sein de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales. En présence de ROS comme le peroxyde d'hydrogène et de substrats tels que le  $\text{Cl}^-$ , la MPO va produire, via ses diverses voies réactionnelles, des espèces oxydantes (principalement le HOCl) qui provoqueront la dégradation des tissus hôtes environnants. Les PMNs et la MPO sont associés au développement de nombreuses pathologies et sont définis comme marqueurs de celles-ci. [33, 43]

### 1.3.2 Exemples de pathologies liées à l'inflammation

#### 1.3.2.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique caractérisée par la formation d'une plaque lipidique, appelée athérome, sur la paroi endothéliale d'artères de moyens et grands diamètres. Cette plaque d'athérome est composée de divers éléments tels que des lipides modifiés, des cellules musculaires lisses migrantes, des cellules endothéliales, des calcifications, des macrophages (cellules spumeuses) et des PMNs [35, 95].

Les PMNs libèrent de la MPO qui va se fixer à la matrice extracellulaire des cellules endothéliales et va produire principalement l'HOCl et plus faiblement des espèces réactives nitrées qui oxyderont les lipides des cellules, les lipoprotéines de basse densité (LDL) et de haute densité (HDL). Le HOCl et les espèces nitrées oxydent les résidus tyrosine des LDL et des HDL pour donner la chlorotyrosine et la nitrotyrosine, retrouvées abondamment dans les lésions athérosclérotiques. [96, 97]

Les monocytes, premières cellules inflammatoires envahissant les lésions athéromateuses, vont se différencier en macrophages, qui vont capturer et phagocyter les LDL et HDL oxydés. Les macrophages, engorgés par les lipides et en voie de dégénérescence, sont appelés cellules spumeuses ou *foam cells*. Celles-ci forment la base de la plaque d'athérosclérose. La présence de résidus chlorés et nitrés au sein des HDL diminue leur capacité à participer à l'efflux du cholestérol, c'est-à-dire à leur association au cholestérol pour permettre l'élimination de ce dernier hors des cellules spumeuses et permettre son retour dans la circulation sanguine vers le foie. L'oxydation des HDL favorise ainsi l'accumulation de cholestérol dans les parois artérielles [96, 98, 99, 100].

Par la production notamment d'HOCl, la MPO est impliquée dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose. Les lésions sont caractérisées par un pH acide, favorisant le cycle de chloration de la MPO. [33, 98, 101, 102, 97, 103]

Le développement de la plaque d'athérome peut provoquer l'obstruction des artères et l'altération de la circulation sanguine. La migration de la MPO dans la région subendothéliale est également liée à la déstabilisation de la plaque car le HOCl conduit à l'apoptose des

cellules endothéliales. Le détachement de la plaque peut conduire à une occlusion suite à la formation d'un caillot et mener à une thrombose. [33, 103]

De façon générale, les personnes souffrant de pathologies cardio-vasculaires présentent une concentration en MPO circulant dans le sang plus élevée que les personnes saines. [102, 104, 103]

### 1.3.2.2 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Ces maladies touchent la paroi du système digestif. Elles se caractérisent par des phases actives alternant avec des périodes de rémission. Ces maladies provoquant des douleurs, des diarrhées sévères et de l'hématochézie, sont particulièrement invalidantes. La colite ulcéreuse touche principalement le colon, tandis que la maladie de Crohn concerne plus souvent l'intestin grêle et le colon. Les pathologies inflammatoires de l'intestin peuvent induire des cancers, dont le cancer colorectal. [105, 106]

Les causes de ces pathologies ne sont pas clairement connues. Leur développement peut être lié à divers facteurs génétiques et environnementaux. Ces facteurs provoquent un dérèglement du microbiote intestinal et favorisent l'invasion de la muqueuse par des agents pathogènes. Les MICI sont également caractérisées par une réponse immunitaire excessive. La muqueuse intestinale est colonisée par un ensemble de cellules du système immunitaire comme les PMNs, les éosinophiles et les mastocytes. La libération du contenu protéique granulaire des PMNs a été observée au sein de la paroi et de la lumière intestinale. Un taux anormalement élevé de MPO a été détecté dans les matières fécales des patients, traduisant la suractivité inflammatoire. Un lien entre la production de HOCl et les dommages de la muqueuse intestinale a été établi. La production excessive de ROS est également caractéristique de ces pathologies. [105, 106, 107]

### 1.3.2.3 Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie dégénérative inflammatoire chronique qui s'attaque à la membrane synoviale au sein des articulations. Cette maladie touche différentes articulations, principalement celles de mains, des pieds, des genoux et des coudes mais elle peut s'étendre et attaquer d'autres parties du corps comme le cou, les épaules, les hanches, la mâchoire. L'inflammation entraîne un gonflement et une raideur des articulations, accompagnés de douleurs. Sur le long terme, la pathologie entraîne une érosion osseuse et une déformation des articulations. [108, 109]

La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une infiltration du tissu et du liquide synovial par des cellules du système immunitaire notamment les PMNs. L'activation des cellules induit une libération de MPO et des produits oxydants de l'enzyme, principalement le HOCl. Ils contribuent à la dégradation des tissus et participent au développement et à la progression de la maladie. [43, 110]

### 1.3.2.4 Cancer

De nombreuses études montrent le lien étroit entre l'inflammation et le cancer. Il a été montré qu'une personne atteinte d'une pathologie inflammatoire chronique présente une prédisposition à développer un cancer. En effet, plus la situation inflammatoire persiste dans le temps, plus le risque de générer un cancer est important. Environ 25% des cancers sont associés à l'inflammation chronique [111, 112, 113]. Par exemple, la maladie inflammatoire

chronique de l'intestin augmente le risque de développer un cancer colorectal [114]. Il existe également un lien avec les cancers du foie, de la vessie, du sein, du poumon, de la prostate,... [115, 116, 117] L'inflammation aiguë induite par une infection virale ou bactérienne augmente également le risque de cancer. Des infections par les virus de l'hépatite B ou C peuvent provoquer un carcinome hépatocellulaire [118].

Inversement, le cancer induit de l'inflammation. En effet, il peut être vu comme une blessure qui ne guérit jamais. La présence de cellules cancéreuses va amener le déclenchement du système inflammatoire qui aura pour but de les éliminer. Or, sur le long terme, ce même système immunitaire peut également participer à la croissance et la prolifération tumorales. L'interaction complexe des propriétés anti- et procancéreuses du système immunitaire fait l'objet de nombreuses publications [112, 119, 120].

Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, Jean Nicolas Marjolin (1828) et Caesar Hawkins (1833), chirurgiens français et anglais, sont les premiers à suggérer un lien entre le phénomène inflammatoire et le cancer. Il a fallu attendre environ un siècle pour approfondir la compréhension du rôle essentiel du processus inflammatoire dans la tumorigenèse. En effet, Harold F. Dvorak a démontré les similitudes entre le mécanisme du développement de nombreuses pathologies inflammatoires et le mécanisme de développement de tumeurs cancéreuses, comme l'invasion du tissu conjonctif, le stroma, nécessaire à leur croissance. Durant ces deux phénomènes, une séquence d'événements peut être observée comme l'augmentation de la perméabilité vasculaire, une extravasation sanguine, l'accumulation de différentes protéines plasmatiques, l'activation du système de coagulation sanguine extravasculaire, l'apparition d'une structure fibreuse favorisant la migration cellulaire (tissu cicatriciel (inflammation) et desmoplasie (cancer)), le déclenchement de l'angiogenèse et la synthèse de collagène. [121]. Les cellules du système inflammatoire inné (macrophages, PMNs, mastocytes,...) et adaptatif (lymphocytes T et B) sont des éléments importants de l'environnement tumoral. Ces molécules contrôlent le développement tumoral en communiquant entre elles par interaction directe ou en produisant des médiateurs de l'inflammation, les cytokines. L'abondance et l'activation des différents types de cellules immunitaires dans l'environnement tumoral ainsi que l'expression des médiateurs de l'inflammation vont influencer l'équilibre entre l'action pro- et antitumorale du processus inflammatoire. [121, 122]

Les PMNs sont liés à l'initiation de la tumorigenèse, au développement tumoral et de métastases. Les mécanismes sont nombreux et ne sont pas totalement élucidés. Seule une liste résumée est développée ici. La production de ROS et la libération de cytokines par les cellules inflammatoires, dont les PMNs, peuvent induire des dommages à l'ADN des cellules du tissu environnant, permettant l'accélération de leur mutation et le développement de cellules cancéreuses. Les ROS produits peuvent également inactiver des enzymes appartenant au système de réparation de l'ADN. Les PMNs sont également impliqués dans le développement tumoral. En effet, les cellules sécrètent des protéines telles que l'élastase, la prokinectine 2 ou la métalloprotéinase favorisant l'induction de l'angiogenèse permettant la vascularisation de la tumeur. Les PMNs aideraient également la mobilité des cellules cancéreuses dans les tissus, favorisant ainsi la formation de métastases, probablement via le NETs. [122, 123, 124]

Tout comme pour les PMNs, des études ont mis en lumière la double action pro- et antitumorale de la MPO. Bien que celle-ci ne puisse pas encore être définie comme marqueur du cancer, elle est tout de même décrite comme étant une enzyme favorisant l'initiation et le développement de tumeurs [125]. En effet, la production d'espèces oxydantes via les cycles de peroxydase et de chloration de la MPO établit un environnement favorisant l'altération de l'ADN cellulaire. L'exposition prolongée à des ROS contribue à l'induction de dommages pouvant conduire à la mutation de gènes (oxydation des bases azotées et production du 5-

chlorouracile et 5-chlorocytosine), à un phénomène de division cellulaire incontrôlé et à une altération du mécanisme d'apoptose (mort cellulaire programmée) [58, 126, 127]. La MPO peut également intervenir dans la migration des cellules tumorales, permettant ainsi la formation de métastases. La MPO peut se lier à la matrice extracellulaire des tissus et les espèces oxydantes produites, comme le HOCl, induisent des dommages qui pourraient être impliqués dans l'infiltration et l'invasion des cellules cancéreuses dans les tissus [128, 129]. La MPO pourrait agir comme molécule chémo-attractrice, augmentant de ce fait la mobilité de cellules cancéreuses, *in vitro* [130].

### 1.3.2.5 Sepsis

Le sepsis est la réponse systémique du corps à l'infection par une bactérie et moins fréquemment par un virus ou un champignon. Cette infection débute localement (pneumonie, péritonite,...). Mais chez des personnes ayant un système immunitaire affaibli (personne âgée, nouveau-né, malade), l'infection peut se répandre. La propagation de l'agent pathogène dans la circulation sanguine mène à sa dissémination dans l'ensemble de l'organisme, induisant une multitude de sites inflammatoires. Le choc septique correspond à la chute de tension artérielle associée au sepsis. La diminution de l'apport en oxygène aux organes qui en découle peut provoquer leur disfonctionnement. La production massive de cytokines (orage cytokinique) et l'accumulation de cellules immunitaires (PMNs, macrophages, ...) participent également à l'attaque des organes. La défaillance multiviscérale mène ensuite à la mort du patient. Environ un tiers des patients atteints d'un sepsis décèdent. Cela correspond à environ 11 millions de décès par an et des projections prédisent l'augmentation du nombre de décès dans le futur à cause du vieillissement de la population [131].

Le rôle des PMNs lors d'un sepsis est complexe. En effet, l'origine de la pathologie est liée à une altération de la réponse immunitaire, empêchant l'élimination de l'agent pathogène à l'origine de l'infection. Les PMNs, par exemple, vont réagir de façon moins efficace aux molécules chémo-attractrices, diminuant ainsi leur accumulation au niveau des différents sites inflammatoires. Le recrutement systémique altéré des PMNs provoque par conséquent l'augmentation de leur concentration dans le sang. La suractivation des PMNs entraîne la production et la libération excessives de molécules oxydantes (ROS, enzymes, ...) dans la circulation, les amenant ainsi vers différents tissus et organes, où ils induiront des dégâts importants [132, 124]. La myéloperoxydase libérée par les PMNs est définie comme un biomarqueur du sepsis. En effet, la concentration en MPO est plus importante chez les patients en choc septique et un lien entre l'activité de l'enzyme, la défaillance des organes et la mortalité a été établi. Une concentration importante d'ADN conjugué à de la MPO est également détectée chez les patients septiques. Cela prouve l'augmentation du phénomène de nétose et celui-ci est corrélé à la sévérité du dysfonctionnement des organes [133, 134, 135].

### 1.3.2.6 Pathologies neurodégénératives

L'inflammation est un des facteurs induisant le développement et la progression des pathologies neurodégénératives. La neuroinflammation est notamment caractérisée par la migration de PMNs dans le système nerveux central [136]. Sur place, les cellules provoquent la libération d'espèces oxydantes. Des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose en plaques sont caractérisées par la présence de MPO dans le cerveau. Les espèces oxydantes produites par la MPO, dont notamment le HOCl, participent au stress oxydatif et induisent des dommages aux cellules neuronales. En effet, les cellules de la microglie (macrophages du système nerveux) produisent de l'anion superoxyde qui, en dismutant, donne le peroxyde d'hydrogène. Ce substrat naturel de l'enzyme permet de déclencher son activité

oxydante. La 3-chlorotyrosine et les produits d'oxydation des lipides sont des marqueurs des pathologies neurodégénératives. [43, 137, 138, 139, 140, 141]

### 1.3.2.7 COVID19

Associée à la tempête cytokinique caractéristique du COVID 19, une augmentation de la concentration en PMNs, circulant dans le sang, dans l'épithélium du nasopharynx et dans l'espace bronchoalvéolaire a également été démontrée par différentes études, concluant à la possibilité d'utiliser les PMNs comme cible thérapeutique pour traiter les cas sévères de la maladie [142, 143, 144]. La libération de MPO par les PMNs provoque la production importante de ROS dont le HOCl. Cet oxydant puissant peut notamment entrer en compétition avec l'oxygène pour se lier à la structure hémique de l'hémoglobine réduisant ainsi le transport d'oxygène et induisant de l'hypoxie. La liaison du HOCl avec l'hème peut également détruire les protéines hémiques et provoquer la libération de fer qui peut, par réaction de Fenton, produire le radical hydroxyle. Pour finir, le cycle de peroxydase de la MPO (composé I et II) consomme comme substrat le monoxyde d'azote (NO), un vasodilatateur, contribuant à la constriction des vaisseaux sanguins pulmonaires [145].

## 1.3.3 Inhibition de la MPO

La MPO provoque le développement et la progression de pathologies inflammatoires. Etant détectée en grande concentration dans les tissus et fluides inflammatoires, elle est définie comme marqueur de l'inflammation. Pour contrôler et arrêter le processus d'inflammation excessive, il est donc important de déterminer des moyens de contrôle de l'action de la MPO. L'acide hypochloreux (HOCl), étant le composé oxydant produit le plus puissant, l'inhibition de son action via l'utilisation de piègeurs permettrait de réduire les dommages de l'inflammation sur les tissus. Cependant, ce n'est pas cette approche qui est privilégiée. En effet, la grande réactivité du HOCl impose l'utilisation de très grandes concentrations de piègeurs pour que ceux-ci soient efficaces. Une autre alternative serait d'éviter la formation de l'HOCl en agissant au niveau de l'activité de la MPO, notamment au niveau de la formation du composé I. En effet, ce composé est le précurseur du HOCl. En outre, il est également le premier intermédiaire du cycle de peroxydase de la MPO. Agir sur le composé I aurait des répercussions sur l'activité oxydante de ce cycle. Il est donc nécessaire de trouver des molécules capables de moduler l'activité de l'enzyme. [41, 43, 146]

### 1.3.3.1 Types d'inhibiteurs

Les inhibiteurs de la MPO peuvent être classés en deux catégories : les inhibiteurs réversibles et irréversibles.

Les inhibiteurs réversibles peuvent interagir avec la MPO via deux mécanismes distincts ou via l'association des deux. Le premier mode d'action consiste à agir en tant que substrat réducteur avec les composés intermédiaires redox de l'enzyme, les composés I et II. Ces inhibiteurs doivent s'insérer dans la cavité du cycle actif de la MPO, suffisamment près de la structure hémique pour permettre l'échange d'électrons. Ces molécules doivent être facilement oxydées par le composé I et par conséquent avoir un potentiel redox inférieur à 1,35 V [52]. La réduction du composé I permet alors la formation du composé II. En interagissant efficacement avec le composé I, c'est-à-dire avec une constante de vitesse de réaction supérieure à celle de la réaction d'oxydation à deux électrons des anions chlorure par le composé I (voir équation 1.7), les inhibiteurs peuvent détourner l'enzyme du cycle de chloration vers celui de peroxydase. Cela inhibe la formation d'HOCl [147, 148, 149].

Ces inhibiteurs réducteurs peuvent être séparés en deux groupes selon la valeur de leur potentiel d'oxydoréduction. Certaines molécules ont un potentiel redox compris entre celui du composé II (0,97 V) et celui du composé I (1,35 V). Elles ne sont donc pas capables de réduire le composé II et de permettre le retour de l'enzyme vers sa forme native. L'enzyme s'accumule alors sous une forme peu active, le composé II. Cependant, *in vivo*, la présence de nombreux substrats réducteurs peut empêcher l'inactivation de la MPO en permettant le retour du composé II vers l'enzyme native. D'autres inhibiteurs sont caractérisés par un potentiel redox inférieur à celui du composé II (0,97 V) et peuvent donc lui céder un électron pour permettre le retour vers l'enzyme native. Ils peuvent alors entrer en compétition avec d'autres substrats naturels de l'enzyme et empêcher leur passage à l'état radicalaire. Idéalement, les inhibiteurs doivent former des radicaux peu réactifs ou pouvant s'associer pour former une molécule stable. Bien qu'ils ne puissent stopper le déroulement du cycle de peroxydase, ils peuvent le ralentir, en fonction de leur réactivité avec le composé II.

Le deuxième mode d'action des inhibiteurs réversibles est l'action anticatalytique, c'est-à-dire l'inhibition du déclenchement de l'activité de l'enzyme via la liaison de l'inhibiteur dans le site actif de l'enzyme. Il s'agit de molécules présentant une affinité avec le site actif de la MPO. La petite taille de ces composés leur permet de s'insérer dans la cavité et d'y former un complexe avec l'enzyme. Les inhibiteurs forment des liaisons comme des ponts hydrogène ou des liaisons ioniques avec différents acides aminés (Histidine 95, Arginine 239, Glutamine 102) ou encore interagissent avec le noyau de fer au centre de l'hème. En occupant le site actif, ils peuvent entrer en compétition avec d'autres substrats ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Cl}^-$ , substrats réducteurs) et les gêner, voire les empêcher d'accéder au site actif. Ils peuvent ainsi fortement ralentir, voire bloquer le déroulement des cycles oxydants de l'enzyme. C'est par exemple le cas d'un polyphénol, la quercétine [43, 150, 151]

Enfin, les inhibiteurs réversibles peuvent également combiner les deux mécanismes d'action. En effet, des molécules capables de s'insérer dans le site actif et de s'y lier peuvent également, si elles sont caractérisées par un potentiel redox adéquat, combiner leur action de blocage du site avec une activité réductrice, provoquant la formation et l'accumulation du composé II, la forme inactive de l'enzyme [41, 146, 152, 153, 154, 151, 155, 156, 157]. Beaucoup d'inhibiteurs efficaces de la MPO sont caractérisés par ce mode d'action. Galijasevic et al. [158] ont montré que le tryptophane peut s'insérer dans le site actif et y former un complexe. De plus, la molécule peut réduire le composé I mais pas le composé II, provoquant l'accumulation de celui-ci. La mélatonine présente une action inhibitrice de la MPO similaire, à la seule différence que la molécule peut réduire le composé II [159]. Ces deux molécules sont des inhibiteurs efficaces du cycle de chloration. D'autres composés indoliques ou encore des polyphénols (comme la curcumine ou l'acide gallique) ont montré des mécanismes d'action similaires [148, 160, 161].

La deuxième catégorie reprend les inhibiteurs irréversibles. Ils bloquent totalement l'activité de l'enzyme en induisant la destruction de l'hème ou en se liant de façon covalente à la structure de l'enzyme (au noyau de fer ou à l'hème). Des inhibiteurs comme l'hydrazide d'acide aminobenzoïque sont oxydés par les composés I et II du cycle de peroxydase de la MPO. L'état radicalaire de la molécule peut alors réagir avec l'enzyme native et réduire le noyau de fer Fe(III) en fer Fe(II) [162]. Ce dernier donne alors, en présence d'oxygène, le composé III (figure 1.9). Le retour du composé III vers l'enzyme native est lent, ce qui permet d'inhiber les cycles de peroxydase et de chloration. En présence d'une grande concentration de peroxyde d'hydrogène, le composé III peut aussi provoquer la destruction de l'hème en induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène comme le radical hydroxyle [43, 41]. Les thioxanthines peuvent également réagir et être oxydées par le composé I de l'enzyme. Leurs formes radicalaires peuvent ensuite se lier de façon covalente via leur atome de soufre,

avec un pont thioéther, à un cycle pyrrole de l'hème. La modification structurelle du site actif provoque l'inactivation définitive de l'enzyme, en l'empêchant de retourner à son état natif [72, 163, 164].

### 1.3.3.2 Recherche d'inhibiteurs

De nombreuses études sont dédiées à la recherche d'inhibiteurs potentiels de la MPO et à l'investigation de leur mode d'action. Bien que la découverte d'inhibiteurs irréversibles de l'enzyme fasse l'objet d'un intérêt croissant, la recherche se focalise principalement sur les inhibiteurs réversibles. Les inhibiteurs idéaux doivent avoir une structure leur permettant d'entrer dans le site actif de la MPO, d'y former un complexe et de perturber la liaison d'autres substrats. Cependant, cette propriété n'est pas suffisante. Les propriétés redox des inhibiteurs doivent également être évaluées car ils doivent pouvoir interagir avec les composés intermédiaires du cycle de peroxydase afin de permettre l'accumulation du composé II.

Beaucoup de recherches recourent au *virtual screening* pour concevoir de nouveaux inhibiteurs. Cette technique utilise la modélisation moléculaire afin de sélectionner, parmi une grande base de structures moléculaires, de nouveaux composés présentant une affinité avec le site actif de la MPO. Ces composés possèdent des éléments structurels favorisant leur interaction avec les différents éléments (acides aminés, hème, noyau de fer) composant la cavité hémique et le tunnel d'accès [146, 152, 157, 165]. Une fois sélectionnées, ces molécules sont synthétisées et leurs propriétés inhibitrices évaluées expérimentalement. Leur capacité réductrice et leur interaction avec les intermédiaires de l'enzyme (composés I et II) sont étudiées. Les molécules présentant une action inhibitrice satisfaisante sont alors retenues pour la suite des tests pré-cliniques au cours desquels sont notamment évaluées leur posologie et leur toxicité. Malheureusement, certains composés testés peuvent être toxiques et leur utilisation ne peut, par conséquent, être envisagée chez l'homme [72]. Malgré des résultats préliminaires intéressants, les études pré-cliniques et cliniques de nombreux composés (e.g. thioxodihydroquinazolinone, 2-thiopyrimidone, alkylamine indolique, macrocyle triazolopyridine, thioxanthine) n'ont pas été entreprises ou poursuivies [43, 72, 166, 167]. Pour le reste des composés, de nombreuses étapes et des tests cliniques sont encore nécessaires avant qu'ils puissent être utilisés comme traitement anti-inflammatoire [43, 72]. On estime qu'environ quinze ans sont nécessaires au développement d'un nouveau médicament, entre le début de son étude et sa commercialisation [168].

Afin de limiter ces contraintes, une alternative consiste à étudier l'action inhibitrice de molécules ayant déjà une utilisation clinique. La posologie et la toxicité de ces molécules étant donc déjà connues, un temps considérable peut être gagné lors de l'évaluation de leurs propriétés immuno-modulatrices et de la mise en place de leur application contre des pathologies inflammatoires. L'addition d'une action anti-inflammatoire à leur propriété première peut être un atout appréciable pour de nombreux médicaments, parfois déjà utilisés dans le cadre de pathologies ou de situations cliniques en lien avec l'inflammation. Dans le cadre de cette thèse, les composés sélectionnés possèdent idéalement une action antioxydante.

### 1.3.4 Inhibition des PMNs

La MPO est une des cibles majeures des traitements anti-inflammatoires. Cependant, celle-ci étant acheminée sur le site inflammatoire via les PMNs, il est également intéressant d'observer l'impact des inhibiteurs de la MPO sur les différents rôles de ces cellules. En effet, de nombreuses recherches se sont récemment intéressées à l'utilisation des PMNs comme cibles thérapeutiques pour le traitement de pathologies inflammatoires. Elles visent à manipu-

ler les PMNs afin de limiter leur action néfaste en modulant, voire en inhibant, leur activation excessive. Ces études recherchent des composés pouvant impacter le développement et la production de PMNs, leur recrutement et leur accumulation sur le site inflammatoire, ainsi que leur activation et leurs actions oxydantes comme la production de ROS, la dégranulation et la nétose. Certaines études vont même plus loin que la stratégie première consistant à inhiber l'activité des PMNs. Elles cherchent à restaurer leur activité normale. Un grand nombre de voies existent pour traiter des pathologies inflammatoires via les PMNs. Elles ont fait l'objet d'un article publié par Németh et al. [124]. Dans notre travail, seules les stratégies s'intéressant aux mécanismes reliant les PMNs et la MPO seront étudiées.

Les PMNs libèrent l'ensemble des enzymes contenues dans leurs granules, dont la MPO, dans le phagosome et le milieu extracellulaire via le mécanisme de dégranulation. En inhibant celui-ci et plus précisément la libération extracellulaire de la MPO, les composés peuvent réduire de façon conséquente l'impact négatif de l'enzyme lors de l'inflammation.

Un second phénomène important provoqué par les PMNs est la flambée respiratoire produisant des anions superoxydes via le complexe protéique NADPH oxydase. L'anion superoxyde, en plus d'être une espèce oxydante elle-même, est également le précurseur du substrat naturel de la MPO,  $H_2O_2$ , essentiel à l'activité oxydante de l'enzyme. Empêcher la production d'anions superoxydes est un biais permettant d'inhiber la MPO. L'impact des inhibiteurs sur la production d'anions superoxydes peut se faire à plusieurs niveaux. Les molécules peuvent agir directement sur la NADPH oxydase. Si elles sont capables de pénétrer voire de traverser la membrane cellulaire des PMNs, elles peuvent alors potentiellement soit empêcher la formation du complexe enzymatique, soit agir sur le complexe formé et empêcher l'oxydation du NADPH. Les molécules qui ne pénètrent pas au sein des PMNs peuvent, quant à elles, potentiellement agir comme piègeurs de l'espèce réactive de l'oxygène.



## Chapitre 2

# Stratégie expérimentale

L'objectif de ce travail consiste à évaluer l'action antioxydante et immunomodulatrice de divers composés. Dans ce but, une stratégie expérimentale systématique a été établie et appliquée pour les différentes catégories de molécules sélectionnées. Celles-ci sont reprises sous le terme de molécules d'intérêt.

Dans un premier temps, une investigation de l'action antioxydante des molécules d'intérêt a été menée (piégeage de ROS, capacité réductrice de radicaux et potentiel d'oxydoréduction). Au cours de la seconde étape, le but principal a été d'étudier l'interaction entre les composés d'intérêt et les PMNs. Ces cellules, qui jouent un rôle essentiel dans le processus inflammatoire, sont définies comme marqueurs dans de nombreuses pathologies (voir section 1.3.1). Parmi les nombreux mécanismes associés aux PMNs, deux actions liées à la MPO ont été retenues et étudiées. Il s'agit d'une part de l'inhibition de la production de ROS et, plus précisément, de l'anion superoxyde par les molécules d'intérêt et d'autre part de leur impact sur le mécanisme de dégranulation de la MPO. L'objectif de la troisième partie des expériences a consisté à étudier les mécanismes d'interaction entre les molécules d'intérêt et les cycles de peroxydase et de chloration de la MPO. L'interaction entre ces molécules et le site actif de l'enzyme a également fait l'objet d'une étude.

Ce chapitre détaille les différentes expériences réalisées et précise leur intérêt dans le cadre de la démarche entreprise pour évaluer l'action immunomodulatrice des molécules d'intérêt. L'ensemble des détails techniques sont repris dans l'annexe D et les notions théoriques relatives aux techniques d'analyse utilisées (spectroscopie RPE, spectroscopie d'absorption UV-visible et de fluorescence, voltammétrie cyclique et *docking*) sont quant à elles synthétisées dans l'annexe E.

### 2.1 Etude de l'activité réductrice et antioxydante des molécules d'intérêt

L'inflammation est un processus oxydant qui provoque la production importante d'espèces radicalaires et d'espèces réactives de l'oxygène, via différentes sources (cellules immunitaires, enzymes). Le déclenchement d'un stress oxydatif, c'est-à-dire une production incontrôlée de ces espèces oxydantes, induit l'apparition de pathologies aiguës et chroniques. En plus d'étudier l'impact de potentiels composés immunomodulateurs sur l'origine de ces espèces, il est également important d'évaluer leur action antioxydante en tant qu'agents réducteurs et piègeurs de radicaux et de ROS.

### 2.1.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Le piégeage de ROS et de radicaux est un processus d'échange d'électrons, donc d'oxydo-réduction. Afin de pouvoir comprendre le mécanisme de piégeage des molécules d'intérêt, il est important d'évaluer leur capacité réductrice. Pour y arriver, il est nécessaire de déterminer leur potentiel d'oxydoréduction.

Un des objectifs principaux de ce travail est également d'étudier l'action inhibitrice potentielle des molécules d'intérêt sur l'activité oxydante de la MPO (voir section 1.2.2). L'interaction des molécules en tant que substrat réducteur dans les cycles de peroxydase et de chloration de l'enzyme fait partie des différents mécanismes d'inhibition possibles. L'évaluation du potentiel d'oxydoréduction aidera à l'interprétation des résultats de ces études.

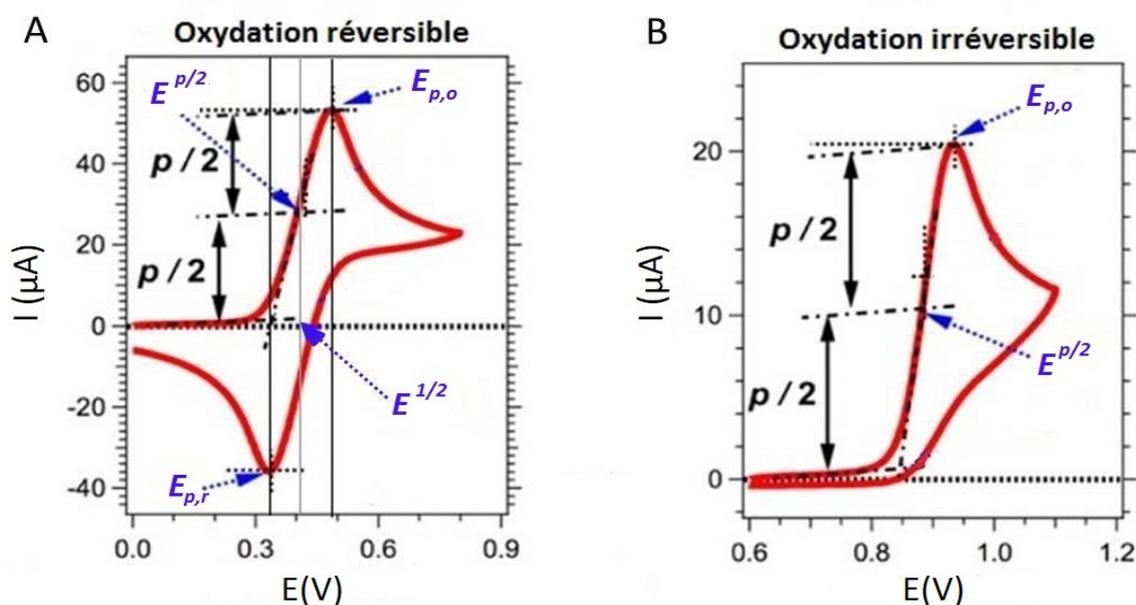


FIGURE 2.1 – A. Voltammogramme d'un système réversible. Le potentiel d'oxydoréduction est estimé à partir du potentiel de demi-vague  $E^{1/2}$ . B. Voltammogramme d'un système irréversible. Le potentiel d'oxydoréduction est estimé à partir du potentiel de demi-pic  $E^{p/2}$ . Image modifiée à partir d'une image originale de Espinoza et al. [169].

La voltammétrie cyclique permet d'évaluer le potentiel d'oxydoréduction des molécules d'intérêt (voir annexe E). En quelques mots, cette technique consiste à appliquer une différence de potentiel à un système d'électrodes plongé dans une solution contenant la molécule étudiée. La variation de cette différence de potentiel permet d'induire des échanges d'électrons entre les électrodes et les molécules d'intérêt, suite à l'oxydation ou la réduction de ces dernières. Le transfert d'électrons génère la circulation d'un courant dans le dispositif expérimental. La représentation de la valeur de ce courant en fonction de la valeur de la différence de potentiel appliquée forme un voltammogramme (figure 2.1). Les potentiels d'oxydoréduction sont déterminés sur base des voltammogrammes obtenus. Dans le cas des systèmes réversibles (pics d'oxydation et de réduction observés sur le voltammogramme), le potentiel d'oxydoréduction  $E^0$  est estimé en déterminant le potentiel de demi-vague  $E^{1/2}$  (figure 2.1 A). Dans le cas des systèmes irréversibles, l'absence de pic de réduction empêche de déterminer le potentiel de demi-vague. Espinoza et al. [169] ont montré que le potentiel de demi-pic  $E^{p/2}$  fournit une bonne estimation du potentiel d'oxydoréduction  $E^0$  pour des petites vitesses de scan (figure 2.1 B).

Les propriétés d'oxydoréduction dépendent fortement du pH du milieu mais aussi de sa composition. C'est pourquoi, dans le cadre de ce travail, l'étude voltammétrique des molécules d'intérêt a été réalisée dans du tampon phosphate pH 7,4. Il est le plus fréquemment utilisé, notamment pour les études réalisées sur la myéloperoxydase.

L'évaluation des potentiels d'oxydoréduction des molécules d'intérêt permet en les comparant à ceux associés à d'autres espèces chimiques (états redox de la MPO (enzyme native, composé I et composé II) (voir section 1.2.2), radicaux, ROS) de déterminer leur action en tant qu'agents réducteurs ou oxydants vis-à-vis de ces espèces. On peut de ce fait prédire l'éventuelle capacité des molécules d'intérêt à agir en tant que piègeurs de ROS et de radicaux ou comme agents réducteurs dans les cycles de peroxydase et de chloration de la MPO.

### 2.1.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS

La méthode ABTS permet d'évaluer la capacité des molécules d'intérêt à réduire des espèces radicalaires. En effet, la production chimique des cations radicalaires  $ABTS^{+\cdot}$  est simple et peut être facilement observée grâce à la coloration verte de la solution. Celle-ci est caractérisée par un spectre d'absorption avec une absorbance maximale à 734 nm (figure 2.2). L'action réductrice des molécules d'intérêt peut alors être évaluée, grâce à la spectroscopie d'absorption UV-visible, en suivant dans le temps la diminution de l'absorbance de la solution d' $ABTS^{+\cdot}$ .

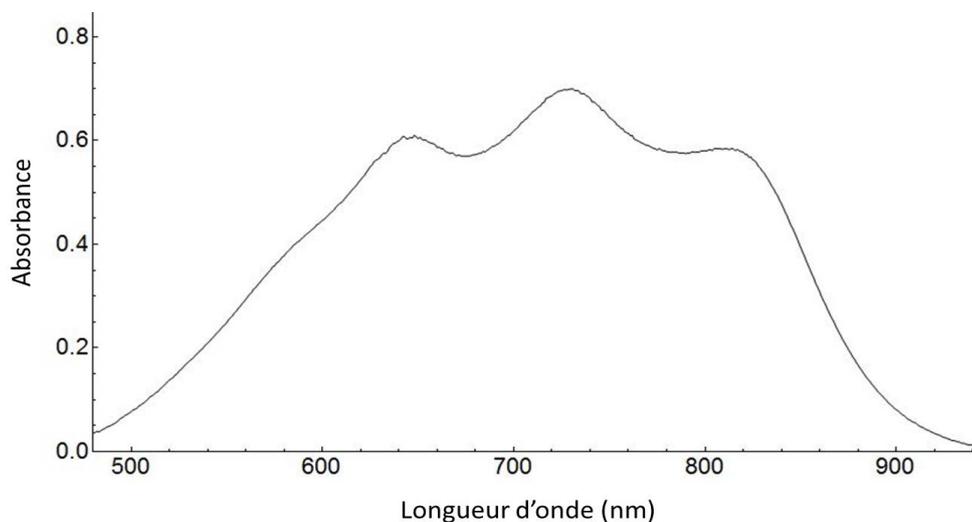


FIGURE 2.2 – Spectre d'absorption du radical  $ABTS^{+\cdot}$ .

Les résultats obtenus peuvent être corrélés aux potentiels d'oxydoréduction estimés par voltammétrie cyclique. En effet, le potentiel redox du couple  $ABTS^{+\cdot}/ABTS$  a été évalué à +698 mV *vs* ESH (électrode standard à hydrogène) à pH 7,4 (figure 2.3). Cette valeur est proche de celles décrites dans la littérature (+677 mV à pH 7 [170]). Les molécules d'intérêt caractérisées par un potentiel redox inférieur au potentiel du couple  $ABTS^{+\cdot}/ABTS$  joueront le rôle d'agent réducteur et auront la capacité de céder un électron aux radicaux  $ABTS^{+\cdot}$ , qui eux joueront le rôle d'agent oxydant.

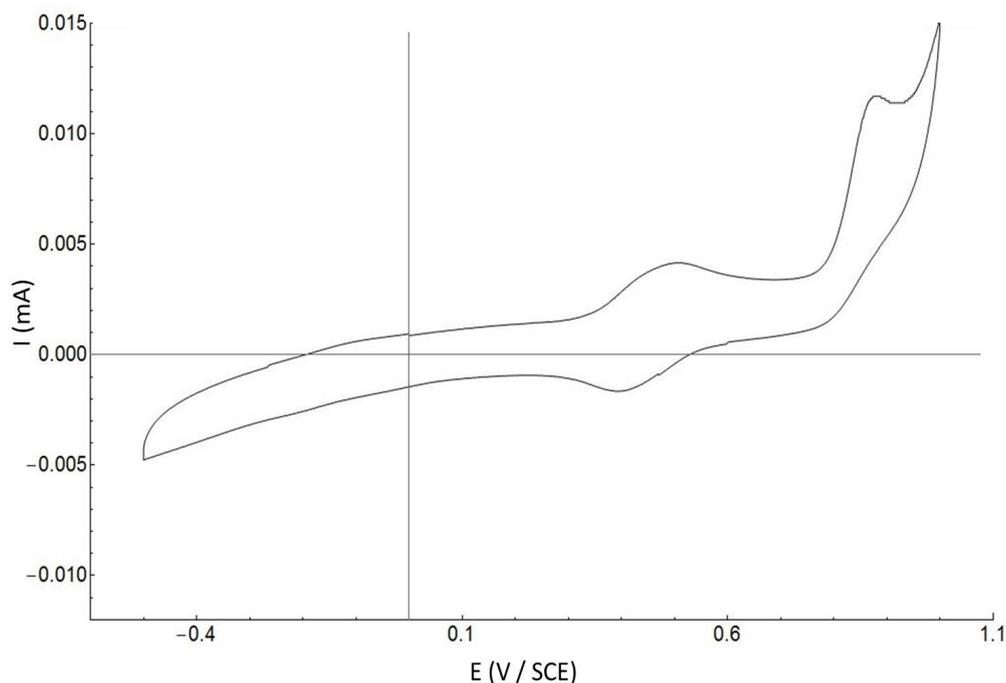


FIGURE 2.3 – Voltammogramme de l'ABTS (1 mM) dans du tampon phosphate pH 7,4 (vitesse de balayage : 10 mV/s). L'électrode de référence est une électrode de calomel saturée.

### 2.1.3 Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde

Les espèces réactives de l'oxygène sont des espèces oxydantes essentielles au processus inflammatoire. Cependant, lors de pathologies inflammatoires, leur surproduction peut causer des dégâts tissulaires. C'est pourquoi il est intéressant que des molécules immunomodulatrices puissent piéger ces espèces afin de prévenir leur action oxydante.

Lors du processus inflammatoire, l'anion superoxyde est le premier ROS précurseur, formé notamment par les PMNs. Il permet la formation d'autres ROS tels que le peroxyde d'hydrogène, substrat naturel de la MPO. Il peut également servir de substrat dans le cycle de peroxydase de l'enzyme. En piégeant l'anion superoxyde, les molécules d'intérêt peuvent contrecarrer son action oxydante et réduire, voire inhiber, la formation de ROS et, par conséquent, impacter le déclenchement des cycles oxydants de la MPO.

Au cours d'une première expérience, la spectroscopie RPE (voir annexe E), associée au *spin trapping*, a permis d'évaluer l'action de piégeage de l'anion superoxyde par les molécules d'intérêt. Celui-ci est produit par un système enzymatique, xanthine/xanthine oxydase.



L'espèce active de l'oxygène étant très réactive, elle ne peut être détectée directement par spectroscopie RPE à température ambiante. Elle doit donc être piégée par le DMPO, un piègeur de spin, afin de former un adduit de spin (DMPO-OOH) plus stable dans le temps. La compétition entre les molécules d'intérêt et le DMPO pour interagir avec l'anion superoxyde peut être déterminée en observant la diminution de l'intensité du spectre du DMPO-OOH (figure 2.4).

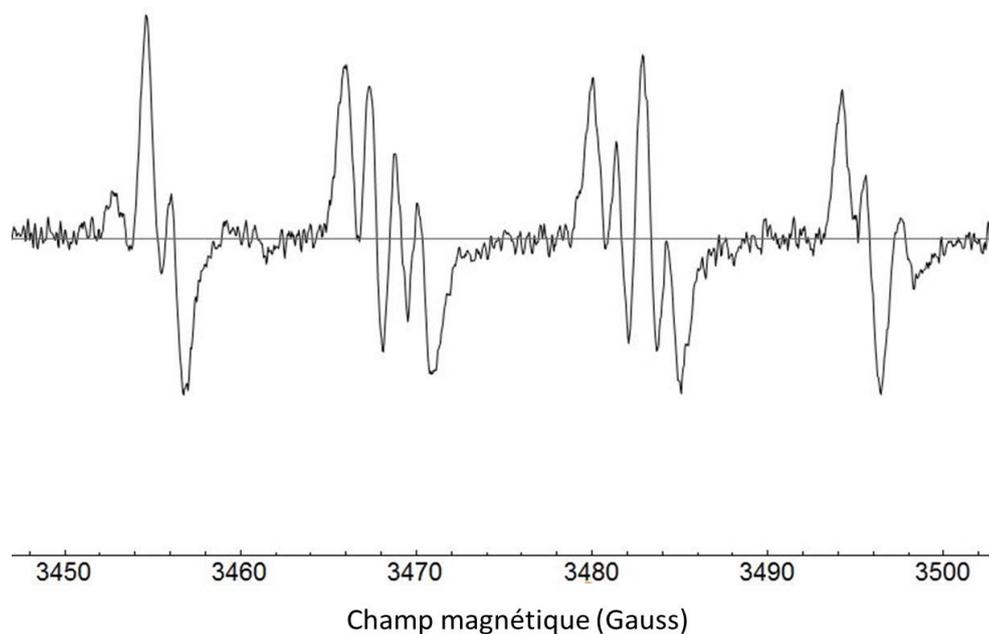
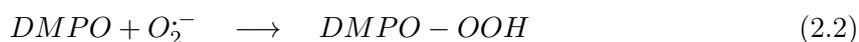


FIGURE 2.4 – Spectre RPE de l'adduit de spin DMPO-OOH.



Au cours d'une seconde expérience, l'emploi du  $KO_2$  a permis de produire l'anion superoxyde afin de s'affranchir de l'espèce enzymatique pouvant potentiellement interagir avec les molécules d'intérêt. La technique de détection diffère également. La chimiluminescence, avec l'utilisation de la sonde L-012, analogue du luminol, remplace la spectroscopie RPE. La chimiluminescence est le processus de production de lumière par une molécule à la suite d'une réaction chimique. Par exemple, l'oxydation de la sonde L-012 avec l'anion superoxyde provoque la formation d'un composé, un acide aminophthalique, se trouvant dans un état excité. Celui-ci retourne à son état fondamental en émettant un photon (figure 2.5).

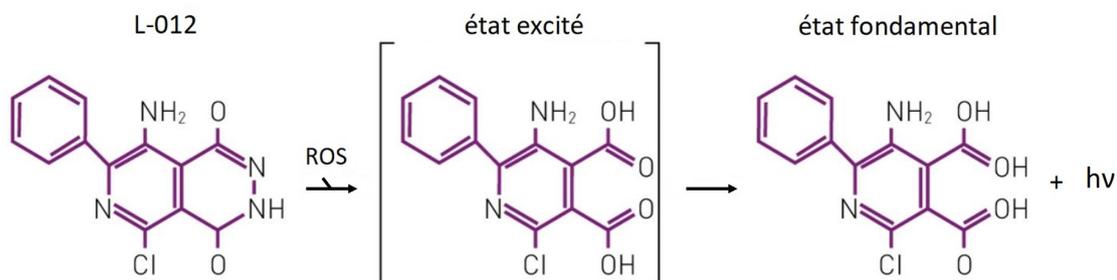


FIGURE 2.5 – Réaction de chimiluminescence du L-012 avec les ROS. Image modifiée à partir d'une image originale de [171]

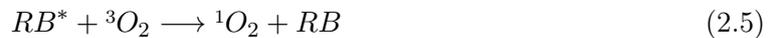
On peut étudier le piégeage de l'anion superoxyde par les molécules d'intérêt en observant l'inhibition de la chimiluminescence du L-012.

### 2.1.4 Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet

L'oxygène singulet est une espèce réactive de l'oxygène intervenant dans le processus inflammatoire. *In vivo*, il est produit via l'interaction entre le HOCl et l' $H_2O_2$ , deux ROS générés par les PMNs et la MPO [172], selon la réaction suivante :



L'étude de la réactivité de l'oxygène singulet avec les molécules d'intérêt est réalisée par spectroscopie d'absorption UV-visible. Il existe d'autres sources de production de l'oxygène singulet comme l'irradiation de photosensibilisateurs. Le rose Bengale est une de ces sources très efficaces d'oxygène singulet (rendement quantique :  $\Phi({}^1O_2) = 0,75$  [173]). L'irradiation du rose Bengale ( $\lambda > 450$  nm) permet son passage à l'état excité  $RB^*$ . Celui-ci transfère son excès d'énergie à l'oxygène moléculaire présent en solution à l'état triplet (son état électronique fondamental) et provoque son passage à l'état singulet :



L'oxygène singulet peut ensuite interagir avec une sonde, l'acide anthracène-9,10-dipropionique (ADPA) (constante de vitesse :  $8,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [174]). L'oxydation de l'ADPA forme un endoperoxyde (figure 2.6), un composé caractérisé par un spectre d'absorption différent de l'ADPA, c'est-à-dire n'absorbant plus entre 320 et 410 nm (figure 2.7). [173, 175, 176]

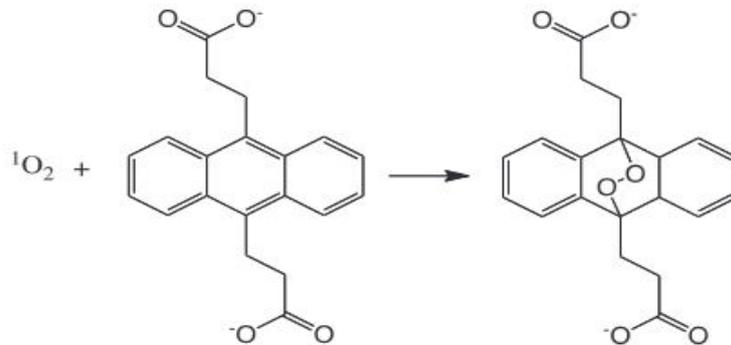


FIGURE 2.6 – Interaction de l'ADPA avec l'oxygène singulet et formation de l'endoperoxyde. Schéma original de Craig et al. [176]

L'irradiation du rose Bengale et la production continue d'oxygène singulet qui en découle provoquent la décroissance du spectre d'absorption de l'ADPA qui peut être suivie dans le temps (figure 2.7). Si la molécule d'intérêt est capable de piéger l'oxygène singulet, elle peut entrer en compétition avec l'ADPA et empêcher la diminution de son spectre d'absorption, à condition que sa constante de vitesse d'interaction avec le ROS soit du même ordre que, ou supérieure à, celle de l'ADPA ( $8,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [174]).

Les piégeurs de l'oxygène singulet peuvent interagir avec celui-ci de deux manières. Il existe des piégeurs dits chimiques. Leur structure chimique est modifiée suite à leur réaction avec le ROS, ce qui provoque une modification de leur spectre d'absorption. Par exemple, l'ADPA est un piégeur chimique qui incorpore les deux atomes d'oxygène dans sa structure cyclique pour former un nouveau composé endoperoxyde (figure 2.6). Le second type est le

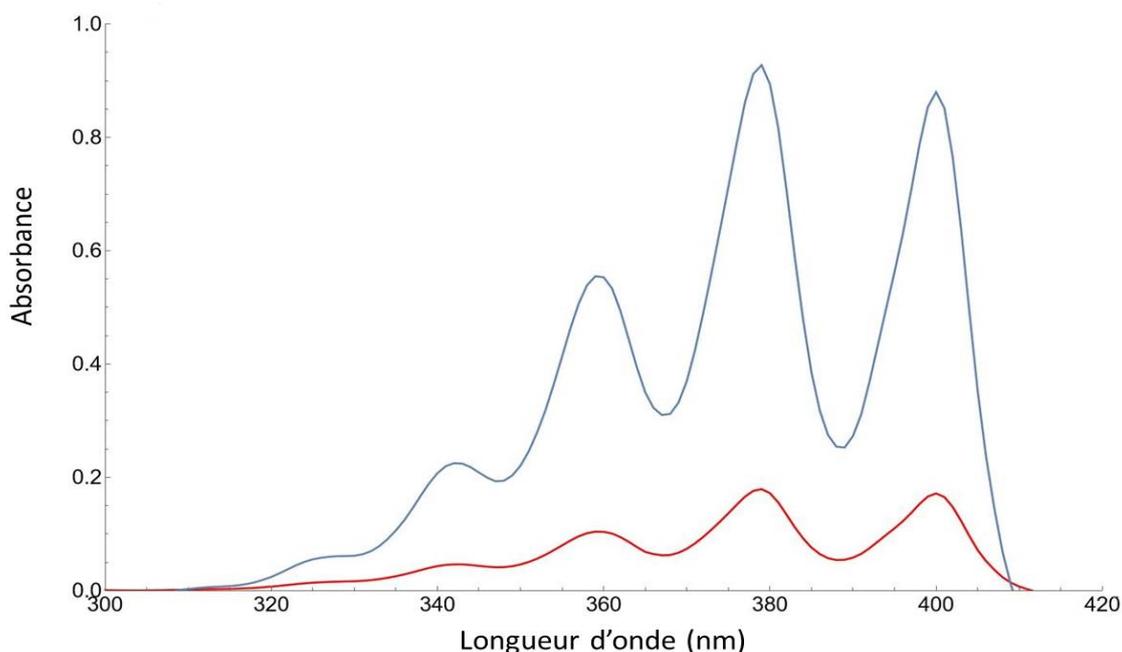


FIGURE 2.7 – Spectre d’absorption de l’ADPA entre 300 et 420 nm (courbe bleue). Décroissance de l’absorbance du spectre de l’ADPA suite à son interaction avec l’oxygène singulet, produit par l’irradiation du rose Bengale pendant dix minutes (courbe rouge).

piégeur dit physique. L’oxygène singulet transfère son excès d’énergie au piégeur, qui passe dans un état excité, sans altérer sa structure. Le spectre d’absorption de la molécule reste alors inchangé. Le transfert d’énergie peut par exemple, faire passer un électron du piégeur vers un niveau d’énergie vibrationnelle supérieur. La molécule se désexcite ensuite par voie non radiative, grâce à un échange de chaleur avec le solvant. Parmi les exemples de piégeurs physiques, on peut citer les caroténoïdes. Par conséquent, l’observation de l’évolution du spectre d’absorption du piégeur en réponse à son interaction avec l’oxygène singulet permet d’obtenir une première information sur son mécanisme d’action.

### 2.1.5 Etude de l’action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux

Le cycle d’halogénéation de la MPO est une propriété unique parmi les peroxydases (voir section 1.2.2.1). Il permet de produire différents acides hypohalogéneux, dont le principal est l’acide hypochloreux (HOCl). Le HOCl est un oxydant puissant qui est impliqué dans l’oxydation et la chloration de nombreuses molécules biologiques. Piéger le HOCl permet de réduire l’impact oxydant de la MPO.

Afin de s’affranchir de l’influence d’un système enzymatique, le HOCl est produit chimiquement à partir du NaOCl. Le HOCl peut alors interagir avec une sonde dérivée de la fluorescéine, l’APF. L’oxydation de l’APF produit la fluorescéine, une molécule fluorescente (figure 2.8). En excitant ensuite cette molécule avec un rayonnement de longueur d’onde adaptée (490 nm), celle-ci émet un rayonnement de fluorescence à 515 nm. L’inhibition de ce signal de fluorescence indique la capacité des molécules d’intérêt à piéger l’acide hypochloreux et à entrer en compétition avec l’APF.

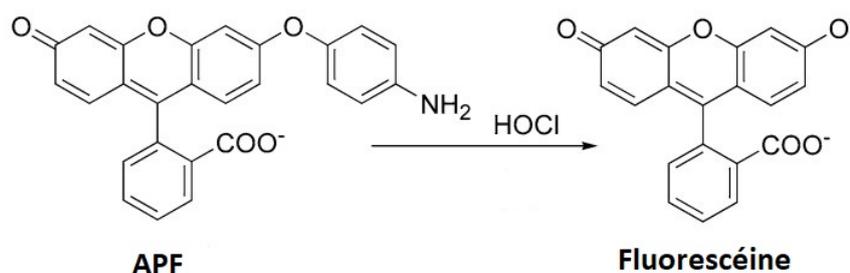


FIGURE 2.8 – Réaction de l'APF avec l'acide hypochloreux pour donner la molécule fluorescente, la fluorescéine. Schéma modifié à partir d'une image originale de Pierzchala et al. [177]

## 2.2 Etude de l'action des molécules d'intérêt sur l'activité oxydante des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs)

Les PMNs sont les cellules immunitaires les plus représentées au niveau du site inflammatoire. Leur rôle consiste à y apporter diverses enzymes cytotoxiques dont la MPO. En collaboration avec ces enzymes, les PMNs vont produire des espèces oxydantes comme des ROS et des radicaux. L'activité des PMNs est étroitement liée à l'activité oxydante de la MPO. En effet, en plus de libérer l'enzyme via le processus de dégranulation, les cellules produisent, lors du processus de flambée respiratoire, l'anion superoxyde. Ce ROS est le précurseur du peroxyde d'hydrogène, substrat naturel de l'enzyme.

Parmi les nombreux processus liés aux PMNs (phagocytose, nérose,...), cette étude s'est intéressée plus particulièrement aux deux mécanismes en relation avec la MPO : la production d'anions superoxydes et la libération de MPO. L'action inhibitrice des molécules d'intérêt a été évaluée grâce à différentes expériences de luminescence et de spectroscopie d'absorption et de fluorescence.

### 2.2.1 Isolement des PMNs

Pour les différentes expériences utilisant les PMNs, reprises ci-dessous, les cellules ont été isolées à partir de sang complet de cheval. Les chevaux sains proviennent de la clinique équine de l'Université de Liège. Ils sont dédiés à l'observation et à la formation des étudiants et ne prennent aucun traitement pouvant interférer avec les expériences menées. Le sang de cheval a été préféré pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le prélèvement et l'utilisation de sang humain implique l'établissement d'un protocole plus contraignant. La collaboration du laboratoire du CORD (Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement, ULiège), où les différentes expériences ont été menées, avec la clinique vétérinaire permet un accès rapide au sang équin. Enfin et surtout, l'utilisation de sang de cheval peut se justifier car le système immunitaire du cheval est comparable à celui de l'homme. Les PMNs équins contiennent un complexe NADPH oxydase et une myéloperoxydase quasi identiques aux enzymes humaines. Au vu des similitudes entre la réponse immunitaire à diverses pathologies inflammatoires chez l'homme et chez le cheval, ce dernier peut être utilisé comme modèle animal. [178, 179, 180]

Les PMNs sont isolés selon la méthode de Pycocock *et al* [181], avec un gradient de Percoll, et leur concentration est déterminée par comptage à l'aide d'un microscope optique (voir annexe D).

### 2.2.2 Viabilité cellulaire

Avant d'étudier l'effet des molécules d'intérêt sur divers mécanismes des PMNs, il est nécessaire de connaître l'impact qu'ont ces composés sur la viabilité des cellules.

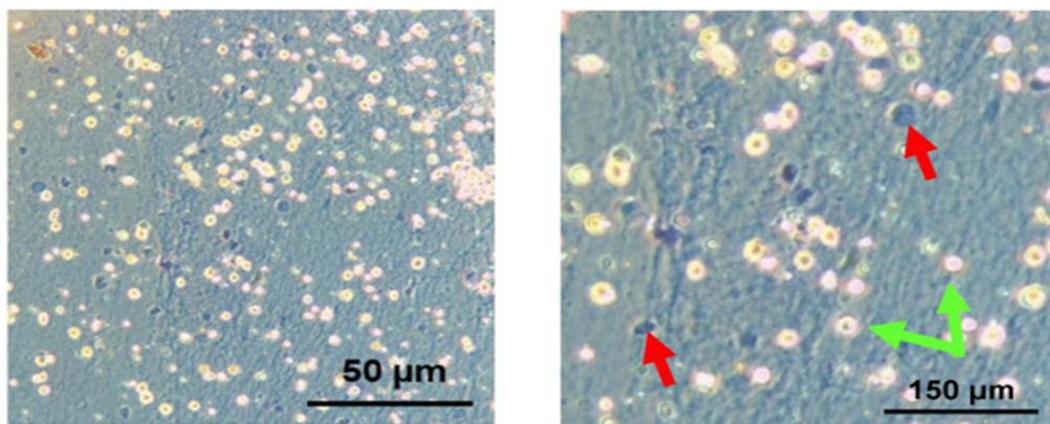


FIGURE 2.9 – Test d'exclusion au bleu trypan : viabilité de cellules gliales (cellules de Müller). Les cellules vivantes apparaissent en blanc (flèches vertes) et les cellules mortes apparaissent en bleu (flèches rouges). L'image originale est de Nweze et al. [182].

Ce taux de viabilité des PMNs incubés avec les différentes molécules d'intérêt est évalué grâce au test d'exclusion au bleu trypan (figure 2.9). Ce test se base sur la capacité qu'ont les cellules vivantes, (ayant donc une membrane plasmique intacte), d'empêcher des molécules de colorant de traverser leur membrane et de colorer leur cytoplasme. Au contraire, les cellules mortes, dont la perméabilité membranaire a augmenté, se colorent. En comparant le nombre de cellules colorées en bleu au nombre total de cellules, il est possible de déterminer la viabilité d'une suspension cellulaire [183, 184].

### 2.2.3 Inhibition de la production d'anions superoxydes

Réduire, voire inhiber, la production d'anions superoxydes est un moyen d'impacter l'activité oxydante des PMNs et, par extension, de la MPO en interférant dans la production de son substrat naturel, le peroxyde d'hydrogène. L'action inhibitrice des différentes molécules d'intérêt a été évaluée grâce à deux expériences de luminescence.

Au cours d'une première série de mesures, les PMNs sont incubés pendant dix minutes en présence des différentes molécules d'intérêt. La production d'anions superoxydes par les cellules est ensuite évaluée grâce à la chimiluminescence de la sonde L-012. Cette première expérience permet de mettre en évidence la diminution de la production d'anions superoxydes induite par l'incubation des cellules avec les molécules d'intérêt, en mesurant la décroissance du signal de luminescence. Comme celles-ci restent en solution durant la mesure, on ne peut pas distinguer leur mécanisme d'action. En effet, certains composés pourraient agir sur les cellules elles-mêmes et, notamment, sur le complexe NADPH oxydase et réduire la formation de l'espèce réactive de l'oxygène. D'autres molécules pourraient agir comme piègeurs de l'anion superoxyde, une fois celui-ci produit par les cellules. Enfin, les molécules pourraient cumuler les deux mécanismes d'action.

Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme des molécules ayant montré une action lors de la première expérience, une seconde série de tests a été réalisée. Au mode opératoire de

la première expérience s'ajoute une étape de centrifugation de la solution de PMNs et d'élimination du surnageant, avant la remise en suspension des cellules et leur activation. Cette étape permet d'éliminer les molécules d'intérêt qui n'ont pas interagi avec les PMNs. En effet, les molécules peuvent potentiellement pénétrer la membrane plasmique, voire même atteindre le cytoplasme, ou du moins interagir avec la membrane. Dans ces différents cas, les molécules ne seront pas éliminées par la centrifugation et pourront maintenir leur action inhibitrice sur la production d'anions superoxydes et par conséquent impacter la luminescence de la sonde L-012. Dans le cas contraire, les molécules restées en solution sont éliminées avec le surnageant et ne peuvent donc plus impacter la concentration en anions superoxydes produits par l'activation des cellules.

### 2.2.4 Inhibition de la dégranulation

Sur le site inflammatoire, l'activation des PMNs provoque le phénomène de dégranulation, consistant en la libération des enzymes cytotoxiques contenues dans les granules cytoplasmiques. Inhiber la dégranulation des PMNs permet d'empêcher la libération de la MPO dans le milieu extracellulaire et de prévenir ainsi son impact oxydant.

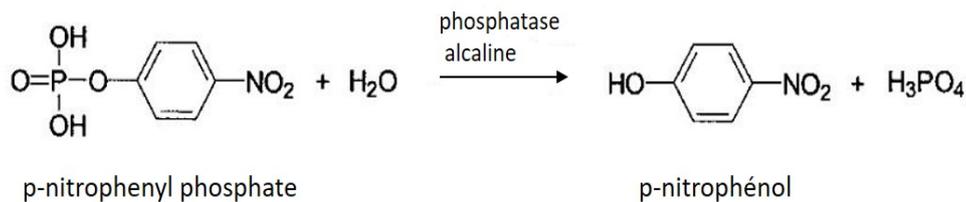


FIGURE 2.10 – Réaction du p-nitrophenylphosphate avec la phosphatase alcaline et formation du p-nitrophénol. Schéma original de R. L. Dean [185]

La première étape de l'expérience consiste à activer les PMNs et permettre le déclenchement du mécanisme de dégranulation, en présence des diverses molécules d'intérêt. Le surnageant contenant l'ensemble des enzymes libérées par les différents granules cellulaires est récolté. La quantité de MPO libérée par les PMNs activés est alors mesurée par un test ELISA [186] à trois anticorps (voir Annexe D). Un premier anticorps permet de capter et fixer la MPO présente dans le surnageant. Ensuite, un second se fixe à la MPO et permet la fixation d'un troisième lié à une autre enzyme appelée la phosphatase alcaline. Celle-ci pourra alors interagir avec le p-nitrophenylphosphate (pNPP), composé incolore, et le diviser en p-nitrophénol (pNP) et en une molécule de phosphate (figure 2.10). Le pNP est coloré et présente un spectre d'absorption avec un maximum à 405 nm. Il peut, par conséquent, être détecté par spectroscopie d'absorption. Si les molécules d'intérêt réduisent, voire inhibent, la libération de MPO, l'enzyme ne sera pas fixée par le système d'anticorps. Ces anticorps et la phosphatase alcaline seront donc éliminés lors des étapes de lavage. Le pNPP ne sera pas transformé et aucune augmentation de l'absorbance ne sera observée à 405 nm.

### 2.2.5 Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés

Si les molécules d'intérêt ne sont pas capables d'inhiber la libération de MPO par les PMNs, elles peuvent tout de même potentiellement inhiber l'activité oxydante de l'enzyme. C'est pourquoi une expérience SIEFED a été réalisée avec la MPO dégranulée. Le SIEFED (Specific Immunological Extraction Followed by Enzyme Detection) est une technique de détection immunologique mise au point par le laboratoire du CORD de l'ULiège. Elle permet de mesurer

spécifiquement l'activité peroxydasique de la myéloperoxydase et d'évaluer l'impact d'une molécule inhibitrice sur cette activité. Une étape de lavage permet de s'assurer de la capacité d'insertion et de fixation de l'inhibiteur au sein du site actif de l'enzyme (voir section 1.2.1). Les détails du déroulement d'une expérience de SIEFED (figure 2.11) sont décrits en annexe D.

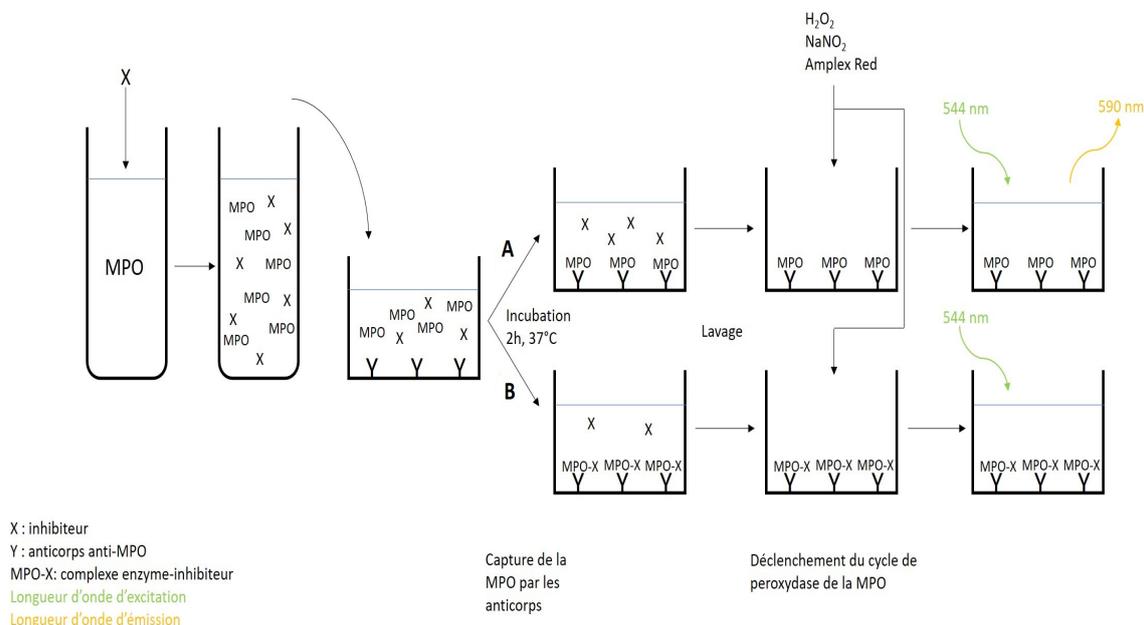


FIGURE 2.11 – Schéma illustrant le principe du SIEFED. **A** : L'inhibiteur ne s'insère pas dans le site actif de la MPO ou du moins n'y forme pas de liaisons résistant à l'étape de lavage. L'absence d'inhibiteur lors du déclenchement du cycle de peroxydase de l'enzyme permet l'oxydation de la sonde Amplex Red et par conséquent sa fluorescence. **B** : L'inhibiteur est capable de s'insérer dans le site actif et de former un complexe avec l'enzyme. L'inhibiteur n'est pas éliminé par l'étape de lavage et empêche par conséquent le peroxyde d'hydrogène d'accéder au site actif. Dès lors, le cycle de peroxydase n'est pas initié et la sonde Amplex Red n'est pas oxydée. Le signal de fluorescence est inhibé.

Tout comme pour le test sur l'inhibition de la dégranulation, les PMNs doivent dans un premier temps être activés en présence des molécules d'intérêt afin de libérer le contenu enzymatique de leurs granules dans le milieu extracellulaire. Le contenu de la dégranulation est incubé dans des puits d'une plaque 96 puits, dont le fond est recouvert d'anticorps. La MPO peut alors se fixer à ceux-ci et les molécules d'intérêt, si elles en sont capables, peuvent s'insérer et se lier dans le site actif de l'enzyme. Une phase de lavage permet ensuite d'éliminer la MPO non fixée, les molécules d'intérêt n'ayant pas interagi avec l'enzyme (plus précisément, les molécules ne s'étant pas insérées et fixées de façon suffisamment forte dans le site actif), ainsi que le reste du contenu de la dégranulation. Ensuite, l'ajout de  $H_2O_2$  permet de déclencher la formation du composé I (voir section 1.2.2). Celui-ci va alors être réduit par un substrat, le  $NaNO_3$ , pour former le composé II. Celui-ci pourra par la suite oxyder une sonde, l'Amplex Red, en résorufine, une molécule fluorescente (figure 2.12). En excitant alors la molécule avec un rayonnement de longueur d'onde adaptée (544 nm), celle-ci émet un rayonnement de fluorescence à 590 nm. Le signal de fluorescence sera maximal pour le contrôle MPO (enzyme en absence de molécule d'intérêt). Si la molécule d'intérêt est capable de s'insérer dans le site actif de la MPO ou dans le canal d'accès, pour y former des liaisons avec un ou plusieurs acides aminés et que celles-ci résistent à l'étape de lavage, elle pourrait empêcher l' $H_2O_2$  d'accéder au site actif, en fonction de son point de liaison ou par effet stérique. Dans ce cas, le peroxyde d'hydrogène ne pourrait pas interagir avec le noyau de fer de l'hème et l'histidine 95

pour déclencher le cycle de peroxydase de l'enzyme. La molécule d'intérêt pourrait également empêcher l'insertion d'autres substrats comme le  $\text{NaNO}_3$  ou l'Amplex Red. Si la molécule d'intérêt n'est pas capable de se lier ou si la ou les liaisons ne résistent pas à l'étape de lavage, elle est éliminée et ne contrecarre pas l'oxydation de l'Amplex Red. Le SIEFED permet donc d'obtenir des informations intéressantes sur l'action anticatalytique des inhibiteurs analysés.

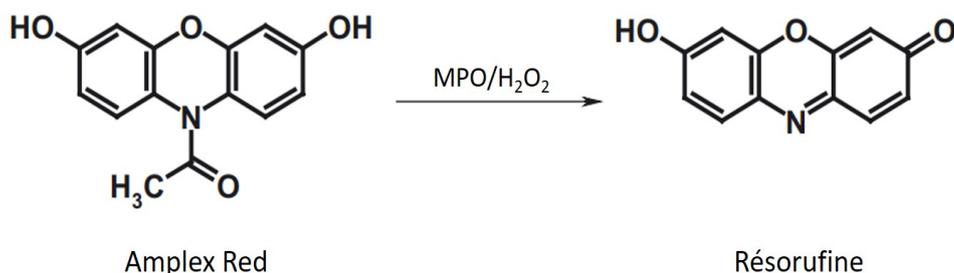


FIGURE 2.12 – Oxydation de l'Amplex Red en résorufine par la MPO. Schéma original de Ivanec-Goranina et al. [187].

Les résultats obtenus grâce à cette expérience offrent des informations partielles sur le mode d'interaction entre la MPO et les molécules d'intérêt. En effet, si les molécules sont éliminées lors de l'étape de lavage, cela indique seulement qu'il n'y a pas de formation de liaisons suffisamment fortes entre la molécule et le site actif de l'enzyme. Les molécules pourraient malgré tout s'insérer dans la cavité, s'approcher suffisamment de l'hème et potentiellement échanger des électrons avec les composés intermédiaires de l'enzyme (voir sections 1.2.2 et 1.3.3). D'autres expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer la capacité réelle d'interaction entre les molécules d'intérêt et la MPO. Elles sont décrites dans les sections suivantes. Il faut aussi tenir compte, pour cette expérience de SIEFED (réalisée sur le contenu de la dégranulation des PMNs) de la présence d'un ensemble de molécules et d'enzymes libérées qui peuvent interférer avec cette interaction lors de l'étape d'incubation. Cependant, ces conditions se rapprochant de celles atteintes *in vivo*, elles permettent d'évaluer si les molécules pourront inhiber la MPO dans l'organisme.

## 2.3 Etude de l'action des molécules d'intérêt sur l'activité oxydante de la myéloperoxydase

La MPO est définie comme marqueur de l'inflammation. Nombre de pathologies inflammatoires sont caractérisées par une libération excessive de l'enzyme par les PMNs, se traduisant notamment par une augmentation de sa concentration plasmatique (voir section 1.3). De nombreuses études portent sur la recherche d'inhibiteurs de l'enzyme. Afin de compléter les résultats obtenus avec le SIEFED réalisé sur la MPO dégranulée et comprendre plus précisément le mode d'inhibition des molécules d'intérêt, différentes expériences ont été réalisées sur de la MPO humaine purifiée. Dans le cadre de ce travail, différents phénomènes ont été analysés : l'insertion des molécules dans le site actif, leur interaction ainsi que leur impact sur les deux cycles oxydants de la MPO (cycles de peroxydase et de chloration).

### 2.3.1 Modélisation moléculaire - Docking

L'insertion des molécules d'intérêt à l'intérieur du site actif de la MPO a tout d'abord été étudiée par modélisation moléculaire (voir annexe E). Cette technique numérique permet d'obtenir des renseignements sur la formation potentielle de complexes entre les molécules

étudiées et l'enzyme. Des informations sur le positionnement de la molécule au sein de la cavité et sur les interactions avec différents éléments la composant (acides aminés, hème, noyau de fer) peuvent être obtenues. Il est important de garder à l'esprit que le *docking* seul n'est pas suffisant pour tirer des conclusions quant à l'interaction des molécules avec la MPO. La modélisation ouvre seulement des pistes et offre des prédictions sur la conformation du système MPO-ligand. Celles-ci doivent être associées et vérifiées par différentes voies expérimentales dont celles décrites dans les sections suivantes.

La modélisation moléculaire des complexes MPO-inhibiteurs est réalisée avec le programme GOLD [188] (voir annexe D). L'accès à distance à ce programme via la plateforme PTCI (Technological Platform in High Performance Computing) a été possible grâce au concours du Professeur J. Wouters (Unité de Chimie Physique Théorique et Structurale, UNamur). Pour chaque molécule d'intérêt, la modélisation est réalisée à cinq reprises. Les solutions de complexes les plus fréquemment obtenues, et donc les plus probables, sont retenues. Le positionnement du ligand au sein de la cavité du site actif permet également de prédire de potentielles liaisons (pont hydrogène, empilement  $\pi$ - $\pi$ , etc.) avec les différents éléments du site (acides aminés, noyau de fer).

### 2.3.2 Interaction avec le cycle de peroxydase

Grâce à son cycle de peroxydase, la MPO peut oxyder une grande variété de substrats afin de former des espèces radicalaires (voir section 1.2.2.2). Le cycle de peroxydase étant l'activité dominante de l'enzyme à pH neutre et basique [54, 189], l'action inhibitrice des molécules d'intérêt sur le cycle de peroxydase est observée à pH 7,4.

Pour cette expérience, appelée analyse classique dans la discussion des résultats, le cycle de peroxydase de la MPO humaine est activé en présence des molécules d'intérêt. En effet, l'ajout de  $H_2O_2$  permet la formation du composé I. Celui-ci va alors être réduit par du  $NaNO_3$  pour former le composé II. Ce composé peut ainsi oxyder la sonde Amplex Red en résorufine (figure 2.12). Celle-ci peut ensuite être excitée avec un rayonnement de longueur d'onde à 544 nm afin d'émettre un rayonnement de fluorescence à 590 nm. Les molécules d'intérêt présentes en solution peuvent interagir avec l'enzyme (liaison avec le site actif et/ou interaction comme substrat dans le cycle de peroxydase) et interférer avec l'oxydation de la sonde, ce qui induira une diminution du signal de fluorescence.

### 2.3.3 Interaction avec le cycle de chloration

Parmi les peroxydases, la MPO est caractérisée par une propriété unique : la catalyse de la formation d'acide hypohalogéneux à partir des ions halogénures associés (voir section 1.2.2.1). La concentration en ions chlorure étant la plus élevée dans le sang, l'acide hypochloreux (HOCl) est la principale espèce oxydante produite par la MPO. Le cycle de chloration est favorisé à pH acide [54]. C'est pourquoi, dans un premier temps, l'action inhibitrice des molécules d'intérêt sur ce cycle est étudiée à pH 5,5, caractéristique du phagolysosome et de certaines lésions inflammatoires, comme les lésions d'athérosclérose [77, 101]. Bien que le cycle de chloration soit défavorisé par rapport au cycle de peroxydase à pH neutre, le HOCl peut tout de même être produit dans le milieu extracellulaire, où il provoquera des dégâts aux tissus avoisinants. C'est pourquoi l'action inhibitrice des molécules test sur le cycle de chloration est également étudiée à pH 7,4.

Tout comme pour l'analyse de l'impact des molécules d'intérêt sur le cycle de peroxydase, l'activation de la MPO est réalisée par l'ajout de  $H_2O_2$  permettant la formation du composé I.

La présence d'ions chlorure en solution permet de dévier l'enzyme vers son cycle de chloration. En effet, le composé I réagit avec les ions  $\text{Cl}^-$  présents dans le tampon pour former le HOCl. La sonde, l'APF, pourra alors être oxydée par le HOCl en fluoescéine, une molécule fluorescente (figure 2.8). Ensuite, en excitant la molécule avec un rayonnement de longueur d'onde adaptée (490 nm), celle-ci émet un rayonnement de fluorescence à 515 nm. Les molécules d'intérêt présentes en solution peuvent interagir avec l'enzyme (liaison avec le site actif et/ou interaction comme substrat pour le composé I), interférer avec la production du HOCl et inhiber le signal de fluorescence. Il est également possible que les molécules d'intérêt puissent agir comme piègeurs du HOCl. C'est pourquoi les résultats obtenus grâce à cette expérience doivent être associés à ceux acquis lors de l'étude du piégeage du HOCl (voir section 2.1.5).

#### 2.3.4 SIEFED

Si les molécules d'intérêt sont capables d'inhiber les cycles de chloration et de peroxydase de la MPO, cela démontre leur capacité à atteindre le site actif de l'enzyme. En effet, l'échange d'électrons entre les inhibiteurs et les composés redox de l'enzyme nécessite une proximité entre le site actif et les molécules. Il est donc intéressant d'évaluer leur capacité d'insertion dans le site actif et leur positionnement. Par conséquent, la formation de liaisons et la constitution d'un complexe inhibiteur-MPO ont également fait l'objet d'une évaluation expérimentale par SIEFED. Ces résultats peuvent alors être mis en relation avec ceux obtenus grâce au *docking*.

Une seconde expérience de SIEFED a été réalisée sur de la MPO humaine purifiée. Elle permet d'étudier l'insertion et la liaison des molécules d'intérêt dans le site actif de l'enzyme, cette fois-ci sans influence extérieure comme cela pourrait être le cas en milieu cellulaire (voir section 2.2.5).

Un test ELISA est réalisé sur la MPO humaine purifiée avec les molécules d'intérêt ayant montré une capacité inhibitrice en SIEFED, afin de s'assurer que l'action observée soit due à l'insertion et la liaison des molécules au sein du site actif de la MPO et non à l'incapacité de l'enzyme de se lier aux anticorps se trouvant au fond des puits la plaque de mesure (voir section 2.2.5).





---

## Résultats et discussion

---



## Chapitre 3

# Morphine

La morphine est le premier alcaloïde connu de l'opium, substance extraite de la capsule des graines du pavot somnifère (*Papaver Somniferum*), dont les propriétés analgésiques et sédatives sont connues et utilisées depuis l'Antiquité. La morphine a été découverte et isolée de l'opium pour la première fois en 1817 par le médecin allemand F. W. Sertürner [190]. Son nom a pour origine Morphée, le dieu grec des rêves.

La morphine fait partie des molécules analgésiques les plus utilisées cliniquement pour traiter, c'est-à-dire atténuer, soulager et prévenir, les douleurs modérées à sévères. Elle est également employée en soins intensifs et palliatifs pour soulager la douleur ainsi que comme soutien à la sédation. Elle est administrée aux patients sous forme de morphine chlorhydrate. Différentes voies d'administration sont possibles, par voie orale (comprimés, gélules, gouttes, sirop), sous-cutanée ou intraveineuse. [191] La morphine est l'analgésique de référence par rapport auquel est comparée l'action des autres antalgiques, bien qu'il ne soit pas le plus puissant. Une utilisation non adaptée et non contrôlée de la morphine peut provoquer une dépendance physique. Par conséquent, cette molécule est classée comme stupéfiant et son utilisation est de ce fait réglementée.

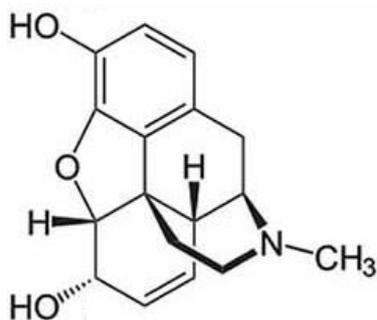


FIGURE 3.1 – Structure de la morphine. Image originale de Ouzzine et al. [192]

### 3.1 Propriétés physico-chimiques

La morphine, (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ )-7,8-didéhydro-4,5-époxy-17-méthyl morphinan-3,6-diol, est un alcaloïde phénanthrène de l'opium. Elle est donc composée d'hétérocycles, dont un est azoté, et a pour formule chimique empirique C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>. Sa masse molaire est de 285,34 g/mol. Ayant un point de fusion de 255°C, elle se présente sous forme solide à température ambiante.

La forme cristalline est très peu soluble dans l'eau, l'éther et le chloroforme, mais l'est dans les alcools comme le méthanol et dans les solutions aqueuses d'hydroxydes alcalins (NaOH, KOH,...) [193]. En clinique, la morphine est utilisée sous forme de chlorhydrate, soluble dans l'eau et dans l'alcool. Elle est caractérisée par un pKa de 9,9 (phénol) et un pKa de 8,2 (amine) [194].

### 3.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

La partie phénolique de la morphine est essentielle pour les propriétés antidouleur de la molécule. En effet, le groupement hydroxyle permet sa liaison aux récepteurs morphiniques  $\mu$ . Ceux-ci font partie d'une famille de récepteurs opioïdes ( $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\delta$ ), largement distribués dans le système nerveux (cortex cérébral, tronc cérébral, thalamus, moelle épinière, récepteurs périphériques) et au niveau du système gastro-intestinal [195]. Ils permettent de moduler différentes fonctionnalités telles que le contrôle des émotions, la perception de la douleur et la réponse au stress. Ces récepteurs sont situés sur la structure présynaptique. En s'y liant, la morphine déclenche l'activité d'une protéine G, couplée au récepteur. Celle-ci induit une succession de mécanismes permettant notamment d'inhiber les canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi que l'enzyme adénylyl-cyclase et de stimuler l'ouverture des canaux  $\text{K}^+$ . L'inhibition de l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et l'augmentation de la conductance membranaire des ions  $\text{K}^+$  provoquent la diminution de l'excitabilité neuronale et de la libération de neurotransmetteurs vers la structure postsynaptique, empêchant ainsi la transmission du signal électrique associé au message de la douleur [196, 197].

A la suite de l'administration de la morphine à un patient, le pic de concentration plasmatique est atteint 15-20 minutes après injection ou 30-90 minutes après administration orale. Le délai plus long lors de la prise orale s'explique par le phénomène de métabolisation de premier passage. En effet, la morphine ingérée va d'abord passer dans le foie, où la métabolisation hépatique transforme une grande proportion de molécules (50-60%), avant de passer dans le sang [198, 199, 200]. Différentes études ont montré que la concentration plasmatique maximale en morphine varie également en fonction du mode d'administration. Les valeurs sont de l'ordre de  $1 \mu\text{M}$  ou inférieures [201, 202, 203]. Une fois absorbée, la morphine est rapidement distribuée et traverse la barrière hémato-encéphalique pour aller se lier aux récepteurs opiacés.

Il existe plusieurs voies de métabolisation de la morphine, dont deux font intervenir des systèmes enzymatiques : la UDP-glucuronosyltransférase (UGT2B7) et le cytochrome P450. La voie principale est la glucuronidation au niveau des microsomes du foie par l'isoenzyme UGT2B7. Entre 50 et 60 % de la morphine est transformée en morphine-3-glucuronide et environ 10% en morphine-6-glucuronide (figure 3.2). En plus petite proportion, le cytochrome P450 provoque la N-diméthylation de la molécule pour la transformer en normorphine. La morphine peut également être transformée en codéine et hydromorphone. La morphine-6-glucuronide est aussi capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et présente une action analgésique plus puissante que la morphine elle-même [200, 204, 205].

La morphine et ses métabolites sont éliminés de l'organisme par voie urinaire avec un temps de demi-vie variant entre 1,4 et 3,4 heures [199].

### 3.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

La présence d'un groupement phénol dans la structure de la morphine représente un argument en faveur d'une potentielle activité antioxydante. Borges et al. [206] ont utilisé le calcul

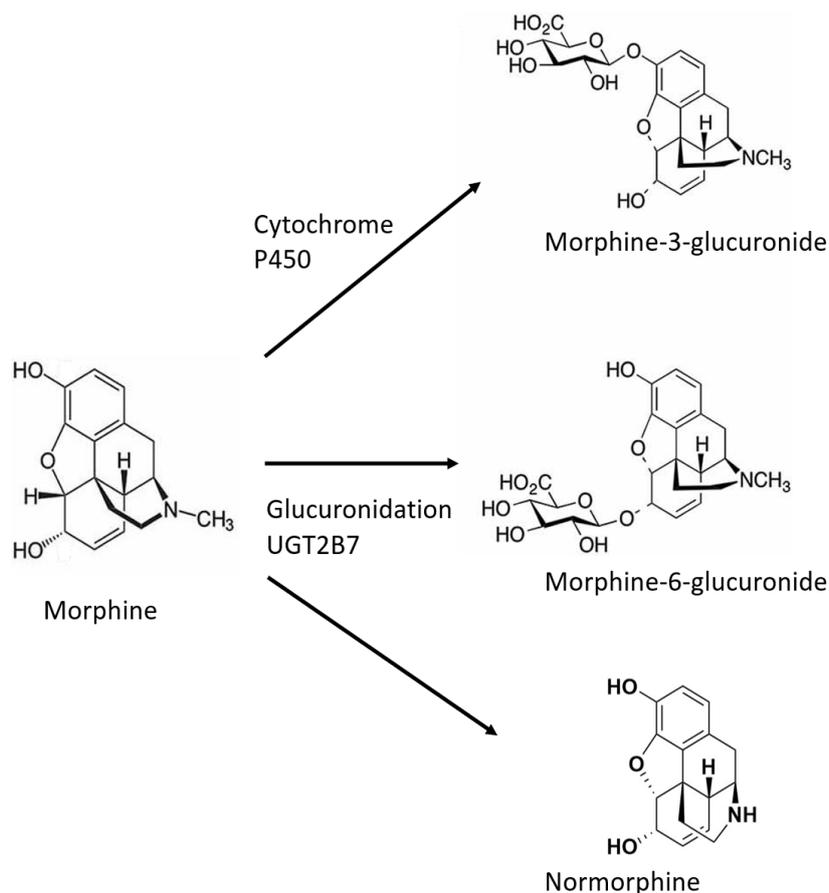


FIGURE 3.2 – Voies de métabolisation de la morphine. Image inspirée de Ouzzine et al. [192]

de DFT (la théorie de la fonctionnelle de la densité) pour établir un lien entre la structure, la configuration électronique de la molécule et son activité antioxydante. Les groupements amines et phénols favorisent la cession d'un électron et d'un atome d'hydrogène respectivement. Les groupements alkyles et éthers substitués sur le cycle phénolique et la structure cyclique sont importants pour la stabilisation de l'état radicalaire de la morphine lors de l'abstraction d'un électron, par effet de résonance.

De nombreux articles ont traité de l'investigation de l'action antioxydante de la morphine. L'étude *in vitro* de Gülçin et al. [207] montre que la molécule présente une action réductrice et antioxydante dose-dépendante aussi efficace (voire plus, dans certains cas) que celle des antioxydants phénoliques de référence, le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA). Elle est capable de piéger des radicaux libres comme le DPPH $\cdot$ , des espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, et de complexer des métaux de transition.

Une étude réalisée sur des cellules du tissu cérébral, les neuroblastomes, a notamment dévoilé que la morphine présente une activité neuroprotectrice contre la maladie de Parkinson, grâce notamment à sa capacité de réduction des ROS [208, 209]. La morphine, à concentration physiologique, réduit le stress oxydatif dans des cellules gliales [210]. Globalement, la morphine montre une action neuroprotectrice, en faisant intervenir une succession de mécanismes repris dans l'article de Lu et al. [211]. L'action antioxydante de la morphine a également été démontrée lors de son interaction directe avec le peroxyde d'azote ONOO $^-$ , un puissant oxydant

produit dans les cellules et qui peut provoquer de sévères lésions au niveau des tissus ou de l'ADN [212, 213]. Les opioïdes induisent une action protectrice contre les conséquences de l'ischémie-reperfusion au niveau du coeur et d'autres organes. L'administration de morphine diminue les dégâts oxydatifs dus à l'ischémie-reperfusion au niveau du coeur chez le rat et au niveau des reins chez le lapin [214, 215, 216, 217]. La morphine a montré une action anti-inflammatoire lors de l'injection intra-articulaire chez des chevaux souffrant de synovite [218]. De façon similaire, l'injection de morphine chez des patients souffrant d'arthrite chronique au genou induit une diminution du nombre de leucocytes détectés lors du prélèvement de liquide synovial [219]. La morphine est également capable d'inhiber légèrement la dégranulation des leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires [220], ainsi que leur production d'anions superoxydes [221]. Récemment, des modèles *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité immunomodulatrice de la morphine lors du traitement de la Covid19 en atténuant la tempête cytokinique [222]. Des études ont également révélé que la morphine peut avoir un impact sur différents types de cancer. Cependant, tous les mécanismes ne sont pas élucidés. Plus précisément, l'intervention des récepteurs opioïdes ou d'autres récepteurs n'est pas entièrement établie [223]. Par exemple, la morphine peut inhiber la prolifération de différentes lignées de cellules cancéreuses du sein (T47D [224], MCF-7 [225]), notamment en induisant leur apoptose. La morphine présente également des effets similaires sur le cancer de la prostate [226] ou encore le cancer du poumon [227].

Cependant, des études ont également révélé le caractère pro-oxydant de la morphine, en fonction notamment de sa concentration et des conditions redox du milieu. Par exemple, l'administration de morphine chez les lapins provoquerait une augmentation de la peroxydation lipidique, dégradant les chaînes d'acides gras au niveau du cerveau, en amplifiant la production de ROS [228]. Une autre recherche indique que l'administration de hautes concentrations de morphine peut endommager la paroi interne des vaisseaux sanguins en augmentant la production d'anions superoxydes [229]. L'utilisation chronique de morphine peut conduire à des dommages oxydatifs dans le foie de souris [230]. Il a également été montré que des patients soumis à une consommation prolongée d'opioïdes comme la morphine ou des personnes dépendantes présentent un système immunitaire affaibli et sont plus susceptibles de développer des pathologies infectieuses (pathologies respiratoires, hépatites, maladies sexuellement transmissibles). La morphine réduit notamment le recrutement et la prolifération des macrophages et des lymphocytes dans les tissus. L'utilisation chronique réduit également la phagocytose des macrophages, ainsi que leur capacité à libérer de l'anion superoxyde et de l'oxyde nitrique [231, 232, 233]. Si des études ont montré la capacité de la morphine à limiter, voire réduire la prolifération de cellules cancéreuses du sein [224, 225], d'autres ont révélé, en revanche, que la morphine favorise la progression du cancer du sein en promouvant l'angiogenèse [234].

### 3.4 Choix de la morphine dans le cadre de cette étude

La morphine est une des molécules analgésiques les plus couramment utilisées en clinique, pour le traitement des douleurs chroniques, post-opératoires et comme soutien à l'anesthésie dans les unités de soins intensifs. Elle est notamment employée pour traiter des douleurs liées à diverses situations et pathologies inflammatoires (cancer [235, 236], arthrite [219, 237], maladie inflammatoire chronique de l'intestin [238, 239]). De nombreuses études ont montré les capacités antioxydantes et immunomodulatrices de la morphine. Cette molécule peut notamment réduire la prolifération de macrophages et de leucocytes au niveau des sites inflammatoires [219, 233], réduire leur capacité de phagocytose et de libération de ROS [221, 233]. Il est donc intéressant de compléter l'investigation de son action sur différents éléments du processus inflammatoire. Tout d'abord, la morphine peut-elle piéger différents ROS produits lors de

l'inflammation (anion superoxyde, oxygène singulet, HOCl) ? Peut-elle agir sur le complexe NADPH oxydase pour réduire la production d'anions superoxydes par des PMNs activés ? L'action de la morphine sur le phénomène de la dégranulation de la MPO mérite également d'être analysée. Enfin, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'action potentiellement anti-inflammatoire de la morphine, consistant à inhiber l'action oxydante de la myéloperoxydase, marqueur de l'inflammation.

## 3.5 Etude de l'action réductrice et antioxydante de la morphine

### 3.5.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Afin de pouvoir comprendre et expliquer les propriétés antioxydantes et réductrices d'une molécule, il est important d'évaluer son potentiel d'oxydoréduction. Les propriétés redox des composés chimiques sont fortement dépendantes de la composition et du pH du milieu. Au cours de ce travail, la majorité des expériences a été réalisée dans du tampon phosphate pH 7.4. Grâce à la voltammétrie cyclique, le potentiel d'oxydoréduction de la morphine a été estimé dans ces conditions, simulant le pH physiologique (voir annexe D).

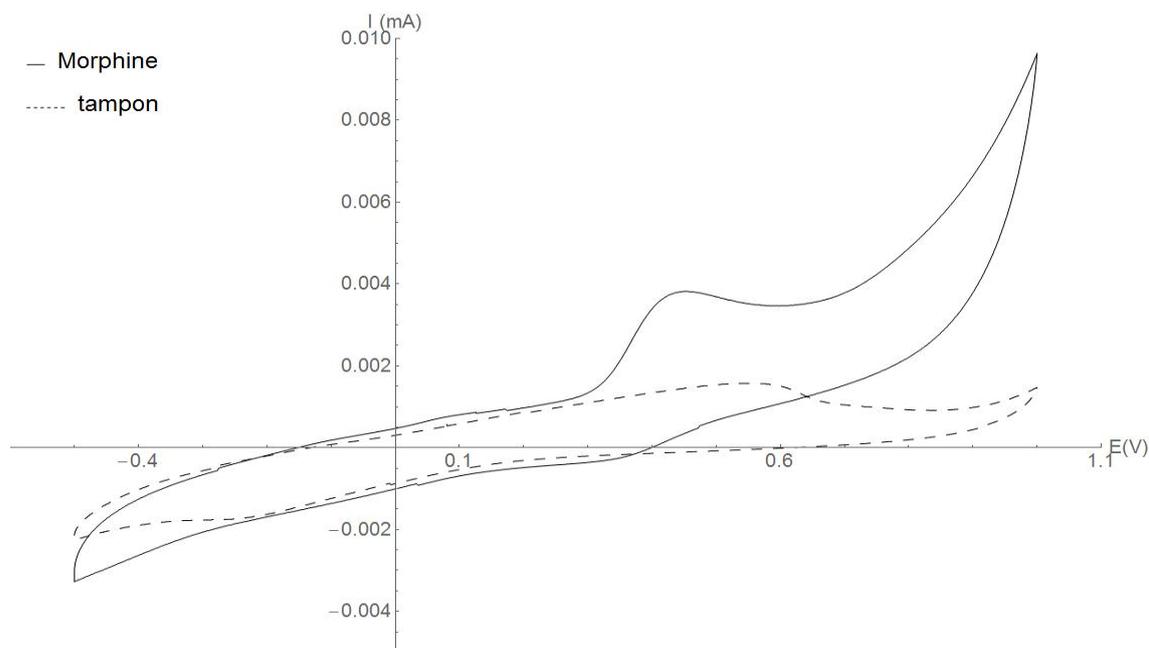


FIGURE 3.3 – Voltammogramme de la morphine (1 mM) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe noire) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée (SCE). Voltammogramme du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée).

La figure 3.3 montre le voltammogramme de la morphine. Un pic d'oxydation apparaît à 441 mV. Il est attribué à l'oxydation du groupement phénolique de la molécule [240, 241]. Aucun pic inverse de réduction associé n'est observé. Dans ces conditions expérimentales, l'oxydation de la morphine est un processus irréversible, suivi par une réaction chimique. En effet, l'oxydation de la morphine conduit à la formation d'une structure dimérique, appelée pseudomorphine (figure 3.4) à la suite de l'association de deux radicaux. Ce nouveau composé peut aussi être oxydé puisque il est également composé de deux groupements phénoliques. Comme décrit dans la littérature pour de nombreux composés phénoliques, le mécanisme de

réaction lors de l'électro-analyse de la morphine est un processus ECE (Electron transfer - Chemical reaction - Electron transfer). Garrido et al. ont montré que l'oxydation de la pseudomorphine se produit au même potentiel que celui de la morphine [241].

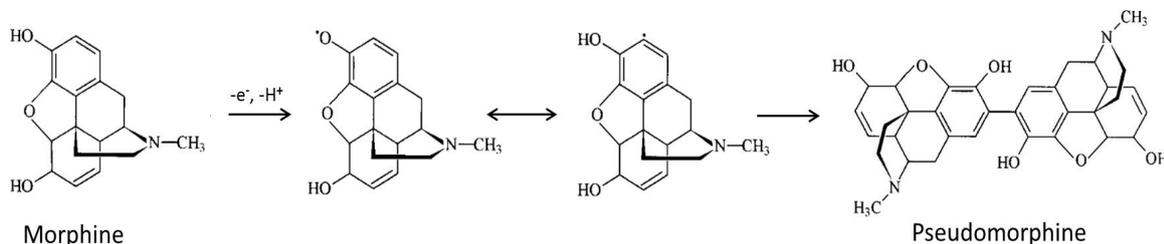


FIGURE 3.4 – Mécanisme de formation du composé appelé pseudomorphine suite à l'électro-oxydation de la morphine. Image modifiée à partir de celle de Garrido et al. [241].

Afin d'évaluer la capacité réductrice de la morphine vis-à-vis de différentes espèces oxydantes comme des ROS et plus particulièrement les composés d'oxydation de la MPO (composés I et II), son potentiel d'oxydoréduction a été estimé. Le processus d'électro-oxydation de la morphine étant irréversible, le potentiel redox ne peut être déterminé précisément. Par conséquent, la méthode d'Espinoza et al. [169] permet d'obtenir une estimation convenable en utilisant le potentiel de demi-pic (voir annexe E). Le potentiel d'oxydoréduction de la morphine est donc estimé à +364 mV vs SCE, soit +608 mV vs ESH (électrode standard à hydrogène).

### 3.5.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS

L'ABTS est fréquemment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante et plus précisément réductrice de composés d'intérêt (voir section 2.1.2). Le potentiel redox du couple  $ABTS^{+\cdot}/ABTS$  a été estimé à +698 mV. Par conséquent, les composés présentant un potentiel redox inférieur sont capables de réduire le radical  $ABTS^{+\cdot}$  en lui cédant un électron. Cela devrait donc être le cas pour la morphine qui est caractérisée par un potentiel d'oxydoréduction de + 608 mV.

La figure 3.5 montre l'action de piégeage de la morphine sur le radical  $ABTS^{+\cdot}$ , produit grâce à l'oxydation de l'ABTS par du persulfate de sodium. L'action réductrice a été mesurée immédiatement après l'ajout de la morphine à la solution d' $ABTS^{+\cdot}$  (couleur pleine) puis après une heure d'incubation dans le noir (couleur quadrillée). La morphine présente une action de piégeage du radical  $ABTS^{+\cdot}$  croissante avec sa concentration. A la plus forte concentration (100  $\mu$ M), la morphine induit une diminution de 45% en radicaux, immédiatement après le déclenchement de l'expérience. Lorsque la concentration diminue à 10  $\mu$ M, l'action de la morphine chute à 17%. Avec le temps, le nombre de radicaux  $ABTS^{+\cdot}$  réduits par la morphine augmente. La molécule conserve une action concentration-dépendante. Aux deux plus hautes concentrations, 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M, l'action de piégeage croît respectivement à 65% et 78%, après une heure d'incubation. La variation d'efficacité est plus faible aux deux plus basses concentrations. Les résultats obtenus sont en accord avec la valeur du potentiel d'oxydoréduction obtenue pour la morphine, qui suggérerait que la molécule puisse réduire le radical  $ABTS^{+\cdot}$ .

L'oxydation du groupement phénol de la morphine explique son activité réductrice sur les radicaux  $ABTS^{+\cdot}$ . Celle-ci est cependant modérée, ce qui peut s'expliquer d'une part par

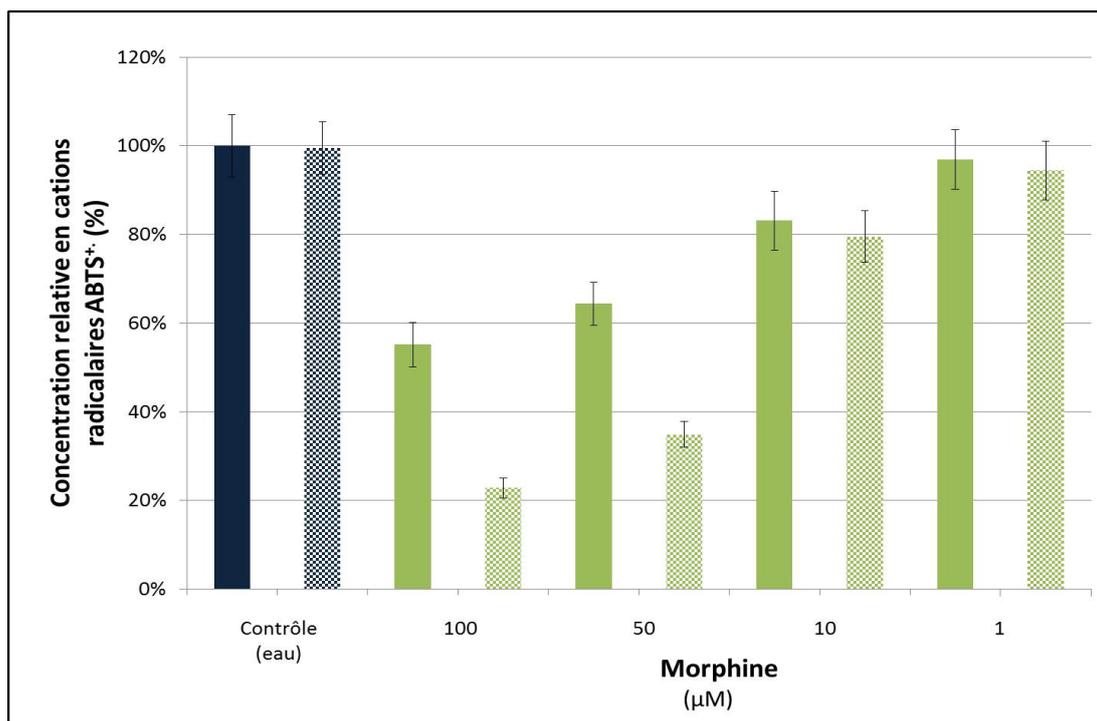


FIGURE 3.5 – Action réductrice de la morphine sur les radicaux ABTS<sup>+</sup> en solution aqueuse. La mesure a été réalisée immédiatement après l’ajout de la solution d’ABTS<sup>+</sup> dans les puits de la plaque de mesure (couleur pleine) et après une incubation d’une heure dans le noir après la première mesure (couleur quadrillée). Le pourcentage de l’activité de piégeage a été calculé par rapport au contrôle, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2 et n=3). Les détails de l’analyse statistique sont repris dans l’annexe D.

la présence d’un seul groupement hydroxyle donneur d’électron et d’autre part par la faible stabilité de l’état radicalaire de la morphine par effet mésomère (résonance) dans un seul cycle aromatique.

### 3.5.3 Etude de l’action de piégeage de ROS - Anion superoxyde

L’activation des PMNs au niveau du site inflammatoire conduit à la production d’anions superoxydes via le processus de flambée respiratoire (voir section 1.1.2). Piéger cette espèce réactive de l’oxygène, précurseur notamment du peroxyde d’hydrogène, substrat naturel de la MPO, permet de réduire l’action oxydante de cette dernière. La capacité de piégeage de l’anion superoxyde par la morphine a été étudiée grâce au système enzymatique, xanthine-xanthine oxydase, par spectroscopie RPE (voir section 2.1.3). L’anion superoxyde étant très réactif, il possède un temps de vie trop court pour être détecté directement en RPE continue à température ambiante, d’où l’utilisation du *spin trap* DMPO afin de former l’adduit de spin stable DMPO-OOH (voir annexe E). Si la morphine est capable de piéger l’anion superoxyde produit par le système enzymatique, l’amplitude du signal RPE de l’adduit DMPO-OOH décroît.

Les résultats obtenus grâce au test RPE sont surprenants au vu de ceux présentés dans la littérature. En effet, aucune diminution de la formation de l’adduit de spin DMPO-OOH n’est observée, quelle que soit la concentration en morphine utilisée (figure 3.6), alors que différentes études [207, 221] ont montré la capacité de la morphine à piéger l’anion superoxyde. La différence de résultats peut s’expliquer par l’interaction entre la morphine et le système producteur de ROS. En effet, la morphine est capable d’augmenter le métabolisme des purines

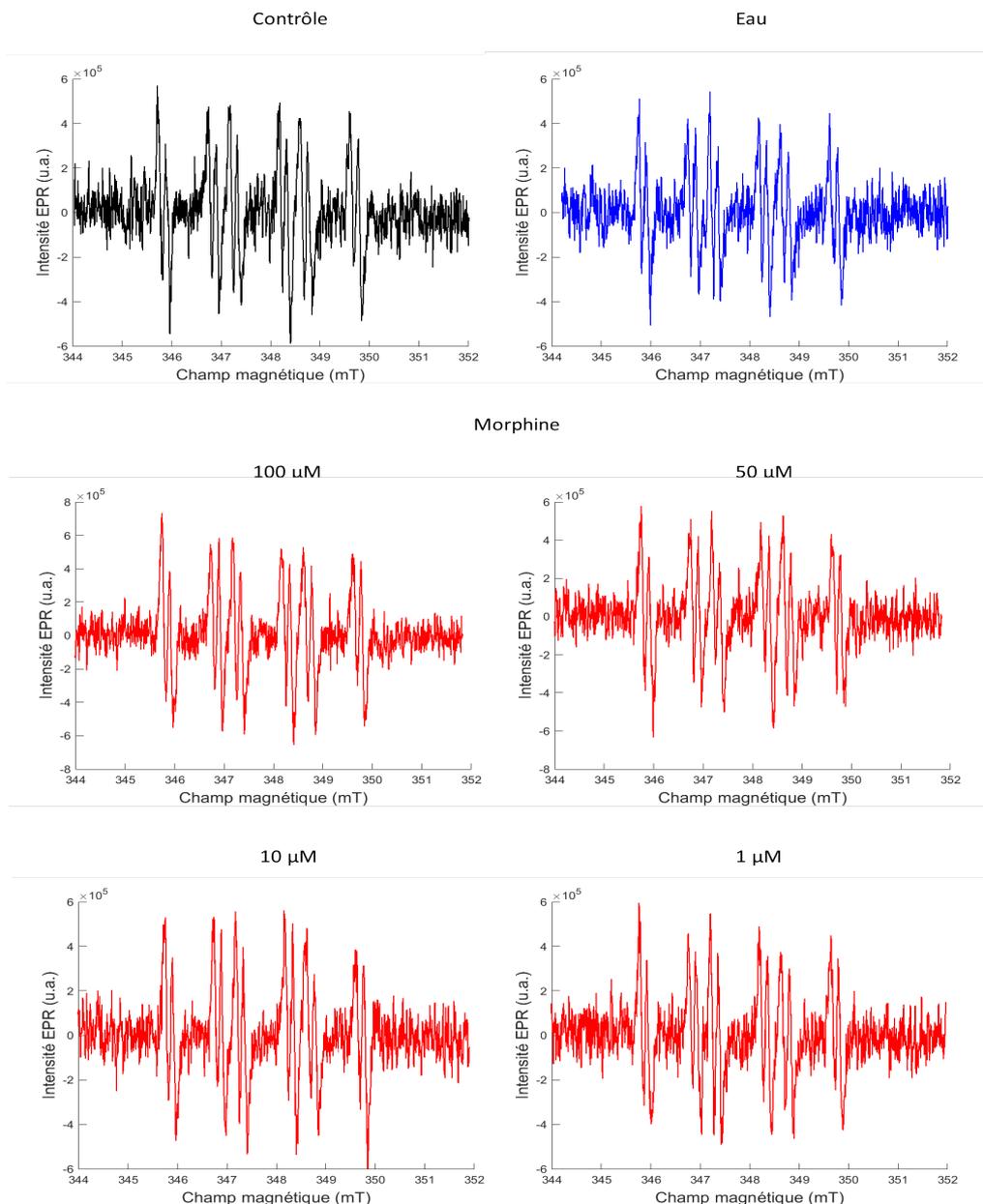


FIGURE 3.6 – Action de piégeage de la morphine sur l’anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

comme la transformation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase, associée à une augmentation de la production en ROS [242, 243]. L’injection de morphine augmenterait la concentration plasmatique en xanthine oxydase. Dans le cadre de ce travail, la concentration en xanthine oxydase est fixe, mais une interaction entre la morphine et l’enzyme pourrait être envisagée, entraînant une surproduction d’anions superoxydes. La capacité de piégeage de la morphine peut être contrebalancée par l’augmentation de la production d’anions superoxydes. Une seconde hypothèse fait intervenir la vitesse de réaction entre le *spin trap* DMPO et l’anion superoxyde. Il est possible que la morphine ne soit pas compétitive par rapport au DMPO pour piéger l’espèce réactive de l’oxygène.

Afin de contrecarrer l’éventuel problème entre la morphine et la xanthine oxydase ou le *spin trap* DMPO, une seconde méthode de production d’anions superoxydes a été envisagée,

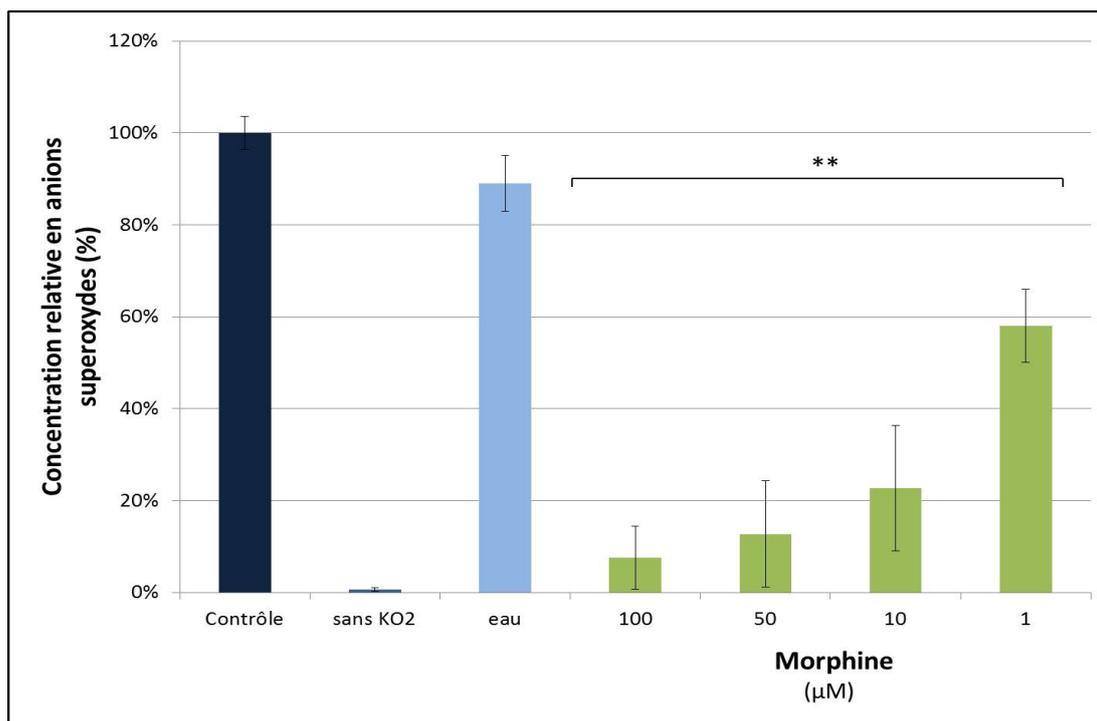


FIGURE 3.7 – Action de piégeage de la morphine sur l’anion superoxyde, produit par la décomposition du  $\text{KO}_2$ . Le pourcentage de piégeage a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=4$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau).

le superoxyde de potassium  $\text{KO}_2$ . En effet, en solution le  $\text{KO}_2$  se dissocie en  $\text{K}^+$  et  $\text{O}_2^-$  [244]. De plus, une autre technique d’analyse, la chimiluminescence, a été choisie. L’anion superoxyde peut oxyder le L-012 et son signal de chimiluminescence peut dès lors être détecté (voir section 2.1.3). La figure 3.7 montre la capacité de piégeage de la morphine sur l’anion superoxyde. Ces résultats sont en accord avec la littérature [207, 221]. Une action de piégeage concentration-dépendante peut être observée. La plus forte concentration en morphine,  $100 \mu\text{M}$ , provoque une inhibition de la concentration en anions superoxydes de 92%. Celle-ci reste toujours importante, 78%, à  $10 \mu\text{M}$  mais chute à 42% à la plus faible concentration testée,  $1 \mu\text{M}$ . En l’absence de perturbation (i.e. sans l’utilisation de la xanthine oxydase comme source de ROS), la morphine est un piègeur efficace de l’anion superoxyde. Dès lors, la morphine pourrait réduire la production du peroxyde d’hydrogène et donc l’activité oxydante de la MPO, en empêchant le déclenchement des cycles de peroxydase et de chloration.

### 3.5.4 Etude de l’action de piégeage de ROS - Oxygène singulet

L’oxygène singulet fait partie des ROS générés lors du processus inflammatoire, notamment via l’interaction du HOCl avec l’ $\text{H}_2\text{O}_2$ . La capacité de piégeage de l’oxygène singulet par la morphine a été étudiée grâce à la spectroscopie d’absorption et le système rose Bengale-ADPA (voir section 2.1.4). Elle a également été comparée à celle de l’azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), piègeur connu [245]. La figure 3.8 montre l’action de la morphine contre l’oxydation de l’ADPA par l’oxygène singulet.

La réaction de l’ADPA avec l’oxygène singulet provoque sa transformation en endoperoxyde et donc la diminution de l’absorbance de la molécule à 405 nm (courbe contrôle). Sans rose Bengale, il n’y a pas de production d’oxygène singulet et donc pas de décroissance de

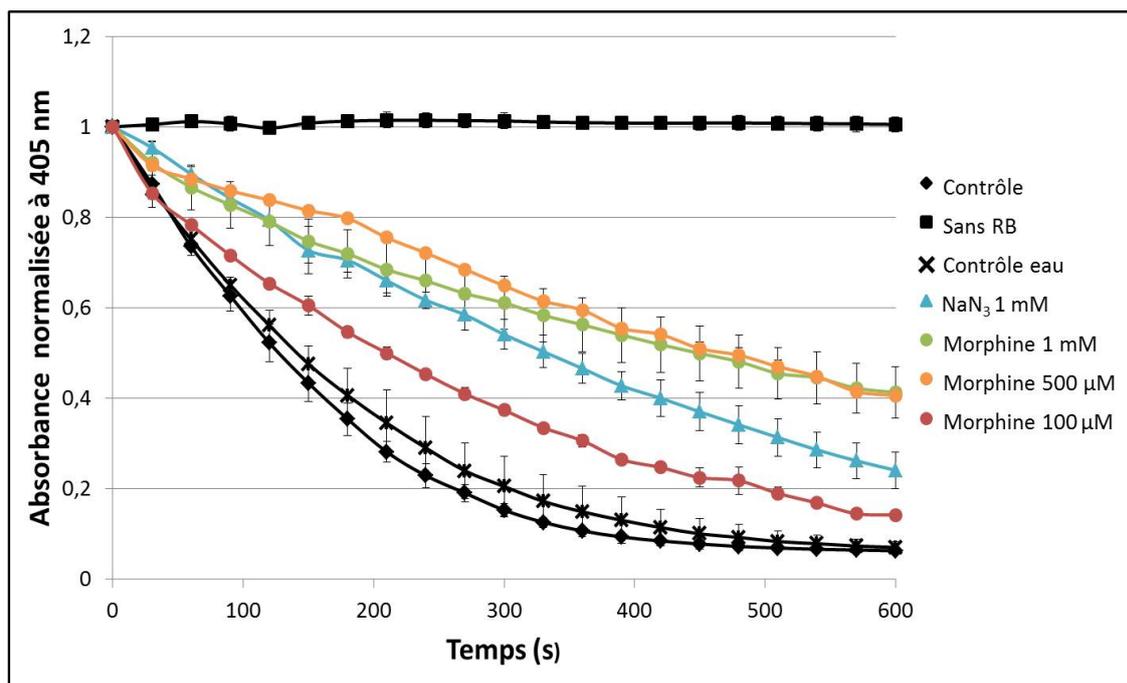


FIGURE 3.8 – Action de piégeage de la morphine sur l'oxygène singulet, produit par l'irradiation du rose Bengale (RB). L'oxygène singulet réagit avec l'ADPA et provoque la diminution de l'absorbance de la molécule à 405 nm. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=2$  et  $n=3$ ).

l'absorbance. Pour le contrôle solvant, l'ajout d'eau n'impacte pas la dégradation de l'ADPA. En effet, la courbe donnant l'évolution de l'absorbance en présence d'eau est quasi identique au contrôle. La morphine agit comme piègeur de l'oxygène singulet, tout comme l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) [175, 246]. Après 10 minutes, une concentration en morphine de 1 mM diminue d'environ 40% la décroissance de l'absorbance mesurée à 405 nm par rapport au contrôle solvant. Une concentration de 500  $\mu\text{M}$  diminue de façon équivalente la transformation de l'ADPA.

La morphine est un piègeur plus efficace que le  $\text{NaN}_3$ . En effet, à concentration équivalente (1 mM), elle piège plus rapidement l'oxygène singulet. Par conséquent, même si l'expérience menée ne permet pas de déterminer la constante de vitesse de l'interaction entre la morphine et l'oxygène singulet, on peut tout de même conclure qu'elle est supérieure à celle du  $\text{NaN}_3$  ( $5,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [247]).

Dans ces conditions expérimentales, l'utilisation de concentrations importantes de morphine (1 mM, 500  $\mu\text{M}$ ), largement supérieures aux concentrations utilisées en clinique (1  $\mu\text{M}$  et inférieures [201, 202, 203]), sont nécessaires. En effet, le rose Bengale est un producteur d'oxygène singulet très efficace (rendement quantique :  $\Phi(^1\text{O}_2) = 0,75$  [173]). Cette production doit être importante afin de pouvoir être détectée via la dégradation de l'ADPA (500  $\mu\text{M}$ ), en spectroscopie d'absorption. Les résultats obtenus grâce à cette étude ne permettent pas d'assurer que la morphine puisse diminuer la concentration en oxygène singulet *in vivo*, bien que la production soit plus faible. On peut uniquement conclure que la morphine est un piègeur de l'oxygène singulet. Une étude réalisée en conditions *in vivo* permettrait d'évaluer la gamme de concentrations nécessaires pour observer une action de piégeage et déterminer si ces concentrations sont en accord avec celles utilisées en clinique.

Afin de déterminer le mécanisme de piégeage de la morphine, une analyse du spectre d'absorption de la molécule, à la suite de son interaction avec l'oxygène singulet, a été menée.

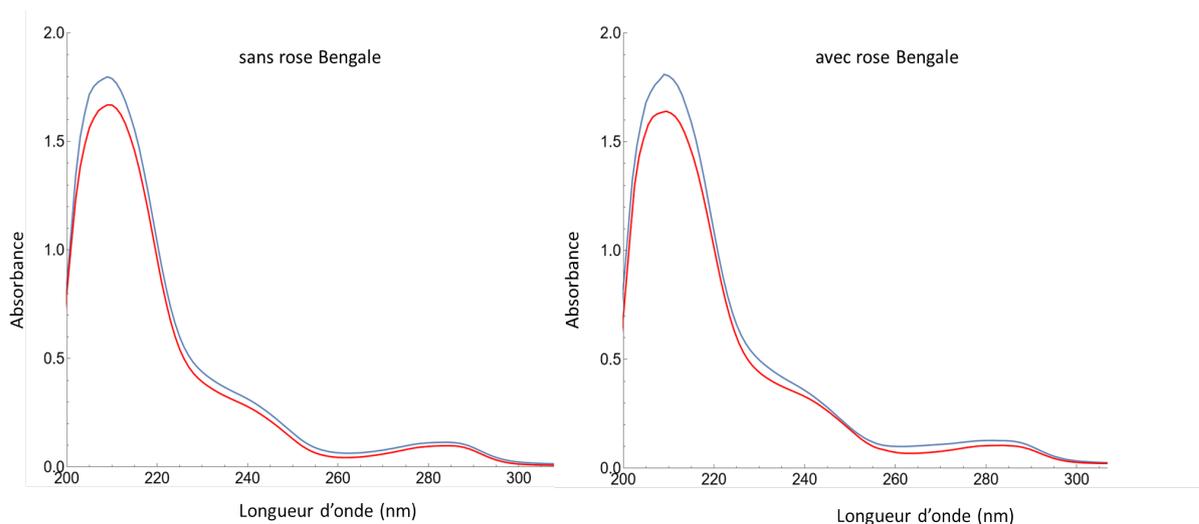


FIGURE 3.9 – Spectre d’absorption de la morphine dans du tampon phosphate pH 7,4 en présence ou non de rose Bengale 10  $\mu\text{M}$  (courbes bleues), et après 10 minutes d’irradiation (courbes rouges).

Les résultats montrent que la molécule agit comme piègeur physique du ROS. En effet, la morphine présente un maximum d’absorption à 209 nm dans le tampon phosphate (figure 3.9). Après une irradiation de dix minutes en absence de rose Bengale (et donc de production d’oxygène singulet), une décroissance de l’absorbance de 7% est observée. En réalité, l’utilisation d’un filtre coupant les longueurs d’onde inférieures à 450 nm empêche l’absorption de lumière par la molécule. La dégradation de la molécule n’est donc pas photo-induite. Ensuite, lorsque la même expérience est réalisée en présence de rose Bengale et que la morphine peut piéger l’oxygène singulet produit, une décroissance similaire de 9% est détectée. Aucune augmentation significative de la décroissance, indiquant la modification structurale de la molécule, n’est observée. Par conséquent, l’interaction entre la morphine et l’oxygène singulet se produit via un transfert d’énergie entre les deux molécules, permettant à l’oxygène singulet de retourner à l’état fondamental triplet :



### 3.5.5 Etude de l’action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux

Afin de poursuivre l’étude du piégeage de ROS par la morphine, l’action de la molécule sur l’acide hypochloreux a été étudiée grâce à la spectroscopie de fluorescence et plus particulièrement grâce à l’utilisation de la sonde APF (voir section 2.1.5). Lors du processus inflammatoire, l’HOCl est une des espèces oxydantes les plus puissantes qui soient formées. Il est produit par le cycle de chloration de la myéloperoxydase. Pouvoir piéger l’HOCl permettrait de réduire l’activité oxydante de l’enzyme (voir section 1.2.2.1).

La morphine agit comme piègeur très efficace de l’HOCl (figure 3.10). La molécule réduit de 86 % la concentration en HOCl par rapport au contrôle solvant (eau) à la plus haute concentration (100  $\mu\text{M}$ ). La concentration de 1  $\mu\text{M}$ , proche des concentrations plasmatiques, piège environ 67% du HOCl en solution. La morphine pourrait réduire l’impact oxydatif du cycle de chloration de la MPO en milieu extracellulaire, en interagissant avec le HOCl.

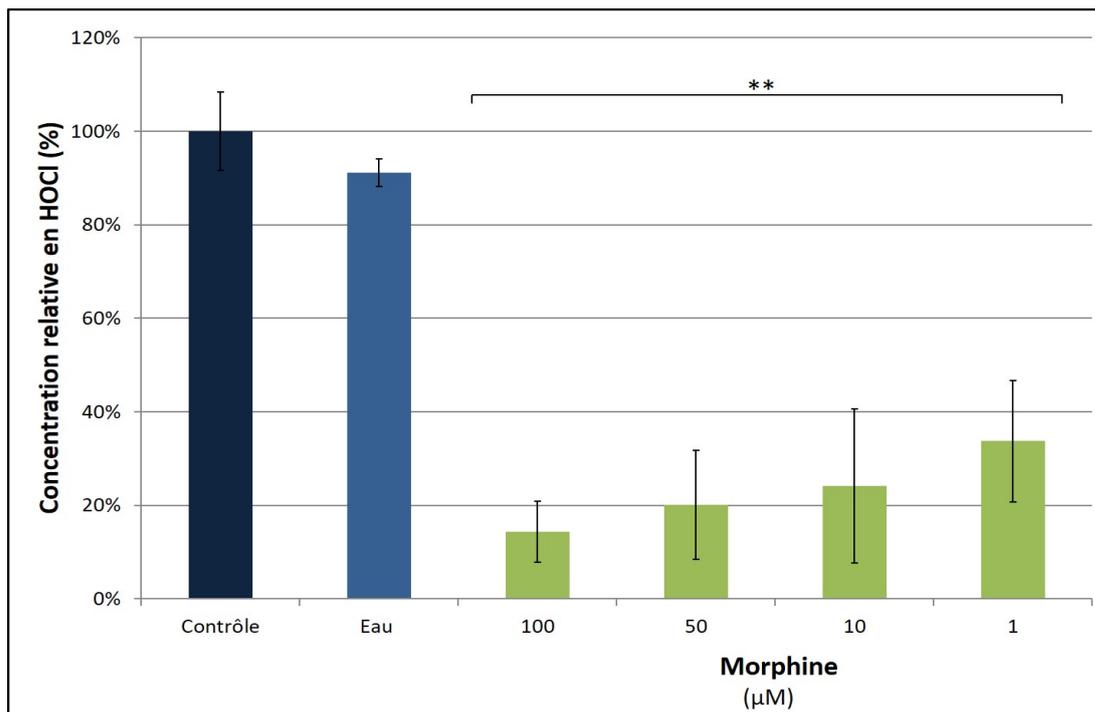


FIGURE 3.10 – Action de piégeage de la morphine sur l'acide hypochloreux, produit par le NaOCl. Le pourcentage de piégeage a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau).

## 3.6 Etude de l'action de la morphine sur l'activité oxydante des PMNs

### 3.6.1 Viabilité cellulaire

Dans un premier temps, avant d'étudier l'action de la morphine sur différents mécanismes de PMNs activés, il était important d'évaluer l'effet de la molécule sur la viabilité des cellules grâce au test d'exclusion au bleu trypan (voir section 2.2.2). Pour ce faire, des PMNs non activés ont été incubés, pendant dix minutes et pendant une heure, avec la plus haute concentration en morphine utilisée lors de cette étude (100  $\mu$ M) (figure 3.11). La morphine n'augmente pas la mortalité cellulaire par rapport aux contrôles, après une incubation de 10 minutes. Après une heure, la molécule induit une légère diminution de la viabilité cellulaire de 13% par rapport au contrôle solvant (eau).

### 3.6.2 Inhibition de la production d'anions superoxydes

Pour permettre l'étude de l'activité de la morphine sur le mécanisme de la flambée respiratoire des PMNs, les cellules ont été activées avec le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) en présence de la molécule. La production d'anions superoxydes a été détectée par luminescence (voir section 2.2.3). La morphine provoque une diminution importante de la production de ROS pour des concentrations comprises entre 10 et 100  $\mu$ M (figure 3.12). Les deux concentrations les plus élevées (50 et 100  $\mu$ M) réduisent de plus de 80 % la concentration en anions superoxydes en solution par rapport au contrôle solvant. L'action de la morphine chute à 78% avec une concentration de 10  $\mu$ M et devient négligeable à 1  $\mu$ M.

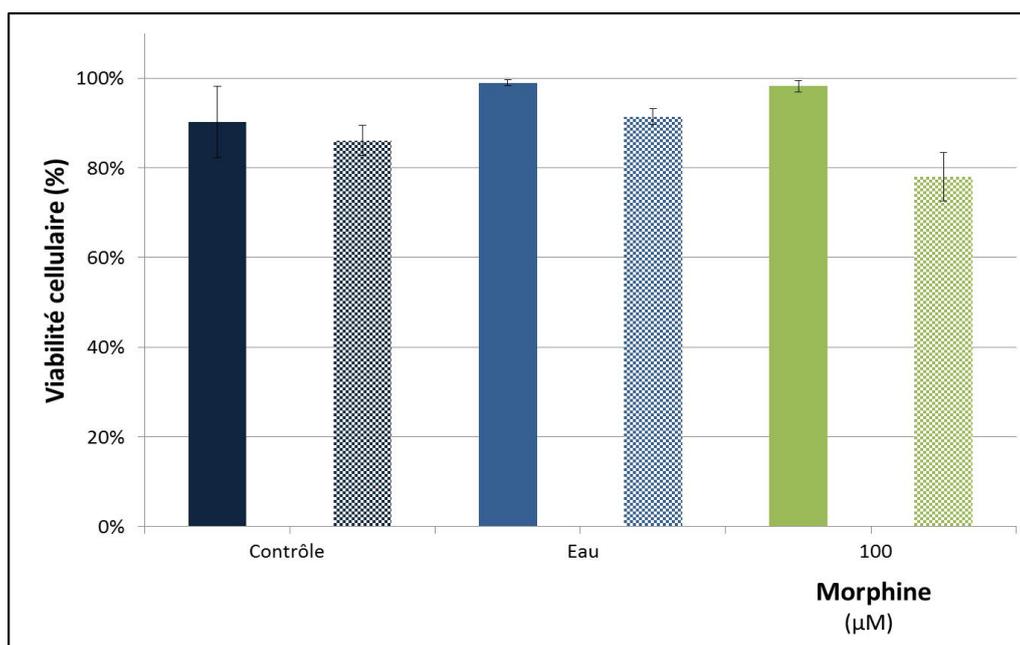


FIGURE 3.11 – Evaluation de la viabilité cellulaire de PMNs incubés en présence de morphine (100  $\mu\text{M}$ ) pendant dix minutes (couleur pleine) et une heure (couleur quadrillée), en terme de pourcentage de cellules vivantes. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2).

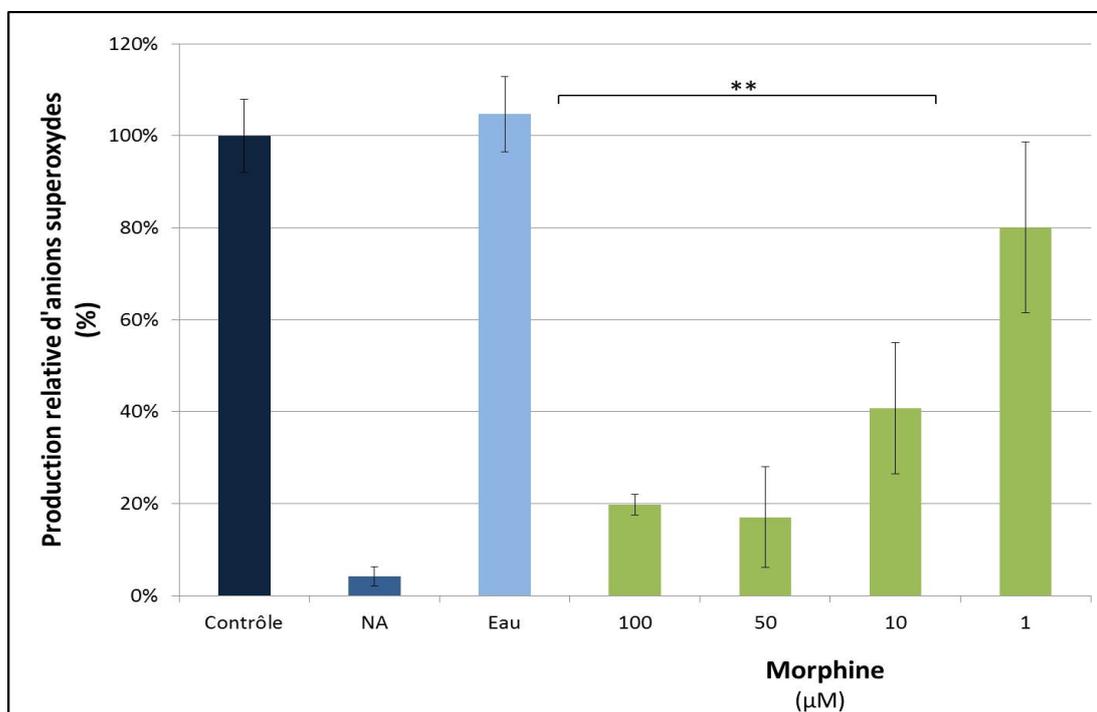


FIGURE 3.12 – Action de la morphine sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau).

Cette expérience ne permet pas de différencier les mécanismes d'action potentiels de la morphine sur la production d'anions superoxydes par les PMNs activés. En effet, la morphine pourrait interagir avec les cellules et notamment avec le complexe NADPH oxydase, mais elle pourrait également agir comme piègeur de l'espèce active de l'oxygène.

Afin d'évaluer la capacité d'interaction de la morphine avec les cellules, l'expérience précédente a été modifiée. Cette fois, les PMNs ont été incubés en présence de morphine pendant dix minutes ou une heure. Les solutions contenant les cellules ont ensuite été centrifugées et le surnageant éliminé. Les cellules (culot) ont été remises en solution (voir section 2.2.3). Si la morphine est capable de pénétrer la membrane cellulaire, voire d'atteindre le cytoplasme ou du moins de se lier à la membrane, elle n'a pas été éliminée par l'étape de centrifugation. Elle peut donc conserver son action inhibitrice sur la production d'anions superoxydes par le complexe NADPH oxydase des cellules.

Le lavage, après une période d'incubation de dix minutes, provoque l'élimination totale de la morphine (figure 3.13). En effet, aucune inhibition significative de la production de ROS n'est observée, pour des concentrations en morphine comprises entre 1 et 50  $\mu\text{M}$ . La plus haute concentration (100  $\mu\text{M}$ ) provoque une diminution de 25%, mais non significative, par rapport au contrôle solvant. Ces résultats indiquent que la diminution de la production d'anions superoxydes observée (figure 3.12) est due à la capacité de piégeage de la morphine, plutôt qu'à une action directe sur le processus de production de l'espèce active de l'oxygène.

L'augmentation du temps d'incubation avant l'étape d'élimination de la morphine n'induit pas d'amplification significative de l'inhibition de la production de ROS (figure 3.13). On peut donc conclure que même lorsque le temps d'incubation augmente, la morphine n'est pas capable d'inhiber soit une des étapes de la formation du complexe NADPH oxydase soit le processus d'échange d'électrons opéré par le complexe pour produire l'anion superoxyde. Cependant, cela ne veut pas dire que la morphine n'est pas capable d'interagir avec les cellules, de s'insérer dans leur membrane plasmique, et potentiellement d'atteindre leur cytoplasme. La littérature donne quelques informations sur la capacité de pénétration des membranes plasmiques par la morphine. Celle-ci présente une capacité de diffusion passive lente à travers la membrane plasmique ( $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) [248]. Une étude de 2018 a révélé que la morphine, comme d'autres opioïdes, peut traverser la membrane des neurones pour atteindre des récepteurs au niveau de l'appareil de Golgi dans le cytoplasme [249, 250]. Il a également été montré que la diffusion de la morphine à travers les cellules du foie, les hépatocytes, est accompagnée du transport de la molécule via l'OCT1, le transporteur de cations organiques. Cette protéine permet le transport de molécules chargées positivement à pH physiologique [251, 252]. La morphine étant une base faible, 85% de la morphine est protonée à pH 7,4. Elle peut donc être transportée dans les hépatocytes via l'OCT1 où elle sera métabolisée [248]. Bien que l'OCT1 soit principalement exprimée dans la membrane des hépatocytes, on retrouve cette protéine dans la membrane de différents types cellulaires, comme les cellules du système immunitaire (PMNs, monocytes et lymphocytes) [253]. L'OCT1 pourrait donc intervenir dans le processus de pénétration de la morphine au sein des PMNs. Cependant, même si elle peut accéder à leurs cytoplasme, elle ne semble pas avoir un impact sur le mécanisme de formation du complexe NADPH oxydase. Un temps d'incubation plus élevé serait peut-être nécessaire. Enfin, des études ont révélé que les cellules du système immunitaire, dont les PMNs, expriment les récepteurs membranaires opioïdes  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\delta$  et que les propriétés immunosuppressives des opioïdes (inhibition de la chemotaxie, de la phagocytose, etc.) pourraient être liées à la présence de ces récepteurs [254, 255]. Cependant, les résultats obtenus au cours de cette étude ne montrent pas qu'une éventuelle liaison de la morphine sur ces récepteurs puisse inhiber la flambée respiratoire des PMNs.

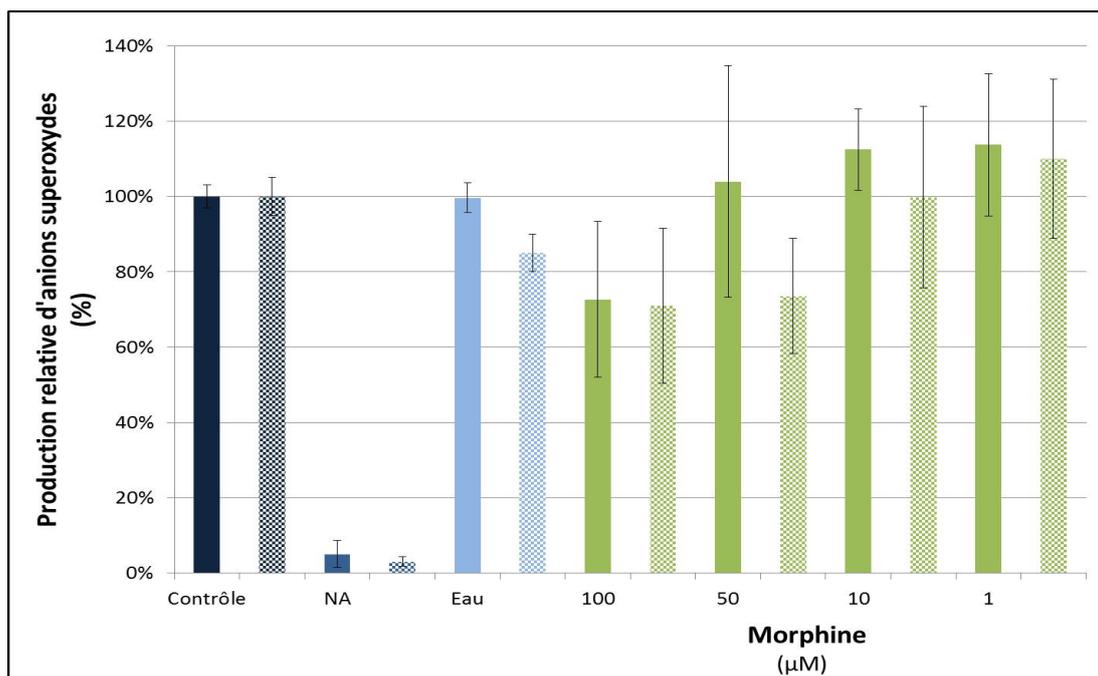


FIGURE 3.13 – Action de la morphine sur la production d’anions superoxydes par des PMNs équilibrés activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). La morphine a été éliminée du milieu avant la mesure, après 10 minutes (couleur pleine) ou après 1h (couleur quadrillée) d’incubation. Le pourcentage d’inhibition de la production d’anions superoxydes a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs :  $**P < 0,01$  ou  $*P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau).

### 3.6.3 Inhibition de la dégranulation

Le rôle principal des PMNs est d’apporter et de libérer différentes enzymes cytotoxiques (dont la MPO) sur le site inflammatoire, via notamment le processus de dégranulation. L’inhibition de ce processus peut être un des mécanismes anti-inflammatoires possibles pour une molécule. Un test ELISA a permis d’évaluer la libération de MPO par les PMNs activés (voir section 2.2.4).

L’activation des PMNs en présence de morphine ne provoque pas de diminution significative de la libération de MPO dans le milieu extracellulaire (figure 3.14). Ces résultats sont en contradiction avec ceux décrits par le Dr. G. Minguet [220]. Dans cette étude, une inhibition de 10% de la dégranulation a été observée pour une concentration de  $1\mu\text{g/ml}$  ( $3,5\mu\text{M}$ ) de morphine. Cependant, cette inhibition ne semble pas significative, au vu des écarts-types.

### 3.6.4 Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés

Bien que la morphine ne puisse pas empêcher la libération de MPO dans le milieu extracellulaire, elle pourrait tout de même interagir avec l’enzyme elle-même et inhiber son action oxydante. Un test SIEFED a été réalisé sur le contenu de dégranulation (voir section 2.2.5) afin d’obtenir des premières informations sur la capacité d’interaction de la morphine avec l’enzyme elle-même. Celles-ci ont été complétées dans la suite de ce travail, par une série de mesures sur l’enzyme humaine purifiée.

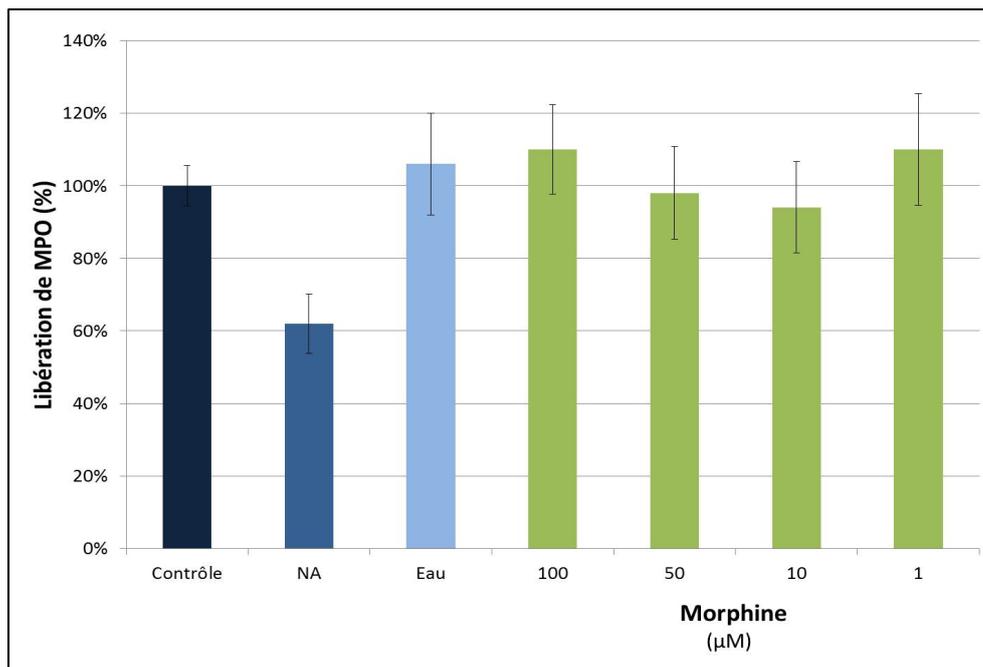


FIGURE 3.14 – Action de la morphine sur la libération de myéloperoxydase par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). La MPO libérée est détectée par un test ELISA. Le pourcentage de libération de MPO a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau).

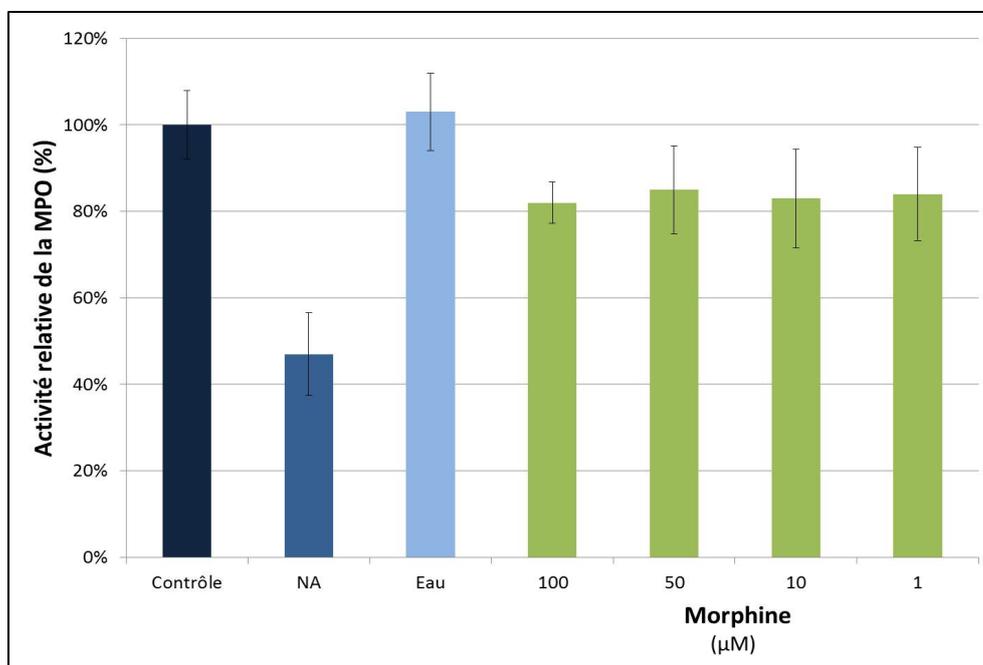


FIGURE 3.15 – Action de la morphine sur l'activité de myéloperoxydase libérée par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). L'activité MPO libérée a été évaluée par un test SIEFED. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=4 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau).

Seule la plus haute concentration en morphine (100  $\mu\text{M}$ ) induit une diminution de 18% de l'activité de la MPO libérée par les PMNs activés (figure 3.15). *In vitro*, la morphine ne réduit pas la quantité de MPO libérée par les PMNs et n'impacte l'activité de l'enzyme qu'à haute concentration. Ce résultat ne signifie pas que la morphine ne puisse pas être un inhibiteur de l'enzyme. En effet, le SIEFED offre uniquement des informations sur la capacité de liaison de la morphine dans le site actif de l'enzyme. La morphine n'est pas susceptible de former des liaisons résistantes à l'étape de lavage, mais pourrait néanmoins s'insérer dans le site actif et y jouer le rôle de substrat réducteur. Une étude plus approfondie de l'action de la morphine sur les activités de peroxydase et de chloration de l'enzyme est nécessaire.

### 3.7 Etude de l'action de la morphine sur l'activité oxydante de la myéloperoxydase

Afin de pouvoir évaluer la capacité d'inhibition de la morphine envers la MPO et approfondir la compréhension de ce mécanisme, différentes expériences utilisant la spectroscopie de fluorescence, associées à la modélisation moléculaire, ont permis d'obtenir des réponses.

#### 3.7.1 Modélisation moléculaire - Docking

Le *docking*, méthode d'analyse théorique, a fourni des informations sur l'insertion de la morphine dans le site actif de la MPO et la formation d'un éventuel complexe avec l'enzyme.

Le programme GOLD propose une solution unique pour le complexe MPO-morphine (figure 3.16). La molécule est placée dans le canal d'accès devant l'hème. La structure 3D empêche la molécule de s'orienter pour interagir avec des acides aminés comme l'histidine 95 ou l'arginine 239. En effet, aucun cycle de la morphine n'est orienté parallèlement au plan de l'hème. Le groupement hydroxyle du cycle phénolique est placé entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème. Dans cette configuration, la molécule ne peut former des ponts hydrogène qu'avec des acides aminés situés dans le canal d'accès du site actif. Le *docking* est réalisé sur une structure enzymatique rigide. Or, en réalité, les acides aminés se trouvant éloignés du centre de l'enzyme sont dans une zone plus flexible. Par conséquent, l'interaction réelle entre la morphine et ces deux acides aminés est peu probable.

La solution fournie par le *docking* montre que la morphine peut se positionner dans le canal d'accès au site actif, permettant potentiellement à la molécule de se trouver suffisamment proche de la structure hémique pour échanger un électron avec les intermédiaires redox (composés I et II). Cette hypothèse doit évidemment être vérifiée expérimentalement.

#### 3.7.2 Interaction avec le cycle de peroxydase

Cette étude permet d'obtenir des informations sur l'interaction entre la morphine et l'activité de peroxydase de la MPO (voir section 2.3.2), grâce à la spectroscopie de fluorescence et l'utilisation de la sonde Amplex Red (voir annexe D). Les résultats présentés à la figure 3.17 illustrent la capacité de la morphine à inhiber l'activité peroxydasique de l'enzyme. La molécule présente une action inhibitrice concentration-dépendante. Les deux concentrations les plus élevées, 50 et 100  $\mu\text{M}$ , provoquent une inhibition supérieure à 90%. Une concentration de 10  $\mu\text{M}$  réduit l'activité peroxydasique d'environ 60%, tandis que la morphine ne présente plus d'action inhibitrice significative à 1  $\mu\text{M}$ . A des concentrations physiologiques (1-5  $\mu\text{M}$ ), la morphine présente une action inhibitrice faible du cycle de peroxydase.

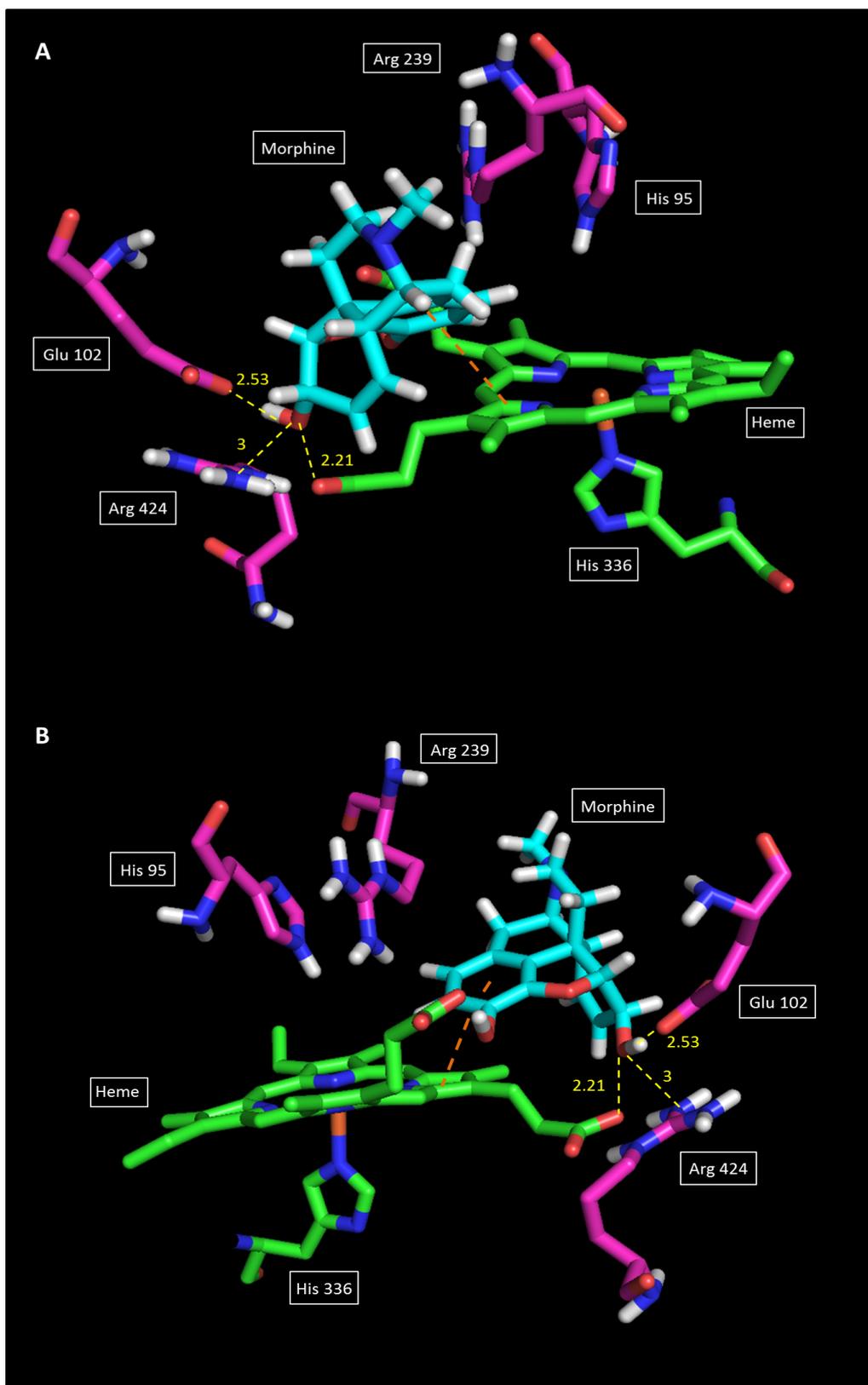


FIGURE 3.16 – La solution du complexe MPO-morphine obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

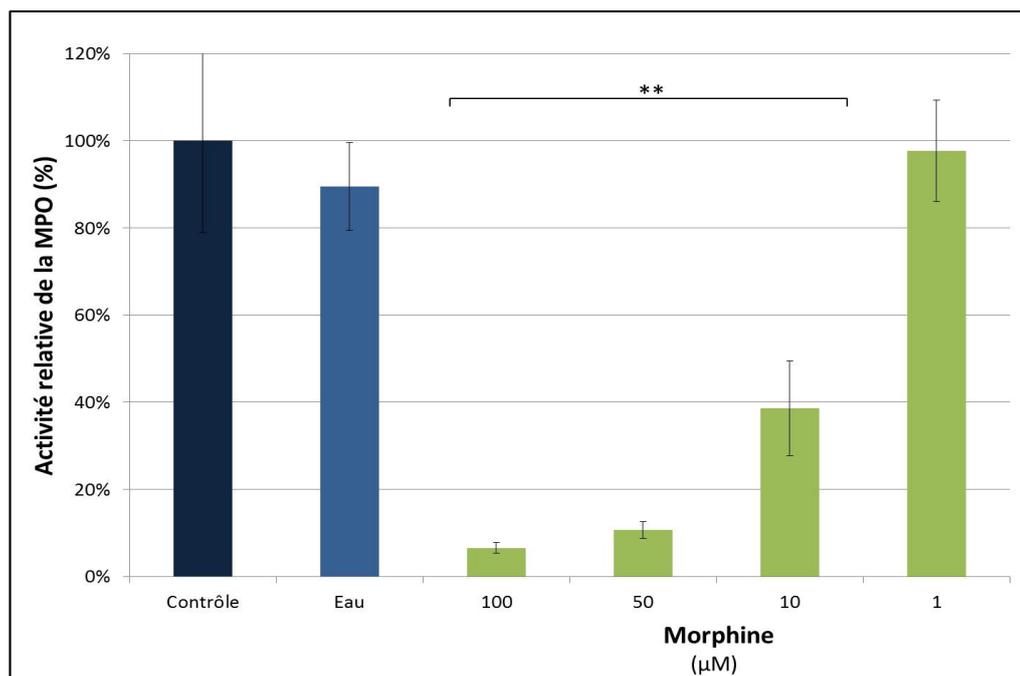


FIGURE 3.17 – Action de la morphine sur l’activité peroxydasique de la MPO. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau).

Ces résultats ne fournissent pas d’informations précises sur le mode d’interaction entre la morphine et la MPO. En effet, la molécule pourrait inhiber le déclenchement du cycle de peroxydase de la MPO en interagissant avec le site actif et en bloquant l’accès aux différents substrats, comme l’ $H_2O_2$  et la sonde fluorescente. La molécule pourrait également échanger un électron avec les intermédiaires oxydants de l’enzyme (composés I et II). La capacité de la morphine à réduire l’activité peroxydasique de l’enzyme nous indique sa faculté à s’insérer dans le site actif ou, du moins, suffisamment profondément dans le canal d’entrée pour permettre un échange potentiel d’électrons. Ce résultat est en accord avec le *docking*. Le potentiel redox estimé de la morphine est de 0,608 V et est inférieur aux potentiels des deux couples redox de la MPO :  $E^0(\text{composé I}/\text{composé II}) = 1,35$  V et  $E^0(\text{composé II}/\text{MPO native}) = 0,97$  V (voir section 1.2.2.1) [53]. Par conséquent, la morphine est capable d’agir comme substrat réducteur pour les deux composés redox du cycle de peroxydase de la MPO. Ce mécanisme d’action est-il couplé à une action anticatalytique ? La molécule peut-elle former un complexe stable avec l’enzyme et par conséquent bloquer l’insertion d’autres substrats ? Les résultats du *docking* semblent le démentir. L’étude SIEFED fournit des informations supplémentaires (voir section 3.7.4).

### 3.7.3 Interaction avec le cycle de chloration

La MPO possède une propriété unique qui consiste à produire des acides hypohalogénés, dont le principal est l’acide hypochloreux, via le cycle de chloration (voir section 2.3.3). Vlasova et al. [54] ont montré que l’affinité du composé I avec les ions chlorure, et donc la prédominance du cycle de chloration par rapport au cycle de peroxydase, dépend du pH du milieu. L’activité de chloration augmente lorsque le pH diminue. Le milieu extracellulaire est caractérisé par un pH neutre avec une valeur comprise entre 7 et 7,5. Par contre, le phagolysosome des PMNs l’est par une acidification du milieu pouvant atteindre un pH de 4,7-6

[54, 256]. De façon similaire, des lésions inflammatoires, telles que des lésions athérosclérotiques [257, 258], sont caractérisées par un pH acide.

L'action inhibitrice de la morphine sur le cycle de chloration a été investiguée grâce à la spectroscopie de fluorescence et à une sonde spécifique, l'APF dans deux tampons de pH différents (5,5 et 7,4) mais contenant tous les deux des ions chlorure (voir section 2.3.3).

### 3.7.3.1 Milieu acide - pH 5,5

La figure 3.18 illustre l'action inhibitrice de la morphine sur la production de HOCl par la MPO à pH acide (pH 5,5). L'absence de  $\text{Cl}^-$  en solution empêche l'oxydation de la sonde fluorescente APF [259, 260], prouvant sa spécificité pour le HOCl.

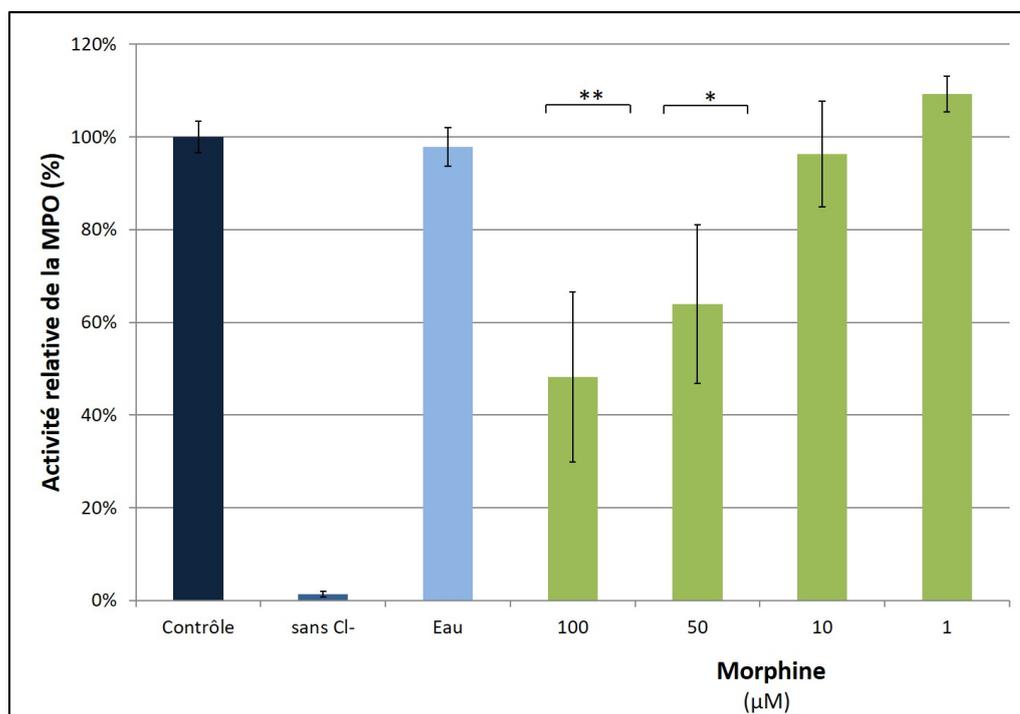


FIGURE 3.18 – Action de la morphine sur l'activité de chloration de la MPO, à pH 5,5. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau).

A pH acide, la morphine inhibe faiblement le cycle de chloration de la MPO. En effet, il est nécessaire d'utiliser une concentration de  $100 \mu\text{M}$  pour obtenir une inhibition de 52% de la production d'HOCl. Celle-ci diminue à 36% à  $50 \mu\text{M}$  et est nulle à des concentrations inférieures. A des concentrations physiologiques ( $1-5 \mu\text{M}$ ), la morphine ne présente donc pas d'action inhibitrice de l'activité de chloration de la MPO à pH acide.

### 3.7.3.2 Milieu extracellulaire - pH 7,4

La figure 3.19 illustre l'action inhibitrice de la morphine sur la production d'acide hypochloreux par la MPO à pH neutre (pH 7,4). Globalement, à pH physiologique, elle n'est pas supérieure à celle observée à pH acide. La concentration la plus élevée en morphine ( $100 \mu\text{M}$ ) inhibe le cycle de chloration à 43%. Cette capacité diminue avec sa concentration. Elle atteint

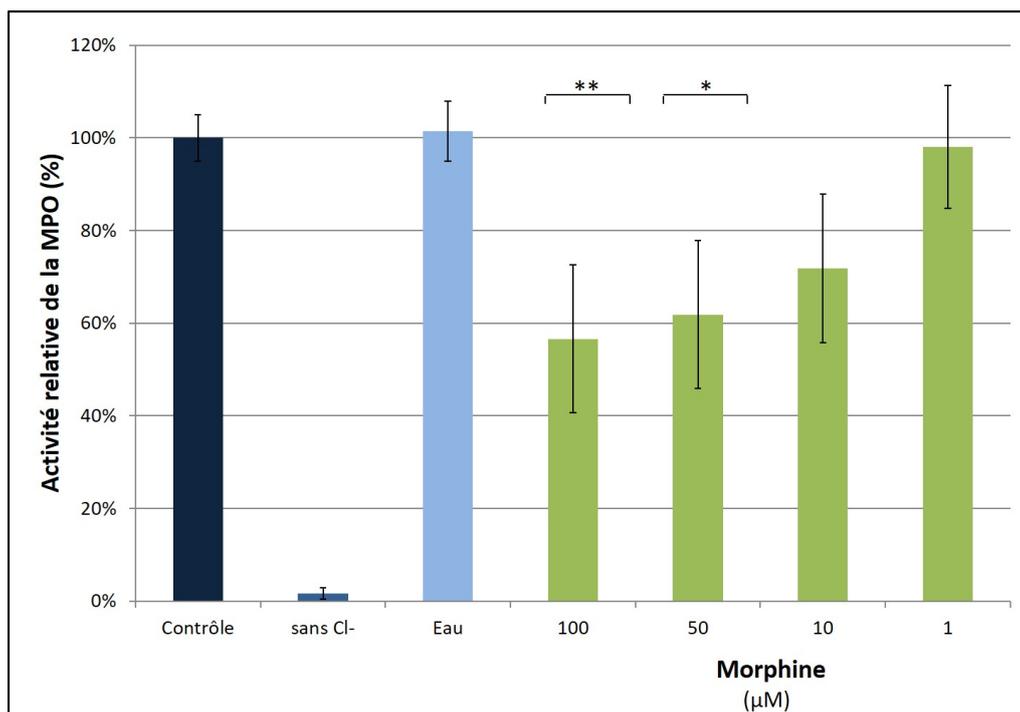


FIGURE 3.19 – Action de la morphine sur l’activité de chloration de la MPO, à pH 7,4. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs :  $**P<0,01$  ou  $*P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau).

38% et 28% pour les concentrations 50  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  respectivement.

Généralement, les phénols présentent une action inhibitrice sur le cycle de chloration croissante avec le pH du milieu, car l’affinité de la MPO pour les ions chlorure diminue lorsque le pH augmente [54]. Ce n’est pas le cas pour la morphine. Cela montre que, même à pH basique, les ions  $\text{Cl}^-$  peuvent entrer en compétition avec la molécule pour interagir avec le composé I. La morphine ne peut, à des concentrations plasmatiques (1-5  $\mu\text{M}$ ), réduire de façon significative la production d’HOCl dans le milieu extracellulaire ou dans un milieu acide.

### 3.7.4 SIEFED

La morphine inhibe l’action oxydante (cycle de chloration et de peroxydase) de la MPO à pH neutre correspondant au milieu extracellulaire. Afin de connaître plus précisément le mode d’action de la morphine, il est intéressant de déterminer sa capacité de liaison au site actif de l’enzyme, grâce au SIEFED (voir sections 2.2.5 et 2.3.4). Grâce à l’étape de lavage, seuls les composés capables de se lier dans la cavité (aux acides aminés, au noyau de fer ou à la structure hémique) peuvent faire décroître l’intensité de fluorescence de la sonde Amplex Red en empêchant les substrats ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , nitrite et Amplex Red) d’accéder au site actif et d’y interagir. La morphine ne présente aucune action inhibitrice, quelle que soit la concentration utilisée (figure 3.20).

Ce résultat révèle que la morphine n’est pas capable de se lier au site actif de la MPO ou, du moins, que les potentielles liaisons formées ne sont pas suffisamment fortes pour résister à l’étape de lavage. Ce résultat est en accord avec celui fourni par *docking*. La structure 3D de la morphine n’est pas favorable à une liaison avec le site actif de la MPO. En effet,

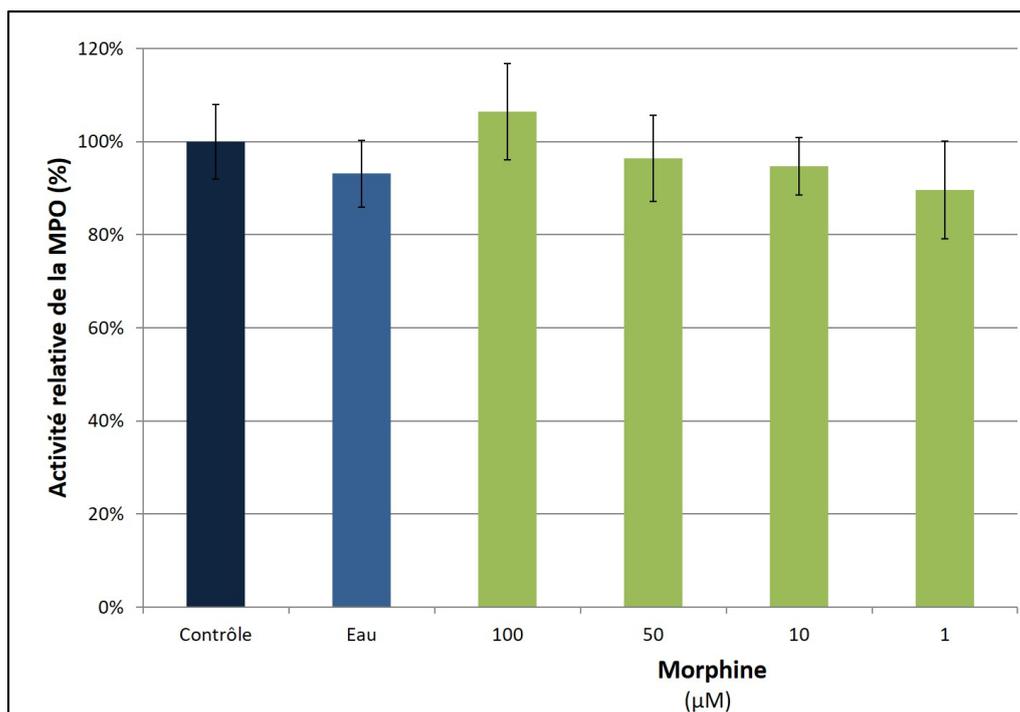


FIGURE 3.20 – Action de la morphine sur l'activité oxydante de la MPO, mesurée par SIEFED. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs :  $**P<0,01$  ou  $*P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau).

l'encombrement stérique peut empêcher l'insertion profonde de la molécule dans le site actif de l'enzyme et, par conséquent, son orientation empêche son interaction forte avec différents éléments importants tels que des acides aminés (histidine 95, arginine 239) et le noyau de fer. La molécule ne présente donc pas d'action anticatalytique en empêchant notamment la liaison du peroxyde d'hydrogène, déclencheur de l'activité oxydante de l'enzyme. Par contre, la molécule doit tout de même s'insérer suffisamment profondément pour permettre l'échange d'un électron avec les intermédiaires redox de l'enzyme (composé I et composé II) et par conséquent agir comme substrat réducteur compétiteur dans les cycles de peroxydase et de chloration.

### 3.8 Conclusion

La morphine est un opioïde fréquemment utilisé en clinique en tant que composé analgésique. Elle permet d'atténuer, de soulager et de prévenir, les douleurs modérées à sévères. Faisant partie des molécules analgésiques les plus utilisées, la morphine permet, en soutien à la sédation, de soulager la douleur de patients en soins intensifs et palliatifs. Elle est notamment très efficace dans le cas des souffrances liées au cancer.

De nombreuses études se sont intéressées à la capacité antioxydante de la morphine, notamment en tant que piègeur de radicaux et de ROS. Cette propriété lui offre une action neuroprotectrice. Elle est également capable de réduire les dégâts oxydatifs induits par le phénomène d'ischémie-reperfusion. La morphine a montré des propriétés immunomodulatrices intéressantes, en agissant sur les leucocytes. En effet, la molécule peut impacter la production de ROS par les cellules. Le prélèvement de liquide synovial chez des patients souffrant d'arthrite a également démontré la réduction du nombre des leucocytes suite à l'injection de morphine. Cependant, des précautions doivent être prises lors de son utilisation. En effet, l'emploi récurrent de la molécule, notamment à hautes concentrations, peut induire des effets pro-oxydants néfastes.

Sur base des ces constats, il était intéressant d'approfondir l'étude de l'impact de la morphine sur le mécanisme inflammatoire. C'est pourquoi ce travail s'est penché sur l'investigation de l'action de la molécule sur différents intermédiaires essentiels, aussi bien cellulaires, enzymatiques que chimiques de ce processus complexe, afin d'évaluer le bénéfice de l'utilisation de la morphine lors du traitement de pathologies inflammatoires. En effet, l'ajout d'une action potentiellement immunomodulatrice à l'utilisation dans le traitement de la douleur associée à ces pathologies est un atout supplémentaire non négligeable.

La morphine a un impact très faible sur la viabilité des PMNs. Par contre, elle est capable de réduire la quantité d'anions superoxydes libérés par les PMNs activés. Lors d'un bref temps d'incubation des PMNs en présence de morphine, celle-ci agit majoritairement en tant que piègeur de  $O_2^-$ . Lorsque l'incubation se prolonge, la molécule ne démontre pas une capacité d'interaction supplémentaire significative avec les cellules. La molécule pourrait cependant traverser la membrane cellulaire des PMNs mais cette diffusion semble lente. La répétition des expériences réalisées sur les PMNs avec des temps d'incubation plus longs permettrait peut-être d'observer une potentielle perturbation du processus de formation des ROS. Si c'était le cas, une étude plus approfondie serait alors nécessaire pour comprendre l'impact de la morphine sur le complexe NADPH oxydase. Enfin, la morphine ne montre aucune inhibition du processus de dégranulation des PMNs.

Bien que la morphine ne puisse réduire la libération de myéloperoxydase par les PMNs activés, elle est capable d'agir comme inhibiteur réversible de l'enzyme. En effet, la molécule analgésique interagit en tant que substrat réducteur avec le cycle de peroxydase de la MPO. La détermination de son potentiel d'oxydoréduction confirme sa capacité à céder un électron et donc à réduire les composés I et II du cycle. Cependant, la morphine n'est pas capable, aux concentrations physiologiques, d'impacter le cycle de chloration dans des conditions de pH neutre, semblables à celles du milieu extracellulaire, ou à pH acide, caractéristique du phagolysosome ou de certaines pathologies comme l'athérosclérose. En revanche, la morphine agit comme piègeur efficace de l'acide hypochloreux. Ces résultats montrent la capacité de la molécule à réduire l'impact oxydatif du cycle de chloration, en piégeant l'espèce oxydante produite. La structure 3D de la molécule lui permet de s'insérer dans le canal d'accès à la cavité du site actif de la myéloperoxydase. Cependant, en raison de l'encombrement stérique,

elle n'est pas en mesure de se placer suffisamment profondément dans la cavité. La morphine ne peut donc pas former de liaisons, telles que des ponts hydrogène, avec d'importants acides aminés et ne peut empêcher le déclenchement des cycles oxydants en bloquant l'interaction du peroxyde d'hydrogène. Le placement de la morphine à l'entrée du site actif lui permet d'être suffisamment proche pour échanger un électron avec les composés I et II de l'enzyme et impacter le cycle de peroxydase. Elle pourrait entrer en compétition avec d'autres substrats et empêcher la formation de radicaux. Bien que ce mécanisme provoque le passage de la morphine à l'état radicalaire, des études voltammétriques ont montré la capacité de molécules de morphine radicalaires à s'associer pour former un composé stable et non oxydant.

Enfin, la morphine se révèle un piègeur efficace de ROS. En effet, en plus de piéger le HOCl et l'anion superoxyde, la molécule interagit également avec l'oxygène singulet. Outre l'interaction avec les éléments producteurs de ROS, PMNs et MPO, la molécule est capable de réduire leur impact oxydant en piégeant directement les ROS. Le piégeage de l'anion superoxyde peut également avoir un impact direct sur l'activité de la MPO. En effet, la flambée respiratoire des PMNs est indispensable à la production du substrat naturel de l'enzyme, le peroxyde d'hydrogène, formé par dismutation de deux molécules d'anion superoxyde. En réduisant la formation de l'élément déclencheur des cycles oxydants de la MPO, la morphine peut diminuer la surstimulation de l'enzyme et la surproduction de ROS et de radicaux.

Lors de son administration à un patient, la concentration en morphine peut atteindre  $1\mu\text{M}$  dans le plasma. A cette concentration, la molécule ne présente pas d'action inhibitrice significative sur l'activité oxydante de la MPO, ni sur les mécanismes de production de ROS et de dégranulation des PMNs. Par contre, la morphine est un piègeur de ROS efficace aux concentrations plasmatiques, et notamment de l'acide hypochloreux, oxydant puissant impliqué dans un grand nombre de réactions néfastes pour l'organisme. Par conséquent, lors de son utilisation clinique dans le traitement de la douleur associée à diverses pathologies inflammatoires, la morphine peut présenter une action immunomodulatrice intéressante en agissant comme antioxydant, cette propriété pouvant s'associer à son action analgésique première.

La morphine est métabolisée efficacement au niveau du foie et ses deux métabolites, la morphine-6-glucuronide et la morphine-3-glucuronide, sont détectés dans le sang [201]. Afin de compléter l'étude de son action anti-inflammatoire, il pourrait être intéressant de se pencher sur l'action antioxydante et inhibitrice des métabolites sur la MPO et les PMNs. En effet, l'ajout d'une fonction glucuronide à la structure de la morphine peut impacter sa capacité d'interaction, notamment avec le site actif de la MPO. Ce qui peut également modifier les capacités antioxydantes et réductrices de la molécule. Le *docking* des deux métabolites de la morphine avec le site actif de la MPO a été réalisé (voir annexe B). Les résultats de la modélisation montrent que l'ajout d'un groupement glucuronide à la molécule de morphine augmente son encombrement stérique au sein du site actif. Cela représente un argument en défaveur d'une réelle action inhibitrice des métabolites de la morphine sur la MPO.

Pour terminer, au cours de cette étude, seules deux propriétés associées aux PMNs ont été investiguées (flambée respiratoire et dégranulation). L'examen de l'impact de la morphine et de ses deux métabolites hépatiques sur le mécanisme de formation du NETs pourrait s'avérer intéressant. En effet, cette dernière propriété fait l'objet de nombreuses recherches récentes.

Les résultats concernant la MPO repris dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* [261].





## Chapitre 4

# Propofol

Le propofol, 2,6-diisopropylphénol, est un phénol utilisé comme agent anesthésique, administré par voie intraveineuse. Il est fréquemment employé pour initier et maintenir un état sédatif lors d'opérations ou dans les unités de soins intensifs. La rapidité avec laquelle la molécule induit la sédation (environ 40 secondes), son court temps d'action et son métabolisme rapide permettent de réaliser des anesthésies précises et parfaitement contrôlées. Bien qu'agissant en tant que dépresseur cardiovasculaire et respiratoire comme beaucoup d'agents anesthésiants, le propofol permet un réveil rapide du patient. [262, 263]

Les propriétés anesthésiantes du propofol ont été découvertes en 1977 par une équipe belge (B. Kay et G. Rolly) lors d'un essai clinique. Cependant, dès ses premières utilisations, des effets secondaires (e.g. douleur lors de l'injection) provoqués par son solvant, qui contenait du Cremophor E. L. et de l'éthanol, ont été constatés. Cela a amené à l'établissement d'une nouvelle formulation de la molécule active, le Diprivan. Cette formulation contient le propofol (1%) dans une émulsion lipidique, l'Intralipide (eau, 10% d'huile de graine de soja, 2,25% de glycérol, 1,2% de phospholipides d'oeuf, 0,005% de EDTA disodique et de l'hydroxyde de sodium pour ajuster le pH. L'huile de soja est elle-même composée de 44-62 % d'acide linoléique, de 19-30 % d'acide oléique, de 7-14 % d'acide palmitique et de 4-11 % d'acide linoléique [262, 264]).

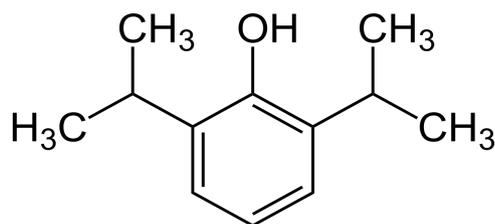


FIGURE 4.1 – Structure du 2,6-diisopropylphénol

### 4.1 Propriétés physico-chimiques

Le propofol est un composé phénolique disubstitué par deux groupements isopropyles en position ortho. Sa masse molaire est de 178,27 g/mol. Ayant un point de fusion à 18 ° C, le propofol se trouve sous forme liquide à température ambiante. Il est soluble dans des solvants organiques comme l'éthanol, le DMSO ou le DMF, mais est insoluble dans l'eau. Son pKa est égal à 11.

## 4.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

Le mode d'action du propofol qui permet d'induire la sédation n'est pas encore entièrement connu. Cependant, il semble que la molécule facilite et prolonge l'interaction entre le neurotransmetteur GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) et les récepteurs GABA<sub>A</sub>. Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez les mammifères. En se fixant sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>, le GABA provoque l'entrée dans le neurone d'ions chlorure via les canaux ioniques. Cette entrée d'ions induit l'hyperpolarisation de ce dernier et, par conséquent, son inhibition en empêchant le passage de l'influx nerveux. [265, 266]

La pharmacocinétique du propofol peut être divisée en trois phases, dont deux principales. La première reprend la pénétration de la barrière hémato-encéphalique et la distribution rapide dans le système nerveux central. Cette première étape explique la rapidité d'action de la molécule hautement lipophile. Le temps de demi-vie de l'équilibre hémato-encéphalique a été estimé, par modélisation, entre deux et trois minutes [267]. La seconde étape est liée au métabolisme de la molécule par l'organisme et dure environ entre 34 et 56 minutes en fonction des individus. Le métabolisme du propofol (figure 4.2) se déroule principalement au niveau du foie, dans les microsomes, mais des sites extra-hépatiques (comme les reins, les poumons [268, 269, 270] et l'intestin grêle [271]), ont été mis en évidence. Environ 70% du propofol est conjugué à une structure glucuronide [272, 273]. 29% du propofol sont transformés, par le cytochrome P450 en 2,6-diisopropyl-1,4-quinol [274, 275]. Ce dernier peut être oxydé en sa forme quinone, 2,6-diisopropyl-1,4-quinone, à pH basique. Le 2,6-diisopropyl-1,4-quinol peut également être conjugué pour former trois métabolites : 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-sulfate, 1-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide et 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide. Les différents métabolites sont également suspectés d'intervenir dans l'effet anesthésiant du propofol [276]. La troisième et dernière phase reprend l'excrétion hors de l'organisme par voie urinaire. Environ 1% de la molécule native est éliminée sans être métabolisée [272].

Le propofol est injecté au patient par voie intraveineuse grâce à un système de perfusion contrôlée (TCI : target controlled infusion) [277]. Ce système automatisé utilise des modèles pharmacocinétiques (Marsh, Schnider) pour établir un plan d'administration de l'agent anesthésiant adapté à chaque patient. Ces modèles tiennent compte de facteurs comme l'âge, le poids, le sexe, afin de maintenir une concentration adéquate dans le sang et dans la zone d'action de la molécule (cerveau). Un monitoring de la concentration en propofol est réalisé durant toute la durée de la sédation, ce qui permet de déterminer la concentration en anesthésiant dans le plasma. De façon générale, un bolus de propofol est injecté initialement pour induire l'anesthésie et atteindre le plus rapidement possible la concentration plasmatique souhaitée [277]. Ensuite, l'anesthésie est maintenue grâce à une injection continue. En fonction du patient et de la prise potentielle de composés comme des analgésiques (opioïdes), la concentration plasmatique du propofol peut varier entre 10 et 50  $\mu$ M lors de la maintenance de la sédation [278, 279, 280, 281].

## 4.3 Métabolites et dérivés d'oxydation

A la suite de son injection, le propofol est rapidement métabolisé par l'organisme dans différents sites. Des études ont été consacrées à la détection des différents métabolites du propofol dans le plasma de patients anesthésiés et à l'évaluation de leurs concentrations [281, 282, 283].

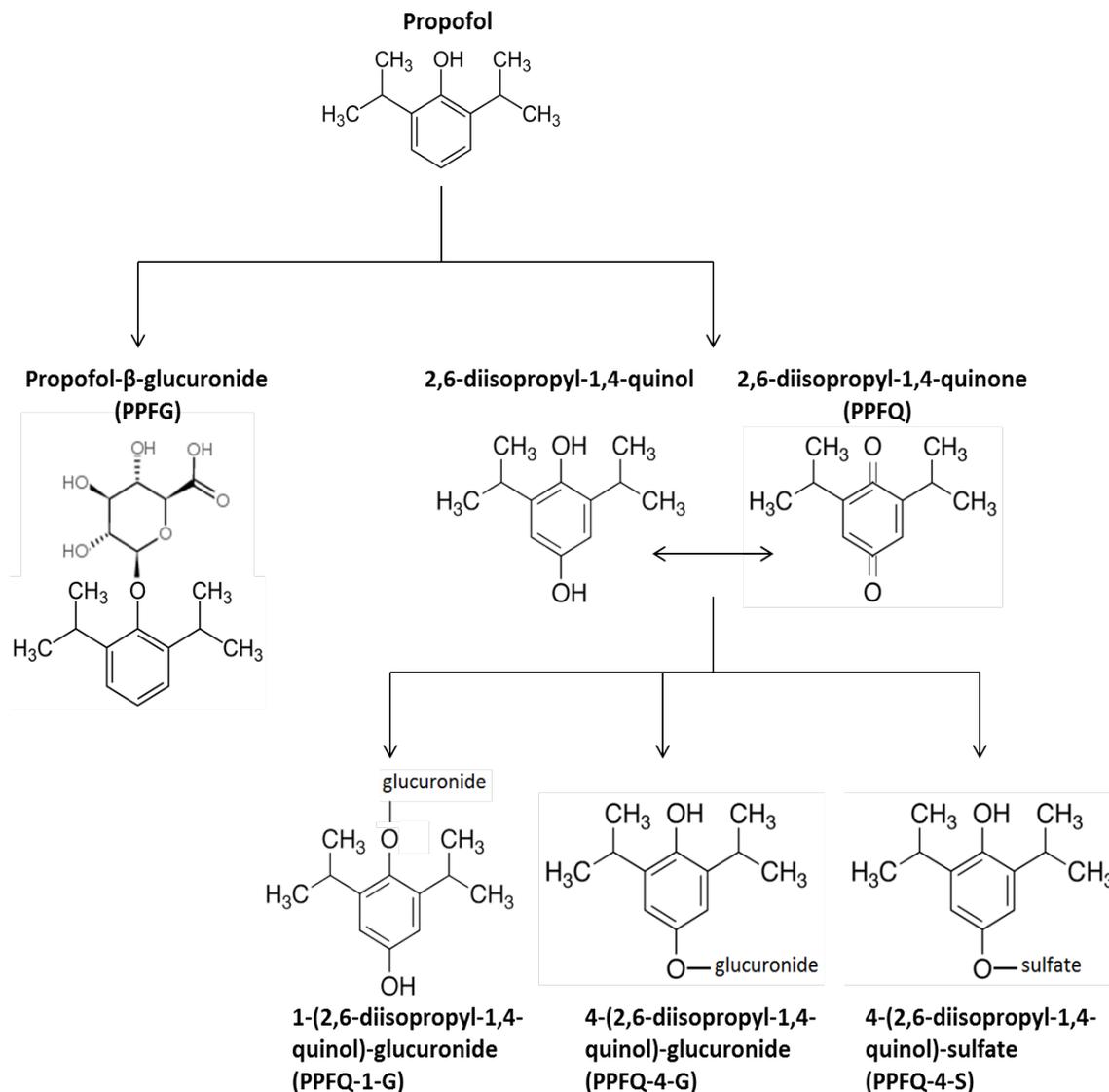


FIGURE 4.2 – Les différents métabolites du propofol en conditions *in vivo* [281].

#### 4.3.1 Propofol-β-glucuronide - PPFQ

Ce métabolite du propofol est le plus abondant et a été détecté dans le sang avec une concentration maximale de 50  $\mu\text{M}$  [281, 282]. En effet, environ 70% du propofol est associé à une structure glucuronide grâce à l'uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransférase au niveau des différents sites métaboliques [272, 273]. Ce composé possède une masse molaire de 354,39 g/mol.

#### 4.3.2 1-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide - PPFQ-1-G et 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide - PPFQ-4-G

Des études ont mis en avant l'implication d'une hémoprotéine, le cytochrome P450, dans le métabolisme du propofol. En effet, environ 29% de celui-ci est hydroxylé par cette protéine en 2,6-diisopropyl-1,4-quinol [272, 284]. Ce composé peut ensuite être conjugué pour former les isomères 1-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide et 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-

glucuronide. Ces composés sont les plus produits parmi les dérivés de la forme quinol du propofol. On peut les retrouver dans le plasma à des concentrations proches de 10  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$  respectivement [282]. Le PPFQ-4-G est formé par la conjugaison d'une fonction glucuronide sur la fonction hydroxyle placée en position para du cycle du propofol. Le PPFQ-1-G est quant à lui formé par la conjugaison d'une fonction glucuronide sur la fonction hydroxyle placée entre les deux bras isopropyles du propofol. Les deux composés ont une masse molaire de 371,4 g/mol.

### 4.3.3 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-sulfate - PPFQ-4-S

Parmi les dérivés de la forme quinol du propofol, le 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-sulfate (PPFQ-4-S) est formé par l'association d'un groupement sulfate à l'atome d'oxygène situé en position para du cycle du propofol. Ce métabolite n'est pas présent en concentration suffisante pour être quantifié dans le sang [281]. Sneyd et al. ont détecté ce métabolite dans l'urine de patients 24 h après l'injection du propofol. Cependant, il ne représente que 4% de la concentration totale des métabolites [285]. Il possède une masse molaire de 274,3 g/mol.

### 4.3.4 2,6-diisopropyl-1,4-quinone - PPFQ

La forme quinol du propofol, le 2,6-diisopropyl-1,4-quinol, n'est pas détectée telle quelle dans le plasma. En effet, ce métabolite est soit rapidement transformé en PPFQ-1-G, PPFQ-4-G ou PPFQ-4-S, soit oxydé en sa forme quinone, 2,6-diisopropyl-1,4-quinone. Ce dernier peut être détecté dans le plasma de patients ayant subi une chirurgie [281, 283], à une concentration proche de 5  $\mu\text{M}$  et dans les tissus de différents organes (foie, reins, coeur et poumons) [276, 282].

La forme quinone du propofol peut également être formée à partir de la forme radicalaire de la molécule. En effet, l'oxydation du propofol par diverses espèces (e.g. peroxy-nitrite [286], espèces réactives de l'oxygène [287, 288] ou système enzymatique [288, 289]) donne un radical phénoxy qui peut par la suite interagir avec de l'oxygène, plus particulièrement l'oxygène singulet pour donner ce métabolite [287]. Lors du processus inflammatoire, l'oxygène singulet étant un produit de l'interaction entre du peroxyde d'hydrogène et les ions  $\text{Cl}^-$  ou l'acide hypochloreux  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  (produit du cycle de chloration de la MPO), on peut supposer qu'il puisse être en mesure d'interagir avec le radical phénoxy du propofol.

Dans deux publications, Subrahmanyam [290] et Kettle [291] ont démontré que la MPO peut induire l'hydroxylation de composés phénoliques en présence d'un système producteur d'anions superoxydes, afin de produire leur forme hydroquinone. Deux mécanismes différents ont été proposés, basés sur la formation d'un complexe MPO ferrique- $\text{O}_2^-$  appelé composé III (voir figure 1.9). Kettle propose l'interaction du composé III avec une nouvelle molécule d'anion superoxyde pour former un complexe hydroxylant semblable à l'espèce hydroxylante du cytochrome P450. Par contre, pour Subrahmanyam, ce complexe provoque la formation d'oxygène singulet responsable par la suite de l'hydroxylation du phénol. La forme hydroxylée du phénol peut alors subir deux oxydations successives par interaction avec le cycle de peroxydase de la MPO, avec un radical phénoxy ou avec une autre espèce oxydante (ROS), pour former la structure quinone. Lors de l'inflammation, les PMNs génèrent l'anion superoxyde en présence de MPO par l'intermédiaire du complexe protéique NADPH oxydase. Les mécanismes décrits pourraient donc se produire.

### 4.3.5 3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone - PPFdq

La structure diquinone du propofol n'est pas un produit du métabolisme, mais elle peut être produite par l'association de deux radicaux du propofol. Cela nécessite d'abord la formation d'un diphenol qui peut par la suite subir successivement deux oxydations. Eastmond et al.[289] ont montré que l'oxydation de phénols par le système peroxydasique MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit à la formation de diphenol et diquinone [287]. Il a également été établi que lors de la perfusion de certaines formulations du propofol (Diprivan), celles-ci peuvent subir une oxydation due à la présence de sulfites et conduisant à la formation du diphenol et de la diquinone [292, 293, 294].

Des études de voltammétrie cyclique ont révélé que l'oxydation du propofol en solution induit la formation d'une couche de passivation composée d'un polymère formé par association de radicaux du propofol. Cette couche de couleur jaune fait penser à la forme diquinone qui induit sa coloration jaune lorsqu'elle est formée en solution [295, 296].

## 4.4 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

### 4.4.1 Propofol

Le propofol étant un phénol, il présente, avec son cycle aromatique et un groupement hydroxyle, une structure similaire à celle de molécules antioxydantes connues comme le BHT (tert-butylhydroxytoluène) ou le trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) [297]. Les molécules antioxydantes phénoliques possèdent un ou plusieurs groupements hydroxyles, caractérisés par une capacité importante de transfert d'électrons et d'hydrogènes. La présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques permet la stabilisation, par effet de résonance, de leur état radicalaire, formé par leur oxydation. L'électron non apparié du groupement O· va se délocaliser dans le cycle aromatique pour former différentes structures mésomères du radical (figure 4.3) et le stabiliser en abaissant son énergie.

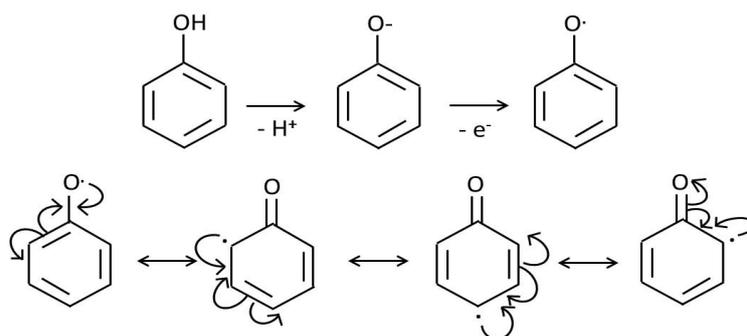


FIGURE 4.3 – Mécanisme d'oxydation des phénols (formation du radical phénoxy) et stabilisation du radical par effet de résonance (formation des formes mésomères).

De nombreuses études se sont intéressées à la capacité antioxydante du propofol. L'article de Gülçin et al. [298] porte sur l'étude de l'activité antioxydante totale de la molécule anesthésiante. Le propofol est capable d'agir comme piègeur de radicaux libres tels que le DPPH· et d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La molécule présente également un pouvoir réducteur et chélateur de métaux. L'étude montre que le propofol présente une activité, dans ces différents tests, similaire, voire supérieure, à celle du BHA, du BHT et de l' $\alpha$ -tocophérol. Le propofol est un bon piègeur de radicaux organiques en solution aqueuse, comme les radicaux produits par l'irradiation de la riboflavine

[299] et les radicaux DPPH [298] et ABTS [300]. Il inhibe la formation de malondialdéhyde, produit de dégradation formé par la peroxydation de l'acide arachidonique [299]. Le propofol est capable de céder un électron et un hydrogène à différentes espèces radicalaires (peroxynitrite  $\text{ONOO}\cdot$  [286, 301], radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  [298, 302], radical peroxyde  $\text{ROO}\cdot$  [303, 304] et radical alkoxyde  $\text{RO}\cdot$  [303]) afin de former un radical phénoxy. Le propofol permet de protéger les cellules endothéliales de l'action oxydante du peroxynitrite [305].

Des études ont également démontré que des concentrations cliniques de propofol peuvent inhiber la peroxydation lipidique dans différents milieux, comme les microsomes [306, 297, 307] et les mitochondries isolées du foie de rats [308]. De la Cruz et al. [309] ont mis en évidence l'inhibition de la formation de peroxydes lipidiques dans différents tissus d'organes de rats et l'augmentation du système de défense antioxydant des cellules faisant intervenir le glutathion. Le propofol est également capable d'inhiber la peroxydation de l'acide linoléique par des espèces radicalaires [298]. Une augmentation faible mais significative de la capacité antioxydante du plasma chez des patients anesthésiés avec du propofol a également été constatée [310]. Suite à cela, De la Cruz et al. [311] ont montré que le propofol inhibe la peroxydation lipidique au sein des plaquettes de patients anesthésiés, en réduisant la consommation de glutathion par les cellules.

L'action neuroprotectrice du propofol sur des modèles animaux *in vitro* a été établie dans plusieurs publications. Le propofol présente une action antioxydante dans les tissus cérébraux de rats, sujets à des phénomènes d'anoxie-réoxygénation [312]. Il permet également de réduire les lésions engendrées par un épisode d'ischémie-reperfusion en jouant un rôle dans l'inhibition de la mortalité des neurones [313, 314, 315]. Le propofol est également capable de protéger les neurones contre les dysfonctionnements mitochondriaux induits par des phases d'hypoxie [316]. Malgré les effets positifs avérés du propofol dans divers modèles, des études ont néanmoins montré la neurotoxicité de la molécule sur des cerveaux ayant subi des lésions traumatiques [317, 315]. Le propofol induit aussi une activité protectrice contre l'ischémie-reperfusion au sein de différents organes. En effet, il est capable d'atténuer dans des coeurs isolés de rats, les altérations métaboliques et mécaniques induites par des espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène), probablement en réduisant la peroxydation lipidique [318]. Le propofol réduit également les lésions oxydatives au niveau du rein [319] et du foie [320] en inhibant le stress oxydatif.

Mathy-Hartert et al. [288] ont étudié séparément l'action du propofol, de sa formulation Diprivan et de l'Intralipide sur les espèces réactives de l'oxygène produites par (i) des leucocytes polymorphonucléaires (PMNs) et des cellules endothéliales stimulées ou (ii) par un système peroxydasique. Ils ont montré l'activité de piégeage dose-dépendante du propofol et du Diprivan. L'Intralipide présente aussi une action antioxydante mais plus faible.

Le propofol est également capable d'impacter et de réduire le processus de nétose, i.e. la formation de la structure fibreuse NETs (Neutrophil Extracellular Traps) produite par les PMNs [321, 322]. Cette structure est composée de filaments de chromatine décondensée et recouverts de protéines issues des granules cytoplasmiques. Le NET dépend de la formation de ROS par les PMNs (et particulièrement la NADPH oxydase) et est important pour capturer et tuer les micro-organismes pathogènes de taille trop importante pour être phagocytés. Le propofol inhibe la formation du NETs de deux façons : en réduisant la production de HOCl par la MPO et en inhibant la phosphorylation d'une kinase, la p-ERK, intervenant dans différents mécanismes cellulaires dont la nétose.

Le propofol possède également une action modulatrice de la libération de cytokines pro-

inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6,...) par les PMNs [323] et les macrophages [324]. Il inhibe la chimiotaxie des PMNs et leur migration à travers une monocouche endothéliale [325]. Il empêche aussi le mécanisme de phagocytose des PMNs, en diminuant potentiellement la concentration en calcium au sein des cellules [326, 327]. Enfin, lors du traitement des chocs induits par l'administration d'endotoxines chez le rat, le propofol diminue l'activité de la MPO [328].

#### 4.4.2 PPFQ

Le remplacement de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle du propofol par un groupement glucuronide diminue fortement, voire totalement, l'activité antioxydante de la molécule. Boisset et al. [282] indiquent que le PPFQ ne montre aucune propriété de piégeage de radicaux et que le métabolite ne peut donc pas inhiber le phénomène de peroxydation lipidique, contrairement au propofol. Certains composés phénoliques comme l'acide ferulique ou l'acide caféique conservent une action antioxydante importante après l'ajout d'un groupement glucuronide, uniquement lorsqu'ils conservent un groupement hydroxyle fonctionnel [329]. Par contre, un métabolite de l'acide ferulique, où le groupement glucuronide supprime le groupement hydroxyle, voit son action fortement réduite par rapport à la molécule mère.

#### 4.4.3 PPFQ-1-G et PPFQ-4-G

Des tests *n vitro* mis en place pour évaluer l'action de piégeage de radicaux par les métabolites du propofol ont montré que l'ajout d'un groupement hydroxyle pour former le 2,6-diisopropyl-1,4-quinol n'augmente pas la capacité antioxydante du propofol, bien que pour certains phénols, comme des flavonoïdes, l'activité antioxydante dépend du nombre de fonctions hydroxyles [282]. Par contre, le remplacement d'une des deux fonctions hydroxyles par un groupement glucuronide décroît l'activité antioxydante des PPFQ-1-G et PPFQ-4-G. L'ajout du groupement glucuronide diminue la lipophilie des composés, induisant l'incapacité d'interagir avec des radicaux formés au sein de structures lipidiques comme des membranes. Par conséquent, les PPFQ-1-G et PPFQ-4-G impactent faiblement le processus de peroxydation lipidique à des concentrations plasmatiques pertinentes [282].

#### 4.4.4 PPFQ et PPFQDQ

Les quinones n'ont pas directement de propriétés antioxydantes. Elles peuvent cependant en montrer après avoir été réduites en leur forme hydroquinone, par divers mécanismes [330, 331]. Les quinones peuvent également agir comme piègeur d'anions superoxydes. En effet, l'interaction entre la quinone et l'anion superoxyde provoque l'oxydation de l'espèce réactive de l'oxygène en dioxygène et la réduction de la quinone en sa forme semiquinone radicalaire. Une seconde réduction permet de former l'hydroquinone [332, 333].

### 4.5 Choix du propofol et de ses dérivés dans le cadre de cette étude

Le propofol fait partie des agents anesthésiants les plus fréquemment utilisés dans les services de soins intensifs. Il est utilisé pour son efficacité et pour la précision avec laquelle la sédation peut être contrôlée. Les propriétés antioxydantes du propofol sont connues. Parmi elles, la capacité de protection des cellules neuronales contre le stress oxydatif a été démontrée. L'effet neuroprotecteur du propofol a mené à l'extension de son utilisation chez des patients souffrant de traumatisme crânien et de lésions cérébrales [315].

Les causes pouvant amener des patients en soins intensifs sont multiples. Mais pour beaucoup, elles sont étroitement liées à l'inflammation. En effet, en réanimation, le sepsis est la première cause de mortalité. La réponse excessive de l'organisme à une infection, pouvant par exemple survenir à la suite d'un trauma ou d'une maladie, va conduire à une défaillance en chaîne des différents organes jusqu'au décès (voir section 1.3.2.5)[334, 335]. De nombreuses pathologies respiratoires sont également liées à l'inflammation (pneumonie, bronchopneumopathie chronique,...). La plus connue actuellement est la COVID19, dont les formes les plus graves peuvent conduire le malade aux soins intensifs (voir section 1.3.2.7). L'ensemble de ces pathologies sont caractérisées par une réponse excessive du système immunitaire et induisent l'arrivée sur le site inflammatoire de nombreuses cellules telles que des PMNs, macrophages ou monocytes. L'invasion des tissus par les PMNs provoque également la libération de MPO dans le milieu extracellulaire [142, 143, 144, 145]. L'implication des PMNs et de la MPO dans ces diverses pathologies en font des cibles thérapeutiques (voir section 1.3.2).

Le propofol ayant déjà montré des propriétés immunomodulatrices sur l'activité des PMNs dans diverses études (e.g. inhibition de la nétose, de la réduction de ROS), il est intéressant de poursuivre cette investigation notamment en évaluant l'impact de la molécule sur l'activité oxydante de la MPO et sur différents mécanismes des PMNs. L'action de la molécule de propofol seule a été étudiée ainsi que celle de sa forme injectable, le Diprivan, afin de déterminer l'impact de l'enveloppe lipidique sur l'efficacité de la molécule active. Afin de compléter l'étude de l'action anti-inflammatoire du propofol, des composés métaboliques et d'oxydation ont été sélectionnés. En effet, ces molécules peuvent être produites dans l'organisme de diverses manières suite à l'administration du propofol. Etant rapidement présentes dans l'organisme après l'administration de la molécule, il est intéressant d'évaluer leur impact sur le processus inflammatoire. Elles ont donc également été étudiées au regard de leur potentielle action inhibitrice sur l'activité de la MPO et de leur impact sur les PMNs.

Parmi les six dérivés décrits, les composés PPFQ, PPFQ et PPFQ ont été sélectionnés pour cette étude. Le PPFQ étant le principal métabolite du propofol (70%), il a été choisi afin d'étudier l'influence de l'ajout d'une fonction glucuronide sur l'action inhibitrice du propofol. Les autres métabolites glucuronides (PPFQ-1-G et PPFQ-4-G) se retrouvent en plus faible quantité dans le plasma. Ils sont également plus difficiles à obtenir à un coût raisonnable et en quantité suffisante pour les différentes analyses prévues. C'est pourquoi ils n'ont pas été retenus pour ce travail. De plus, des analyses préliminaires de *docking* de leurs complexes avec la MPO n'ont pas montré de résultats en faveur d'une forte interaction avec le site actif de l'enzyme (voir annexe C). En effet, la présence de la structure glucuronide empêcherait l'insertion profonde des molécules au niveau du site et les placerait dans le canal d'accès. Les informations concernant les concentrations des métabolites détectées dans le sang ont également permis de supprimer le PPFQ-4-S de la sélection. En effet, on peut supposer que sa production en faible concentration va impacter défavorablement sa capacité inhibitrice potentielle sur le processus inflammatoire.

Le PPFQ a également été retenu. Sa petite taille ainsi que la présence d'un second atome d'oxygène en position para semblent intéressantes quant à la potentielle interaction de la molécule avec la MPO. De plus, ce composé est détecté dans le sang de patient anesthésié et prédominerait sur la forme quinol [281]. Le PPFQ a pu être facilement synthétisé en quantité suffisante pour l'ensemble des analyses prévues dans ce travail, tout comme le PPFQ (voir annexe C). Enfin, en tant que quinones, les deux composés peuvent présenter un impact sur l'action oxydante des PMNs. En effet, le caractère lipophile des composés quinones leur permet de s'insérer facilement dans les membranes plasmiques où ils sont connues pour agir comme transporteur d'électrons dans divers processus (mitochondries, NADPH oxydase [336, 337]).

Les quinones peuvent également agir comme piègeurs d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde.

Le choix des trois dérivés PPFQ, PPFQ et PPFQ est évidemment une première sélection. Il serait également intéressant dans le futur d'évaluer l'action immunomodulatrice des dérivés non retenus pour ce travail.

## 4.6 Etude de l'action réductrice et antioxydante du propofol et de ses métabolites

### 4.6.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Les propriétés d'oxydoréduction des composés chimiques sont fortement dépendantes de la composition et du pH du milieu dans lequel ils se trouvent. Au cours de ce travail, la majorité des expériences a été réalisée dans du tampon phosphate ou PBS à pH 7.4 afin de simuler le pH physiologique. Par conséquent, le potentiel d'oxydoréduction du propofol et de ses dérivés a été estimé dans du tampon phosphate pH 7,4 grâce à la voltammétrie cyclique (voir section 2.1.1).

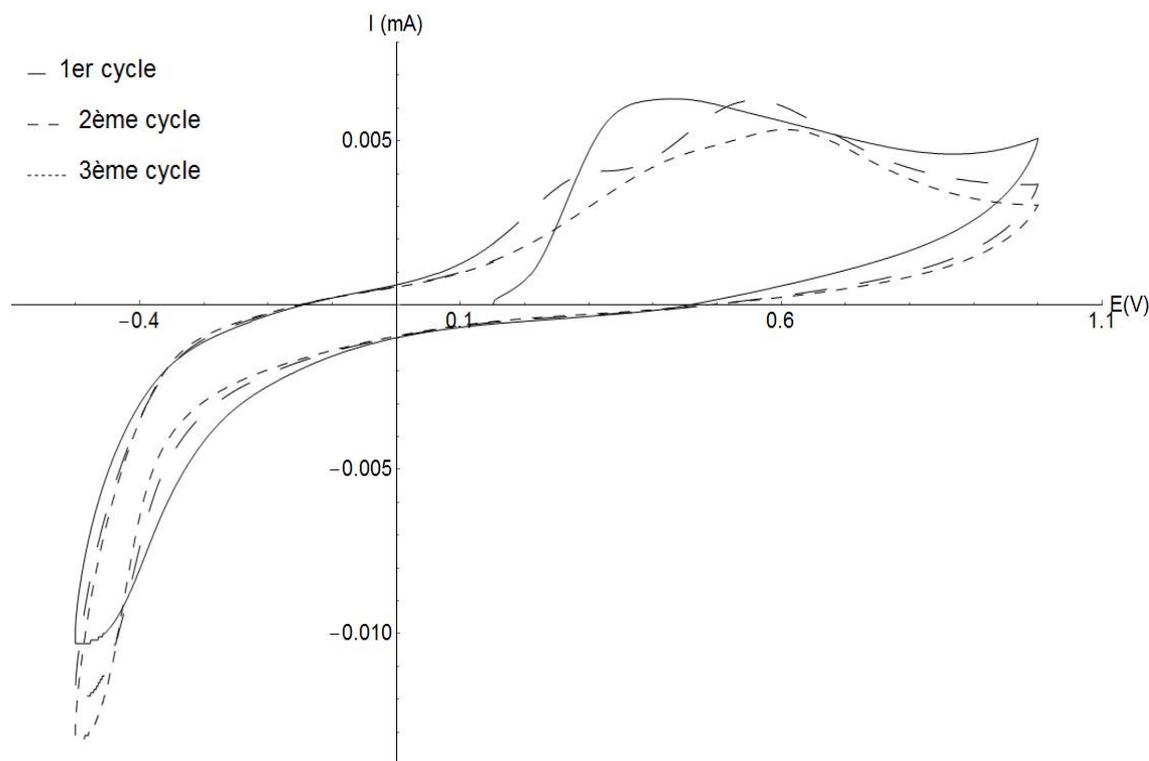


FIGURE 4.4 – Voltammogrammes du propofol ( $10^{-3}\text{M}$ ) dans du tampon phosphate pH 7,4, obtenus lors des trois premiers cycles (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

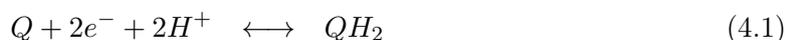
La figure 4.4 montre les trois premiers voltammogrammes du propofol. Comme décrit par Langmaier et al. [338], l'allure des voltammogrammes varie à chaque cycle successif. Lors du premier cycle, un premier pic d'oxydation apparaît à +428 mV. Il est attribué à l'oxydation de la forme monomérique du propofol. Aucun pic inverse associé n'est observé. Cela suggère que, dans ces conditions, l'oxydation du propofol est un processus irréversible, probablement

suivi par une réaction chimique subie par le radical phénoxy produit. Un pic de réduction est observé à un potentiel négatif, comme montré par Pissinis et Marioli [339]. Lors du second cycle, le pic d'oxydation est décalé vers un potentiel plus élevé de +560 mV. Un second pic apparaît également à +290 mV. Il correspond à l'oxydation de la forme dimérique formée par l'association des formes radicalaires du propofol produites par son électro-oxydation. En effet, comme décrit dans la littérature pour de nombreux composés phénoliques [241, 340, 341], le mécanisme de réaction lors de l'électroanalyse du propofol est un processus ECE (Electron transfer - Chemical reaction - Electron transfer). La première oxydation du propofol monomérique donne lieu à la formation de radicaux phénoxy, qui vont s'associer pour former des dimères, eux-mêmes électrochimiquement actifs. Plus le nombre de cycles augmente, plus les deux pics d'oxydation se décalent vers des valeurs de potentiel croissantes. Notre étude a été réalisée dans un milieu à pH 7,4. Dans ces conditions, la décroissance de l'amplitude des pics d'oxydation peut être observée lors des cycles successifs jusqu'à leur disparition après quatre scans. Ce phénomène a également été observé par Langmaier et al. [338]. L'oxydation du propofol et des dimères formés conduit à la formation d'une couche polymérique jaune sur la surface en carbone de l'électrode de travail et la surface en platine de la contre-électrode. Cette couche provoque la passivation des électrodes [295, 296]. La basification du milieu provoque également la diminution des valeurs de potentiel attribuées aux différents pics par rapport à celles observées dans la littérature [338, 339]. D'autres composés phénoliques ont également montré ce comportement (morphine, acide gallique, quercétine [342, 343, 341]). Enfin, le pic de réduction observé, comme dans l'étude de Pissinis et Marioli [339], pourrait être attribué à la réduction de l'espèce polymérique formée.

Afin d'évaluer la capacité réductrice du propofol vis-à-vis de différentes espèces oxydantes comme des ROS et, plus particulièrement, les composés d'oxydation de la MPO (composés I et II), il a fallu estimer son potentiel d'oxydoréduction. Le processus d'électro-oxydation du propofol étant irréversible, le potentiel redox ne peut pas être déterminé précisément. Par conséquent, la méthode d'Espinoza et al. [169] permet d'obtenir une estimation convenable (voir annexe E). C'est pourquoi le potentiel de demi-pic du pic d'oxydation du propofol a été déterminé. Son potentiel d'oxydoréduction est donc estimé à +280 mV vs SCE, soit +524 mV vs ESH (électrode standard à hydrogène).

L'étude électrochimique des quinones est plus complexe. En effet, l'échange d'électrons et de protons dépend fortement du milieu d'étude et, plus précisément, de sa teneur en protons (figure 4.5). Dans un milieu aprotique, comme un solvant aprotique (DMSO, DMF), une quinone subira deux réductions successives à un électron pour donner tout d'abord la forme anion radicalaire de la molécule et ensuite la forme dianionique. Par contre, dans des milieux tamponnés, une seule réduction à deux électrons et deux protons permet de former la forme hydroquinone [344, 345].

La figure 4.6 présente le voltammogramme du PPFQ dans du tampon phosphate pH 7,4. Dans ce milieu protoné, une réduction à deux électrons et deux protons de la quinone vers sa forme hydroquinone (2,6-diisopropyl-1,4-quinol) est observée à -179 mV (équation 4.1). Cette valeur est proche de celle obtenue par Ferrier et al. [346]. Le phénomène de réduction est réversible car le pic d'oxydation associé de l'hydroquinone est observé à -109 mV. Le potentiel de demi-vague  $E^{1/2}$  est de -144 mV vs SCE, soit +99 mV vs ESH.



La figure 4.7 illustre quant à elle le voltammogramme du PPFQ dans le DMF. Une succession

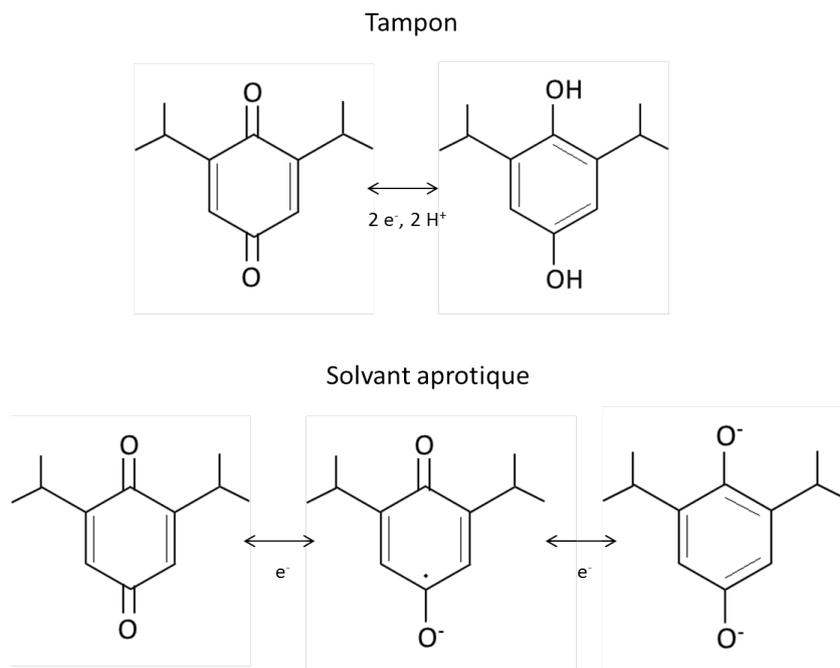


FIGURE 4.5 – Réactions d’oxydoréduction du PPFQ dans un milieu protoné (tampon) et dans un milieu non protoné (solvant aprotique).

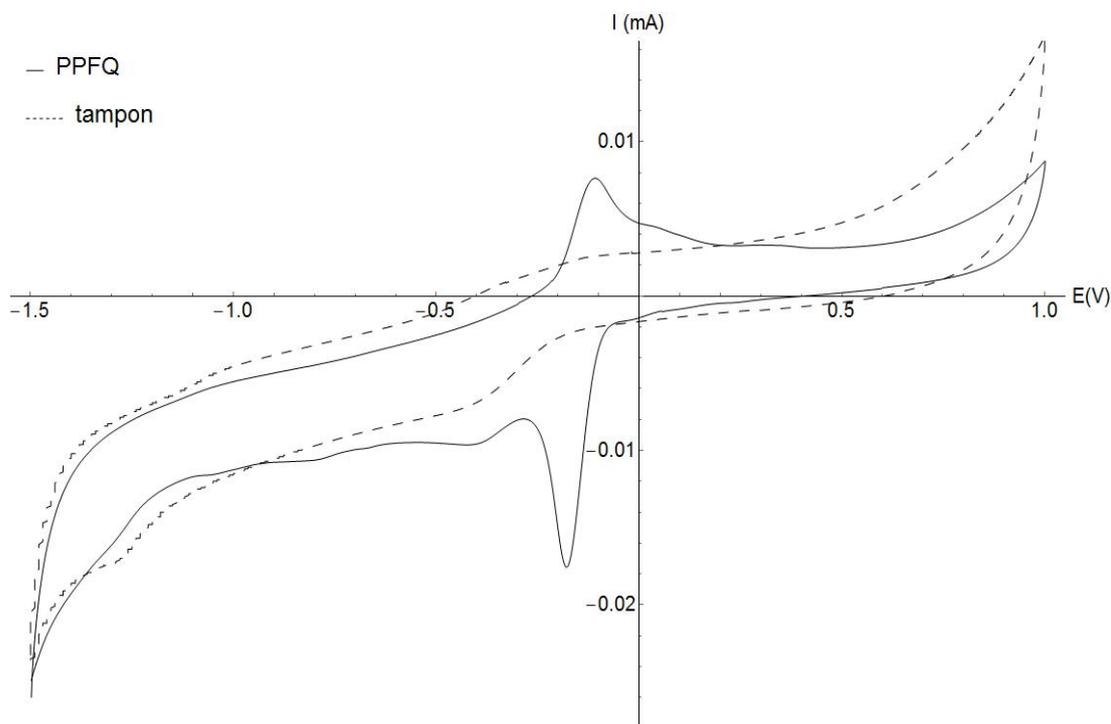


FIGURE 4.6 – Voltammogramme du PPFQ ( $10^{-3}\text{M}$ ) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d’acquisition : 10 mV/s). L’électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

de deux phénomènes à un électron peut être observée (équations 4.2 et 4.3). Le bromure de tétrabutylammonium ( $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{BrN}$ ) est utilisé comme électrolyte de support afin d’augmenter la conductivité du milieu réactionnel. Celui-ci est électroactif dans la même gamme de

potentiel que le PPFQ. Le voltammogramme du  $C_{16}H_{36}BrN$  présente un pic d'oxydation et de réduction à  $-688$  mV et  $-784$  mV respectivement (courbe pointillée). Cependant, les pics peuvent être distingués de ceux du PPFQ. Pour la quinone, le premier couple de pics d'oxydo-réduction correspond au passage de la forme quinone vers le radical anionique et inversement (équation 4.2). Le potentiel de demi-vague correspondant est de  $-524$  mV vs SCE, soit  $-281$  mV vs ESH. Le second couple de pics, caractérisés par des valeurs de potentiel plus faibles, correspond à la transformation du radical anionique en une forme dianionique (équation 4.3). Le potentiel de demi-vague correspondant est de  $-1,13$  V vs SCE, soit  $-888$  mV vs ESH.

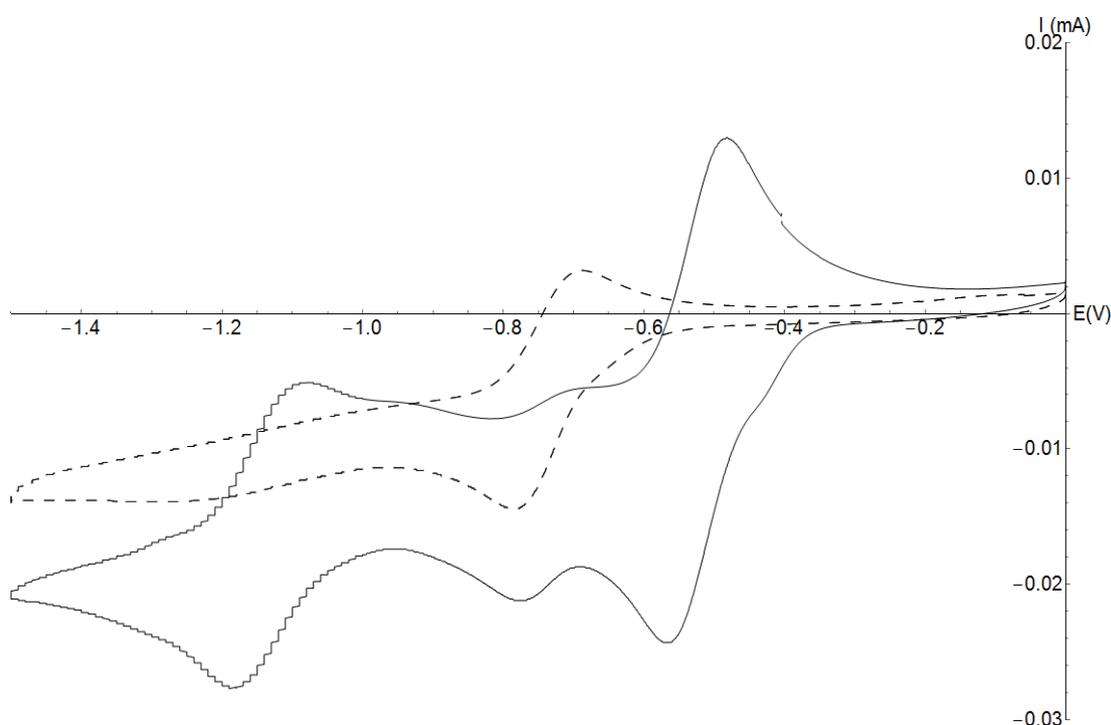


FIGURE 4.7 – Voltammogramme du PPFQ ( $10^{-2}M$ ) dans du DMF en présence de  $100mM$  de  $C_{16}H_{36}BrN$  (courbe pleine). Voltammogramme du  $C_{16}H_{36}BrN$  ( $100mM$ ) dans du DMF (courbe pointillée). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée (vitesse d'acquisition :  $10$  mV/s).

Pour le PPFQ, un comportement similaire au PPFQ est observé que ce soit en milieu protoné (figure 4.8) ou non (figure 4.9). Dans du tampon phosphate, un processus d'oxydoréduction à deux électrons est observé (équation 4.1). Le pic de réduction apparaît à  $+11$  mV et le pic d'oxydation associé à  $+63$  mV. Le potentiel de demi-vague  $E_{1/2}$  est donc de  $+37$  mV vs Ag/AgCl, soit  $+234$  mV vs ESH.

Dans le DMF, le premier couple de pics d'oxydoréduction correspond au passage de la forme quinone vers le radical anionique et inversement (équation 4.2). Le potentiel de demi-vague correspondant est de  $-323$  mV vs SCE, soit  $-79$  mV vs ESH. Le second couple de pics, caractérisés par des valeurs de potentiel plus faibles, correspond à la transformation du radical anionique en une forme dianionique (équation 4.3). Le potentiel de demi-vague correspondant est de  $-793$  V vs SCE, soit  $-549$  mV vs ESH.

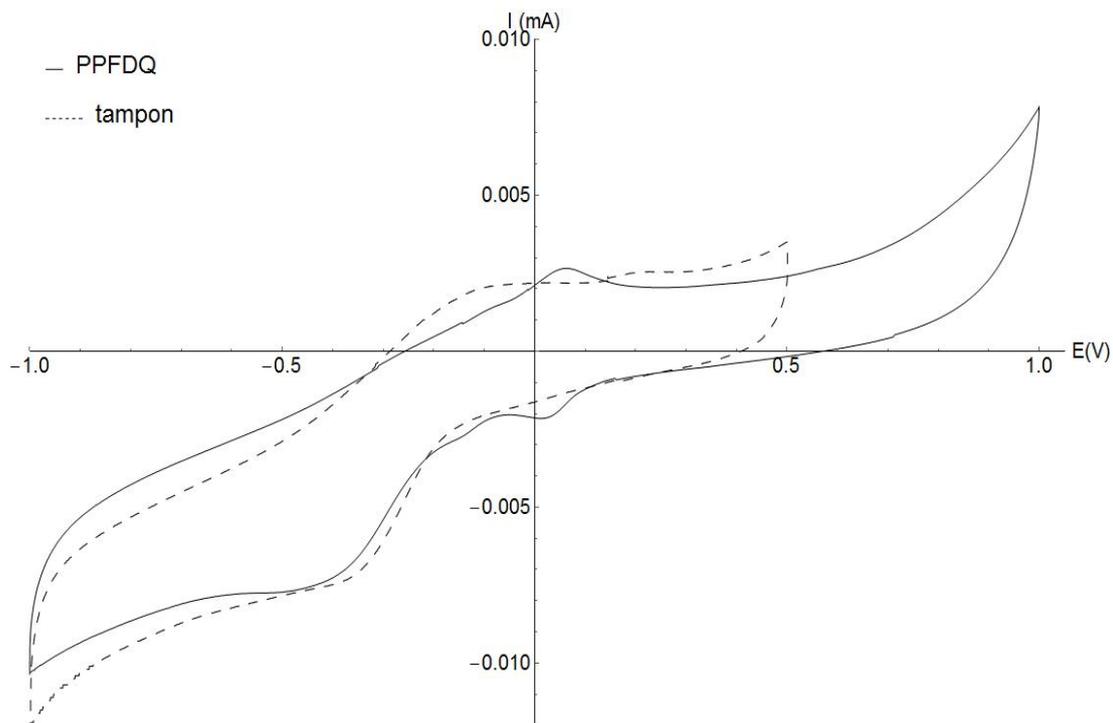


FIGURE 4.8 – Voltammogramme du PPFQQ ( $10^{-3}\text{M}$ ) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMF)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de Ag/AgCl (KCl saturée).

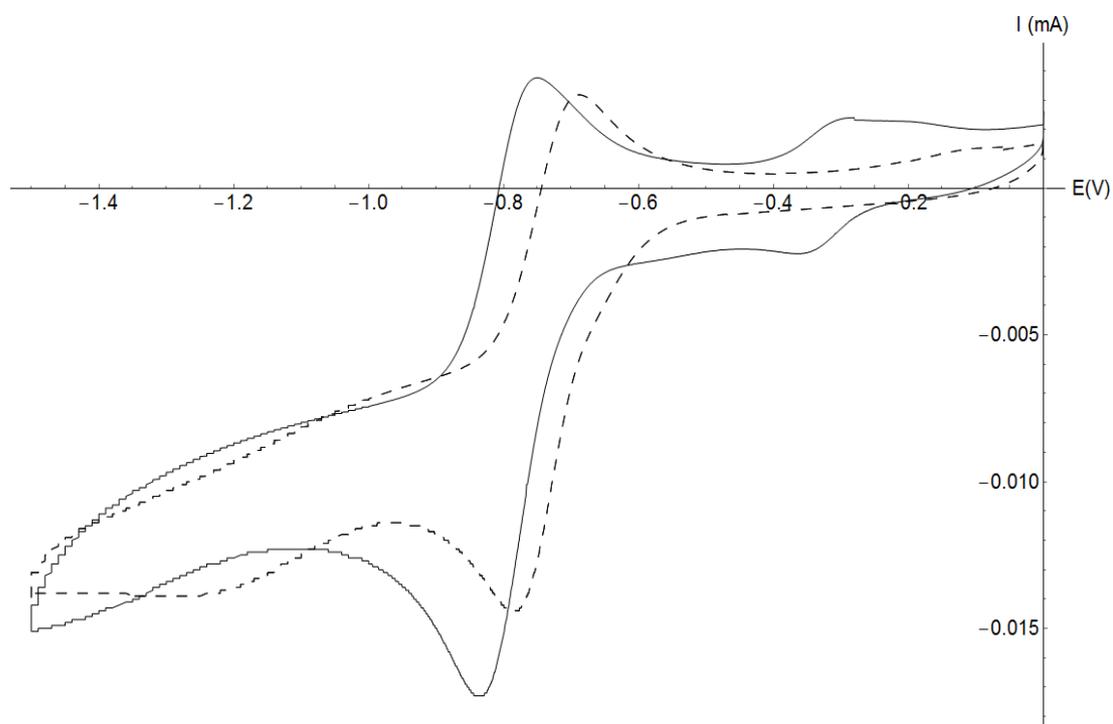


FIGURE 4.9 – Voltammogramme du PPFQQ ( $10^{-3}\text{M}$ ) dans du DMF en présence de 100mM de  $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{BrN}$  (courbe pleine). Voltammogramme du  $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{BrN}$  (100mM) dans du DMF (courbe pointillée). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée (vitesse d'acquisition : 10 mV/s).

### 4.6.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS

L'ABTS, associé à la spectroscopie d'absorption, est fréquemment utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante et plus précisément réductrice de composés d'intérêt (voir section 2.1.2). Le potentiel d'oxydoréduction du couple  $\text{ABTS}^+/\text{ABTS}$  a été estimé à +698 mV (voir section 2.1.2) par voltammétrie cyclique. Par conséquent, les molécules présentant un potentiel inférieur sont capables de réduire le radical  $\text{ABTS}^+$  en lui cédant un électron.

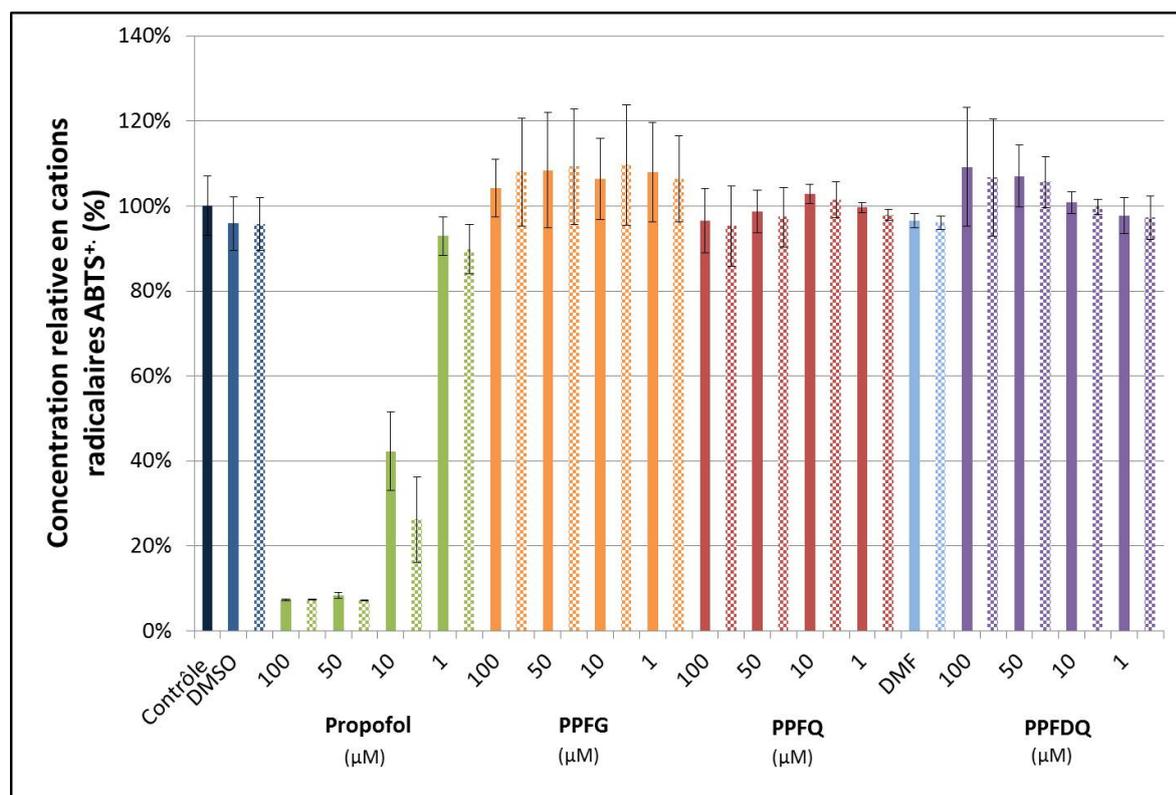


FIGURE 4.10 – Action réductrice du propofol et de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPFQ) sur les radicaux  $\text{ABTS}^+$  en solution aqueuse. La mesure a été réalisée immédiatement après l'ajout de la solution d' $\text{ABTS}^+$  dans les puits de la plaque d'analyse (couleur pleine) et après une incubation de trente minutes dans le noir suite à la première mesure (couleur quadrillée). Le pourcentage de l'activité de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2 et n=3).

La figure 4.10 illustre l'action de réduction du propofol et de ses trois dérivés (PPFG, PPFQ et PPFQ) sur le radical  $\text{ABTS}^+$  produit chimiquement via l'oxydation de l'ABTS par le persulfate de sodium. La mesure de l'absorbance de la solution d' $\text{ABTS}^+$  à 740 nm a été réalisée immédiatement après l'ajout de la solution dans les puits de la plaque multipuits de mesure (couleur pleine) et trente minutes après la première mesure, après une incubation dans le noir (couleur quadrillée). Les deux solvants, le DMSO et le DMF, n'induisent pas de décroissance significative de la concentration en radicaux au cours du temps. Le propofol est caractérisé par un potentiel redox inférieur (+524 mV) à celui de l'ABTS et est donc capable d'agir comme agent réducteur. En effet, aux deux plus grandes concentrations 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ , le phénol peut réduire plus de 90% des radicaux en solution immédiatement après le déclenchement de l'expérience. Cette capacité de piégeage élevée perdue dans le temps et est conservée après trente minutes. A 10  $\mu\text{M}$ , le propofol piège initialement 58% des radicaux et cela augmente à 74% après une heure. A la plus faible concentration testée, le propofol ne

réduit pas la concentration en radicaux  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  de façon significative.

Les composés phénoliques présentent globalement une action réductrice importante. Ils possèdent au moins un groupement donneur d'électron tel que le groupement hydroxyle. Le propofol possède un seul groupement hydroxyle. Les radicaux phénoxyls formés à la suite de l'oxydation des phénols présentent une grande stabilité et, par conséquent, une faible réactivité. En effet, le radical phénoxy est stabilisé par effet de résonance ou effet mésomère (figure 4.3). Cet effet est lié au phénomène de délocalisation électronique qui peut se produire dans les molécules présentant des électrons  $\pi$  (double liaison). Dans le cas du radical phénoxy, le groupement fonctionnel  $\text{O}^{\cdot}$  cède son électron non apparié au cycle aromatique, provoquant ainsi sa délocalisation. L'électron peut ensuite circuler au sein du cycle aromatique en formant différentes structures mésomères du radical. C'est la résonance des doublets du noyau aromatique qui stabilise le radical en abaissant son énergie [347, 348]. Cette stabilisation permet au propofol d'être un piègeur de radicaux efficace et cette action perdure dans le temps. En effet, les radicaux phénoxyls formés ne vont pas provoquer l'oxydation des molécules d'ABTS et par conséquent la réaugmentation de l'absorbance de la solution à 734 nm.

Le PPFQ ne présente aucune action réductrice sur le radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , immédiatement après le déclenchement de l'expérience ni après trente minutes. Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature [282]. Effectivement, la transformation du propofol en glucuronide lui fait perdre son action antioxydante. La molécule perd sa fonction hydroxyle et n'est plus capable de céder un électron aux radicaux en solution.

De la même manière, le PPFQ et le PPFQ ne présentent pas d'action réductrice significative. Une heure après le début de l'expérience, on peut tout de même observer une diminution de 13% et 10% de la concentration en radicaux  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , pour une concentration de 100  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  de PPFQ respectivement. A nouveau, ces résultats sont logiques compte tenu de la nature des molécules. En tant que composés quinones se trouvant dans un état d'oxydation maximum, le PPFQ et PPFQ n'ont pas la capacité de céder un électron à un radical.

En ce qui concerne le Diprivan, l'opacité de la solution provoquée par le solvant Intralipide empêche l'utilisation de la spectroscopie d'absorption pour étudier la capacité réductrice de la molécule. Par conséquent, la spectroscopie RPE a été préférée pour contourner ce problème. En effet, le radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  étant relativement stable, il peut être détecté en RPE à température ambiante sans l'utilisation d'un *spin trap* (voir annexe E). La figure 4.11 illustre l'impact du Diprivan sur la concentration en radical de la solution. Comme décrit dans la littérature [288], l'Intralipide présente lui-même une action de piégeage sur des espèces radicalaires. Il décroît de 40% la concentration en  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Cet effet peut s'expliquer par la présence de chaînes lipidiques insaturées dans la composition du solvant. Les deux concentrations les plus élevées en Diprivan, 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ , induisent une diminution supplémentaire d'environ 40 % de l'intensité du signal RPE de la solution en  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , par rapport au contrôle solvant. Globalement, le Diprivan présente une action réductrice inférieure à celle de la molécule active seule, le propofol. En effet, si le pourcentage de piégeage du Diprivan est calculé par rapport au contrôle considéré comme 100%, le Diprivan (molécule active + Intralipide) à 50 et 100  $\mu\text{M}$  provoque une diminution de la concentration en  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  d'environ 65% alors que le propofol seul provoque une diminution de plus de 90% (figure 4.10). Cela montre qu'il y a une compétition entre l'Intralipide et la molécule de propofol pour interagir avec les radicaux, diminuant ainsi leur action réductrice.

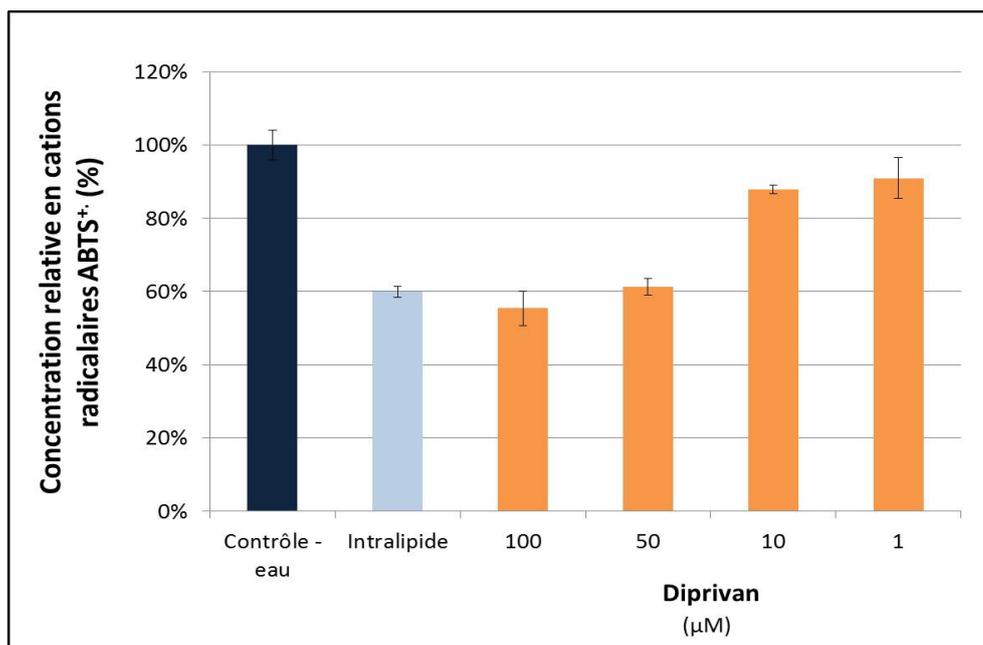


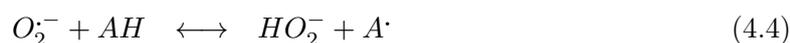
FIGURE 4.11 – Action réductrice du Diprivan sur les radicaux ABTS<sup>+</sup> en solution aqueuse, étudiée par spectroscopie RPE. Le pourcentage de l'activité de piégeage du Diprivan a été calculé par rapport à son contrôle solvant, l'Intralipide, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (Intralipide). (Paramètres d'acquisition des spectres RPE : constante de temps 20 ms, temps de conversion 40 ms, modulation d'amplitude 2G, nombre de scans 6).

#### 4.6.3 Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde

La capacité de piégeage de l'anion superoxyde par les molécules d'intérêt a tout d'abord été étudiée grâce au système enzymatique, xanthine-xanthine oxydase par spectroscopie RPE (voir section 2.1.3). L'anion superoxyde étant très réactif, il possède un temps de vie trop court pour être détecté directement en RPE stationnaire à température ambiante. C'est pourquoi la spectroscopie RPE a été combinée à la technique du *spin trapping*. Le *spin trap* DMPO a été choisi afin de former l'adduit de spin stable DMPO-OOH (voir annexe E). Si les molécules étudiées sont capables de piéger l'anion superoxyde produit par le système enzymatique et d'être compétitives avec le DMPO, elles provoquent la diminution de l'amplitude du signal RPE de l'adduit DMPO-OOH.

Le propofol est capable d'agir comme piégeur de l'anion superoxyde (figure 4.12). Ce résultat est en accord avec l'étude réalisée par Gülçin et al. [298] et celle de Mathy-Hartert et al. [288]. Une concentration de 100  $\mu$ M inhibe presque totalement la formation de l'adduit de spin DMPO-OOH. Pour la gamme de concentrations en propofol mesurées dans le sang, 10-50  $\mu$ M, on constate une diminution de l'intensité du signal RPE de 35% et 72% respectivement par rapport au contrôle solvant DMSO. Un piégeage de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de 34% est conservé à 1  $\mu$ M.

La capacité réductrice des phénols sur l'anion superoxyde est bien connue. En effet, ils peuvent céder un électron et un proton à l'anion superoxyde pour former un anion hydroperoxyde et un radical phénoxy (équation 4.4). La protonation de l'anion hydroperoxyde donne le peroxyde d'hydrogène [349, 350].



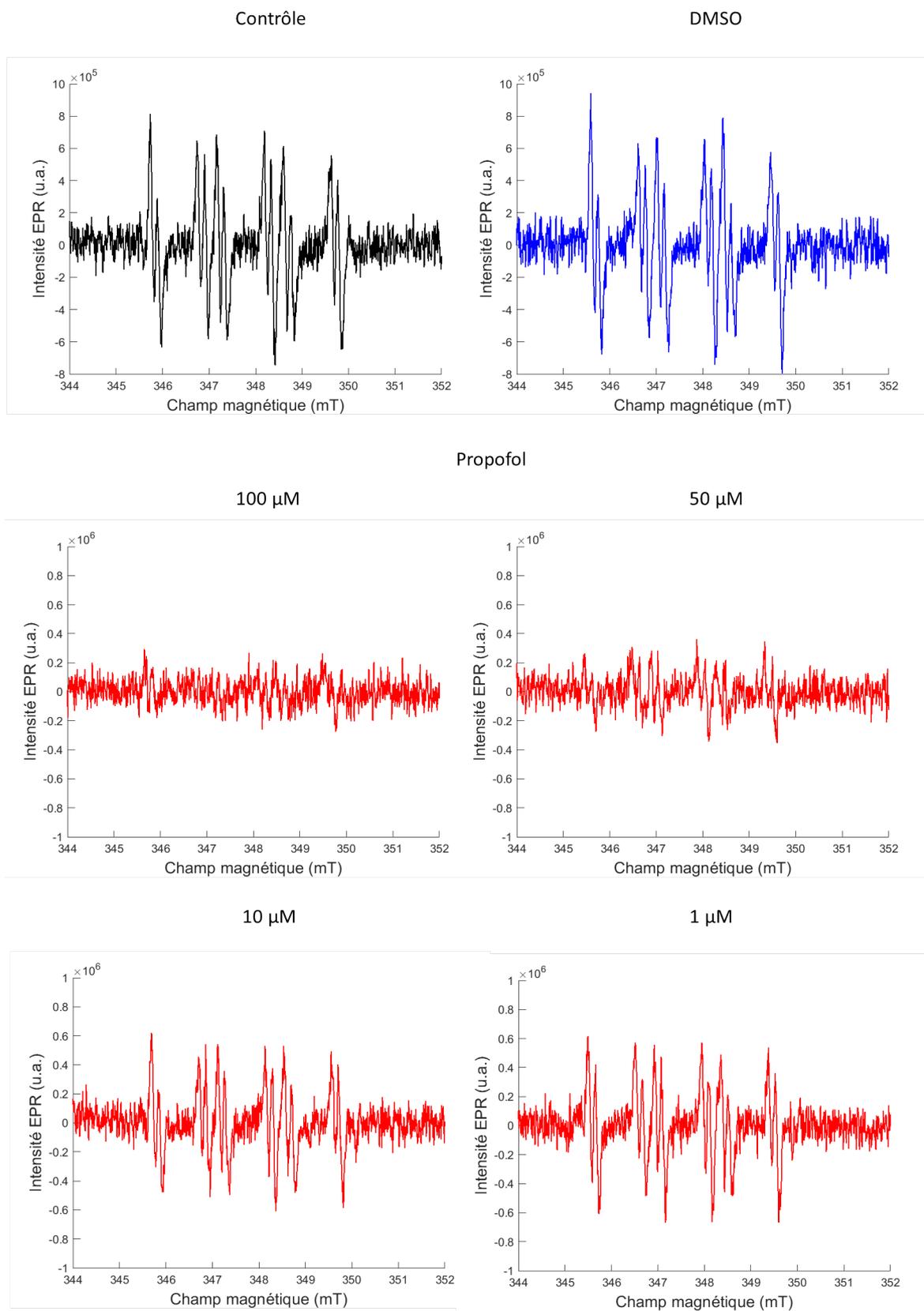


FIGURE 4.12 – Action de piégeage du propofol sur l’anion superoxyde produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

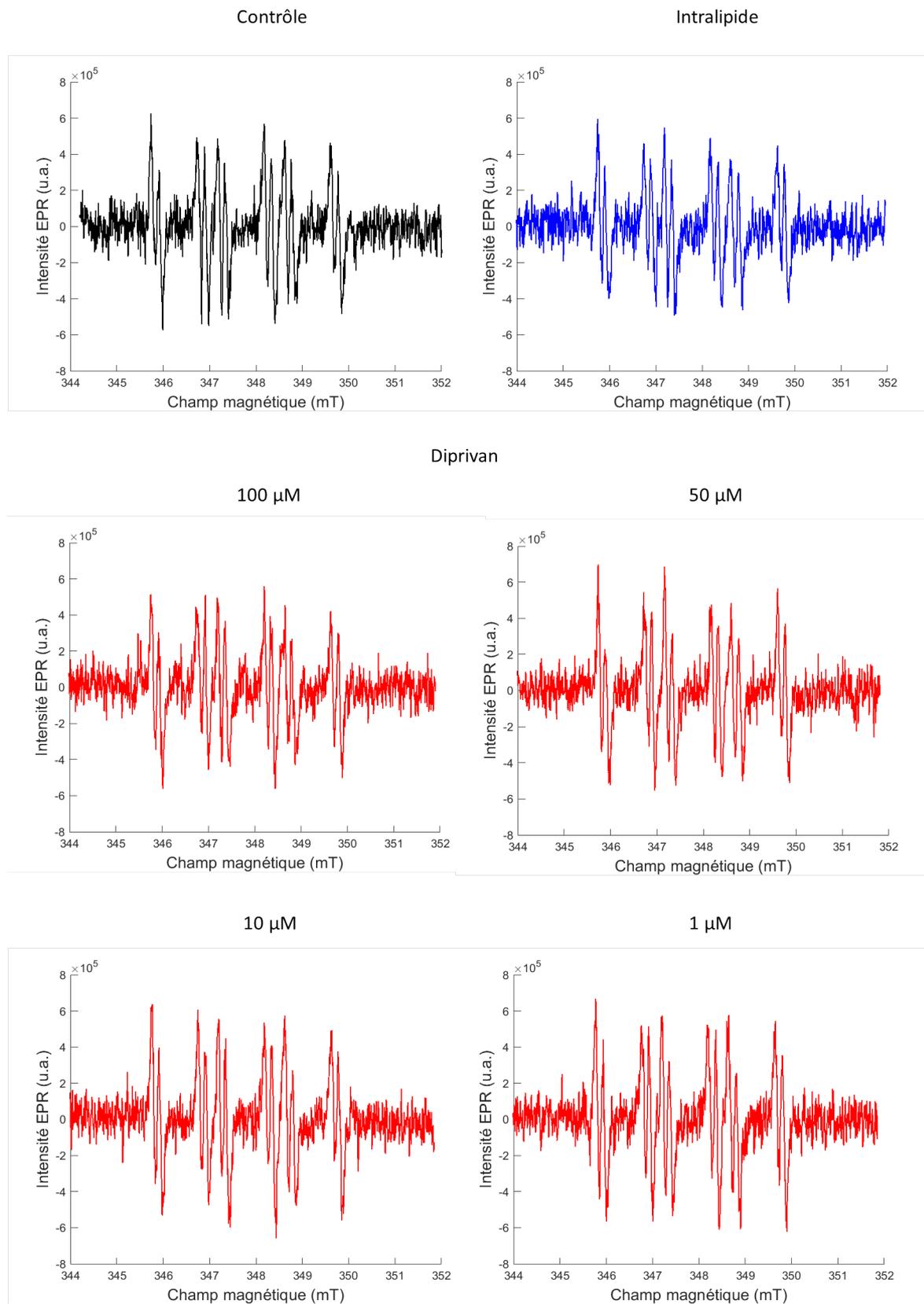


FIGURE 4.13 – Action de piégeage du PPFQ sur l'anion superoxyde produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

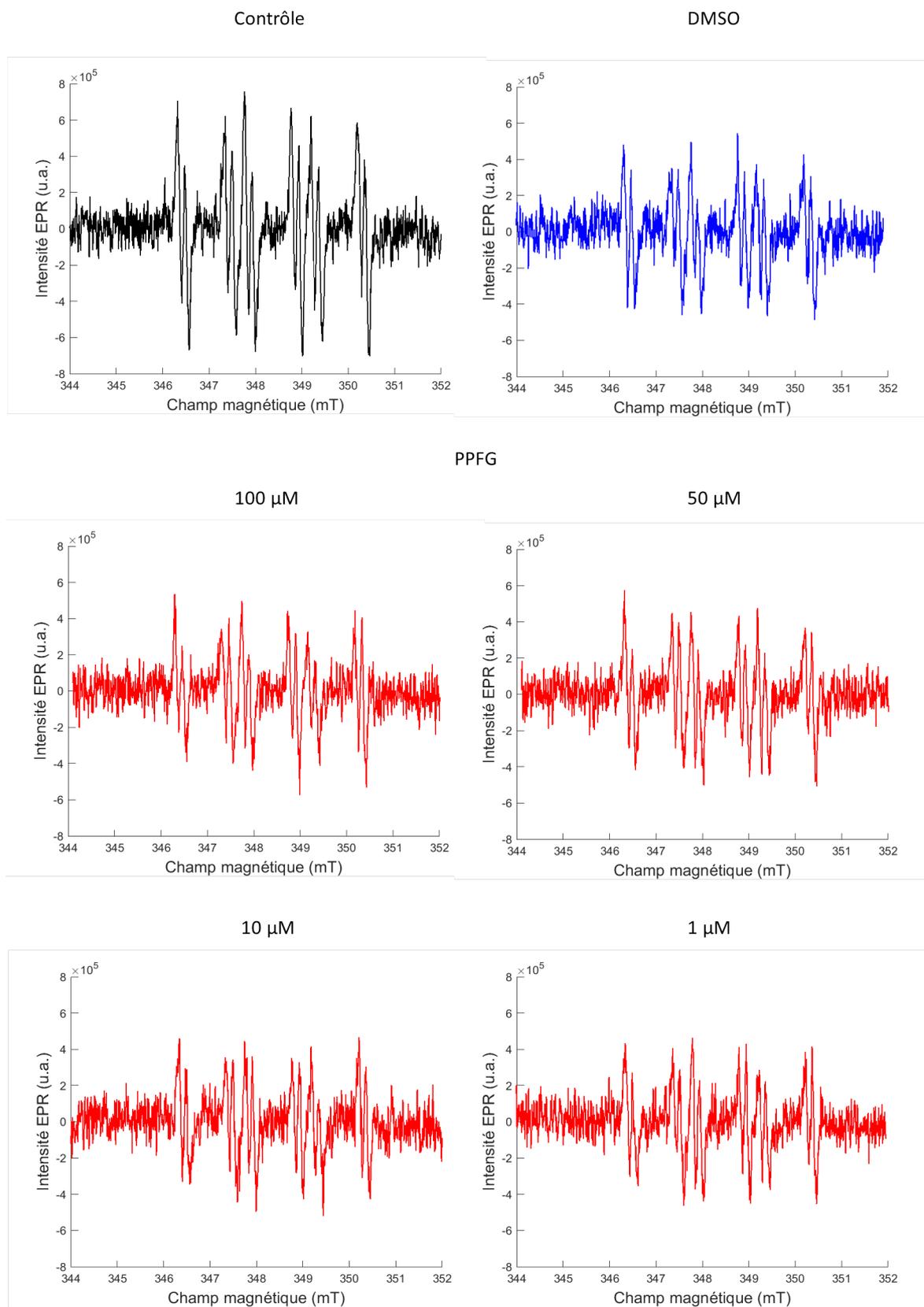


FIGURE 4.14 – Action de piégeage du PFG sur l’anion superoxyde produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

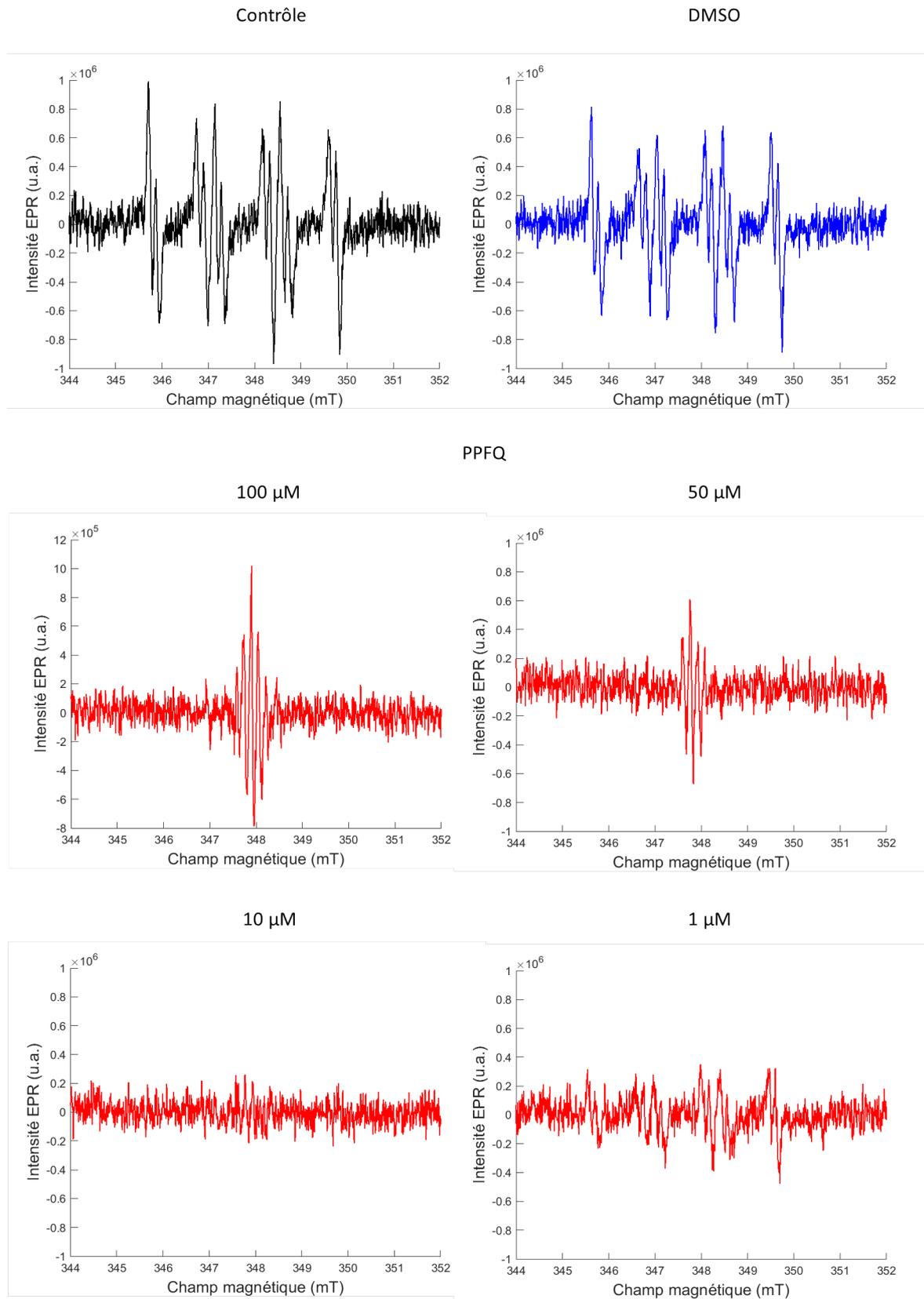


FIGURE 4.15 – Action de piégeage du PPFQ sur l'anion superoxyde produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

Le Diprivan et l'Intralipide montrent globalement une action de piégeage de l'anion su-

peroxyde (figure 4.13). La formulation de la molécule de propofol en présence de chaînes lipidiques insaturées réduit fortement son action. Ce résultat est partiellement en accord avec celui obtenu dans l'étude de Demiryurek et al. [302]. En effet, dans celle-ci, l'Intralipide ne présente pas d'action de piégeage sur le  $O_2^{\cdot-}$ . Cependant, le Diprivan montre une action de piégeage importante dans la gamme de concentration 10-100  $\mu\text{M}$ . Dans leur discussion des résultats, ils mettent en évidence que ceux-ci sont en désaccord avec ceux obtenus dans une précédente étude [299], qui elle montrait que la présence d'Intralipide réduit fortement la capacité de piégeage du propofol envers des espèces radicalaires de l'oxygène.

Le PPFQ n'a aucun effet sur la production d'anions superoxydes (figure 4.14). La molécule n'induit aucune diminution de l'amplitude du spectre du DMPO-OOH par rapport au contrôle solvant DMSO. En effet, la structure de la molécule ne lui permet pas de provoquer la réduction ou l'oxydation de l'anion superoxyde.

Dans le cas du PPFQ (figure 4.15), la forme quinone du propofol piège l'entièreté de l'anion superoxyde produit par le système xanthine-xanthine oxydase pour une gamme de concentration de 10 à 100  $\mu\text{M}$ , inhibant ainsi totalement la formation de l'adduit DMPO-OOH (disparition totale de son signal RPE). La plus faible concentration de 1  $\mu\text{M}$  piège plus de 50% de l'anion superoxyde produit. Aux deux plus hautes concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$ , le spectre du radical anionique du PPFQ peut être observé. En effet, la réduction des quinones par l'anion superoxyde en leur forme semiquinone radicalaire a déjà été démontré dans la littérature [333, 350]. La simulation du spectre expérimental, réalisée avec le programme Easyspin, a permis de déterminer les constantes hyperfines du spectre RPE du radical. L'électron non apparié étant délocalisé sur le cycle aromatique de la molécule, la structure hyperfine de son spectre est influencée par deux paires de noyaux d'hydrogène équivalents,  $a_{H1} = 13,36$  G et  $a_{H2} = 10,56$  G (figure 4.16).

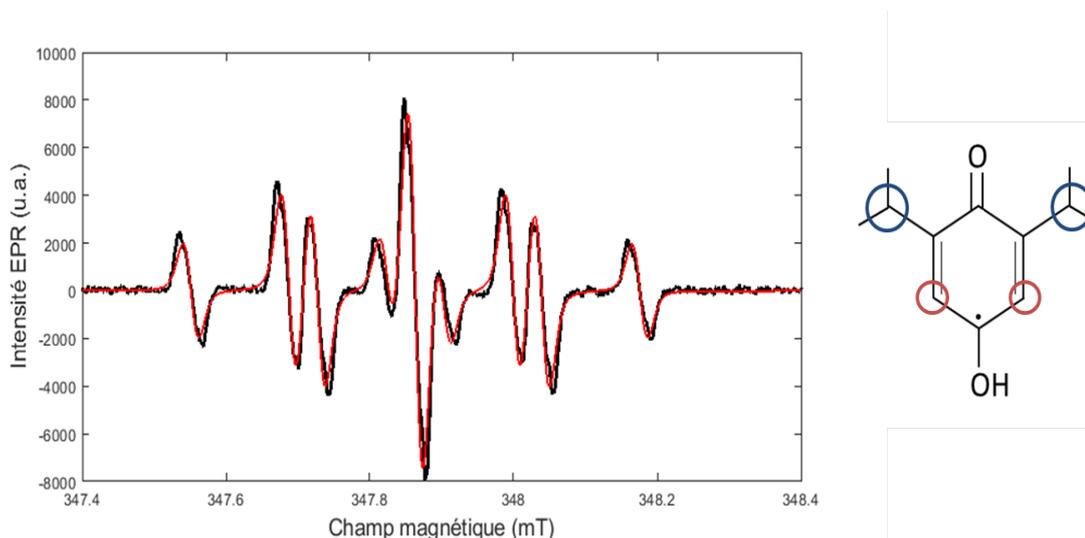


FIGURE 4.16 – Superposition du spectre RPE expérimental du radical anionique PPFQ $\cdot^-$  (courbe noire) et de sa simulation (courbe rouge).

La voltammétrie indique que la réduction du PPFQ par le système d'électrodes dans un milieu tamponné, et donc protoné, est un processus à deux électrons et deux protons, pour donner l'hydroxyquinone associée PPFQH $_2$  (équation 4.5). Le potentiel d'oxydoréduction estimé dans cette configuration est de + 99mV vs ESH.



Or, dans le cas de l'interaction entre la quinone et l'anion superoxyde, la seule espèce réductrice en présence est l'anion superoxyde et celui-ci ne peut céder qu'un seul électron. La probabilité que deux anions superoxydes puissent simultanément interagir avec la quinone pour céder au total deux électrons et permettre le passage direct de la quinone vers l'hydroquinone est faible. Par conséquent, on peut aisément supposer que le processus réel est celui de deux réductions successives à un électron et un proton (équations 4.6 et 4.7).



Or, dans nos conditions expérimentales, la voltammétrie ne permet pas d'obtenir des informations sur ces deux réactions intermédiaires en milieu protoné, car les électrodes forcent l'échange simultané de deux électrons. Cependant, on peut facilement envisager que les potentiels redox de ces deux réactions à un électron soient proches de celui de la réaction à deux électrons. En effet, le potentiel redox du processus à deux électrons peut s'exprimer en fonction des potentiels des deux processus à un électron. Il s'agit de la moyenne des deux potentiels [351].

$$2 E_{O/R}(PPFQ, 2H^+/PPFQH_2) = 1 E_{O/R}(PPFQ, H^+/PPFQH \cdot) + 1 E_{O/R}(PPFQH \cdot, H^+/PPFQH_2) \quad (4.8)$$

Les facteurs devant les termes de potentiel  $E_{O/R}$  correspondent au nombre d'électrons intervenant dans les différentes réactions.

$$E_{O/R}(PPFQ, 2H^+/PPFQH_2) = 1/2[E_{O/R}(PPFQ, H^+/PPFQH \cdot) + E_{O/R}(PPFQH \cdot, H^+/PPFQH_2)] \quad (4.9)$$

S'il n'est pas possible de déterminer les valeurs exactes de ces potentiels d'oxydoréduction, on peut néanmoins conclure que le potentiel redox du couple quinone PPFQ/PPFQH $\cdot$  est supérieur au potentiel redox à deux électrons du couple quinone PPFQ/PPFQH $_2$  et donc supérieur à + 99mV. Cette valeur est bien supérieure à celle du potentiel redox du couple O $_2^-$ /O $_2$  (-0,16 V [352]). Le PPFQ peut donc jouer le rôle d'oxydant et arracher un électron à l'anion superoxyde. Cette réaction provoque la formation de la semiquinone radicalaire PPFQH $\cdot$  détectée par la spectroscopie RPE (figure 4.15).

Le PPFQ (figure 4.17) présente une action de piégeage de l'anion superoxyde concentration-dépendante, avec une inhibition du signal RPE du DMPO-OOH de 14 % pour 1 $\mu$ M à 66 % pour 100 $\mu$ M. L'interaction de la diphénoquinone avec l'anion superoxyde est, comme pour celle du PPFQ, une réaction d'oxydation de l'espèce réactive de l'oxygène. Cependant aucun spectre de la forme radicalaire du PPFQ n'est observé.

La réflexion développée par rapport au potentiel redox du PPFQ peut être reprise pour le PPFQ. Par conséquent, le potentiel d'oxydoréduction du couple quinone PPFQ/PPFQH $\cdot$  est supérieur au potentiel redox à deux électrons du couple quinone PPFQ/PPFQH $_2$  (+ 281 mV). Comme pour le PPFQ, le PPFQ est donc capable d'oxyder l'anion superoxyde en oxygène. Le PPFQ est caractérisé par des potentiels redox supérieurs à ceux du PPFQ et possède donc un pouvoir oxydant supérieur.

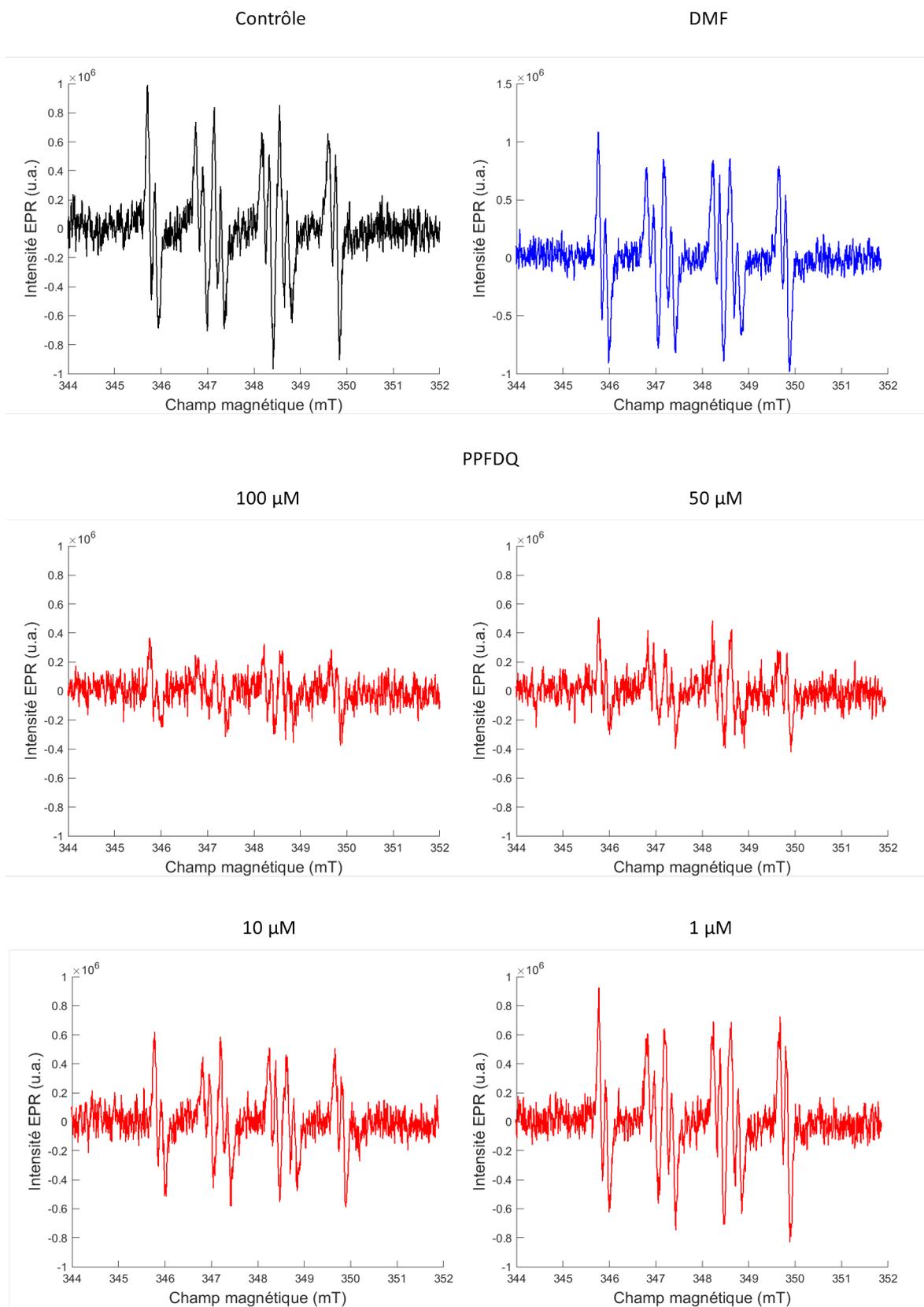


FIGURE 4.17 – Action de piégeage du PPFDQ sur l’anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

Contrairement au PPFQ, la semiquinone radicalaire PPFDQH $\cdot$  n’est pas observée en spec-

troscopie RPE. Cela peut s'expliquer par la plus grande réactivité du PPFQ et du PPFQH<sup>•</sup> vis-à-vis de l'anion superoxyde pour former l'hydroxyquinone, qui n'est pas détectable en RPE. De plus, la structure de la molécule offre une plus grande section efficace d'interaction avec l'anion superoxyde et pourrait donc interagir plus rapidement avec deux molécules d'anion superoxyde successivement.

Afin d'obtenir une évaluation quantitative plus précise de la capacité de piégeage du propofol et de ses dérivés sur l'anion superoxyde, une seconde technique d'analyse, la chimiluminescence, ainsi qu'une autre méthode de production d'anions superoxydes, le superoxyde de potassium KO<sub>2</sub>, ont été associées (voir section 2.1.3). Les résultats obtenus confirment ceux acquis en RPE. Le propofol et ses deux formes quinones, PPFQ et PPFQ, sont des piègeurs efficaces de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, tandis que le PPFQ est inactif (figure 4.18). Aux deux plus hautes concentrations testées (100 et 50 μM), le propofol induit une réduction de la concentration en O<sub>2</sub><sup>-</sup> en solution de plus de 80 %. Cette réduction chute à 45% pour une concentration de 10 μM. Le PPFQ exerce une action de piégeage du radical similaire. Celle-ci démarre à 40% pour une concentration de 10 μM et atteint entre 80 et 90% à 100 μM. Le PPFQ présente l'action la plus forte. En effet, la molécule réduit d'au moins 95% la concentration en anions superoxydes aux trois plus fortes concentrations testées (10-100 μM) et la molécule conserve une action de piégeage de 58% à 1 μM. Cette meilleure capacité de piégeage du PPFQ par rapport au PPFQ peut se comprendre en comparant les potentiels redox des deux espèces chimiques. En effet, quel que soit le milieu (tampon ou solvant), le PPFQ présente un potentiel redox supérieur à celui du PPFQ. Par conséquent, le PPFQ a un pouvoir oxydant supérieur et peut plus efficacement arracher un électron à l'anion superoxyde pour le transformer en O<sub>2</sub>.

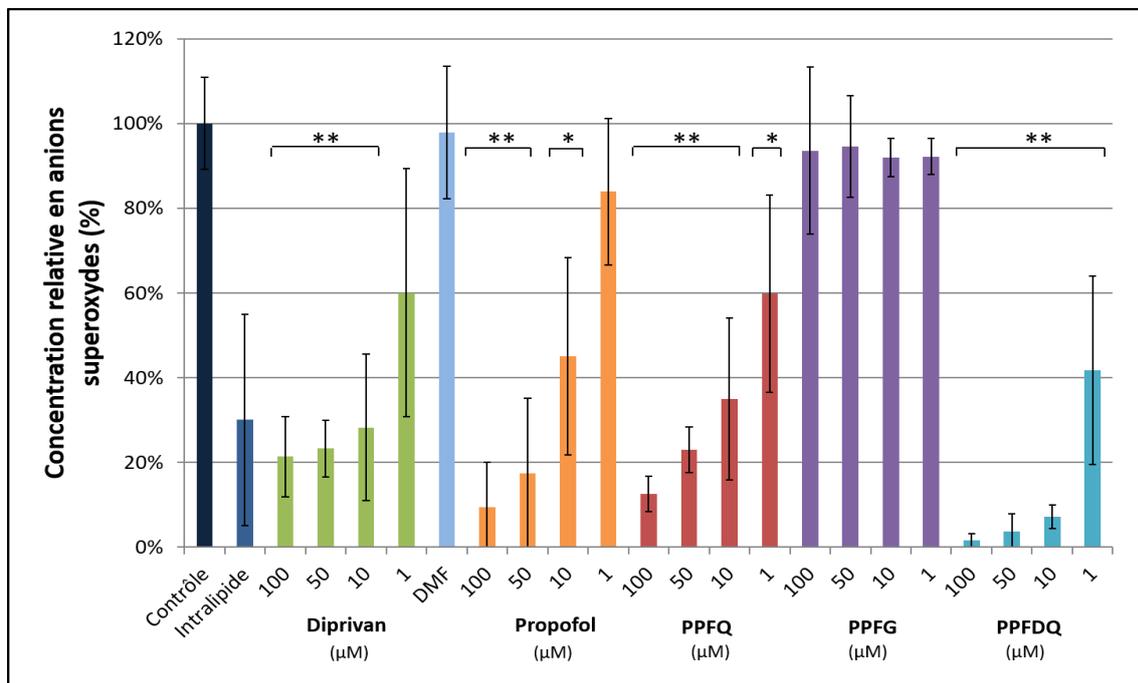


FIGURE 4.18 – Action de piégeage du propofol, de ses métabolites (PPFQ, PPFQ et PPFQ) et du Diprivan sur l'anion superoxyde, produit par la décomposition du KO<sub>2</sub>. L'anion superoxyde réagit avec une sonde chimiluminescente le L-012. Le pourcentage de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMF, Intralipide).

En ce qui concerne le Diprivan, les résultats obtenus diffèrent fortement de ceux observés avec le système xanthine/xanthine oxydase (figure 4.13). En effet, le Diprivan, ainsi que son solvant l'Intralipide, n'avaient montré aucune diminution significative de la concentration d'anions superoxydes produits par le système enzymatique. Or dans l'étude de luminescence, l'Intralipide présente lui-même une action de piégeage d'environ 70%. Par rapport au solvant, le Diprivan présente une action supplémentaire d'environ 70% entre 10 et 100  $\mu\text{M}$ . La différence de résultat viendrait-elle de la différence de technique de détection de l'anion superoxyde utilisée (spectroscopie RPE et chimiluminescence) ? En présence d'Intralipide, la molécule active (propofol) ne peut-elle pas entrer en compétition avec le *spin trap* DMPO ? Globalement, les résultats de l'étude du piégeage de l'anion superoxyde et même des espèces radicalaires de l'oxygène en générale, par le propofol, le Diprivan et l'Intralipide varient en fonction des travaux publiés [299, 303, 298]. La capacité de piégeage de la molécule active, le propofol, a été démontrée et confirmée dans notre étude. Cependant, l'impact de la présence d'Intralipide sur cette action, ainsi que l'action directe des lipides sont moins claires.

#### 4.6.4 Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet

L'oxygène singulet est un ROS produit lors du processus inflammatoire. La capacité de piégeage de l'oxygène singulet par le propofol et ses métabolites a été étudiée grâce à la spectroscopie d'absorption et le système rose Bengale-ADPA (voir section 2.1.4) (figure 4.19). L'action des molécules d'intérêt a été comparée à l'action de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), piègeur connu [245].

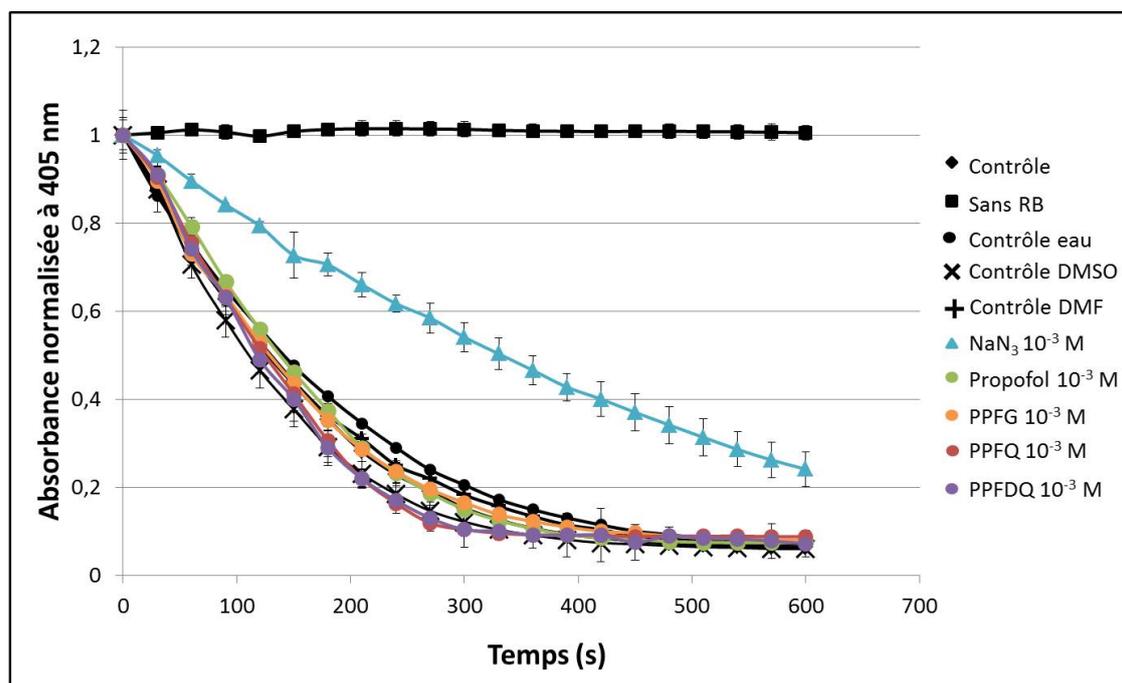


FIGURE 4.19 – Action de piégeage du propofol, du PPFQ, du PPFQD et du PPFQ sur l'oxygène singulet, produit par l'irradiation du rose Bengale (RB). L'oxygène singulet réagit avec l'ADPA et provoque la diminution de l'absorbance de la molécule à 405 nm. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=2$  (sauf PPFQ, PPFQD et PPFQ,  $N=1$ ) et  $n=3$ ).

En l'absence de piégeur, l'oxygène singulet provoque la dégradation de l'ADPA et donc la diminution de l'absorbance de la molécule à 405 nm. Sans rose Bengale, il n'y a pas de production d'oxygène singulet et donc pas de décroissance de l'absorbance. Les deux solvants, DMSO et DMF, n'impactent pas l'oxydation de l'ADPA. De même, le propofol et ses métabo-

lites (PPFG, PPFQ et PPFQD) ne présentent aucune action de piégeage. Après dix minutes d'irradiation du rose Bengale, les molécules n'empêchent pas la décroissance de l'absorbance de l'ADPA. L'incapacité de piégeage du propofol est surprenante. En effet, une étude précédente de Heyne et al. a montré la capacité d'interaction entre celui-ci et l'oxygène singulet, permettant notamment la formation des composés PPFQ et PPFQD [287, 353]. Le propofol est donc un piègeur chimique du ROS. Dans notre étude, son absence d'action peut s'expliquer par la comparaison des constantes de vitesse d'interaction du propofol et de l'ADPA avec l'oxygène singulet. En effet, la constante de vitesse de piégeage de l'oxygène singulet par le propofol est de  $2,66 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [287], alors que celle de l'ADPA est de  $8,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [174]. Par conséquent, l'ADPA est un piègeur plus rapide et plus efficace que le propofol.

L'action du Diprivan n'a pas pu être étudiée car son solvant, l'Intralipide, opacifie le milieu réactionnel et provoque la saturation de l'absorbance de la solution. Par contre, une étude de C. Senda et al. [354] a montré, grâce à l'association de la chimiluminescence et de la spectroscopie RPE, que l'Intralipide ne présente pas d'action de piégeage de l'oxygène singulet. Par contre, le Diprivan offre une action de piégeage due à la molécule active, le propofol. De plus, il inhibe la production d'oxygène singulet par des PMNs activés, suite à l'association de la propriété de piégeage du propofol et de l'interaction de l'Intralipide avec les cellules [354]. A contrario, l'étude récente de Durantini et al. [264] montre l'activité de piégeage de l'Intralipide et détermine les constantes de vitesse de réaction de piégeage de l'oxygène singulet des différents phospholipides composant l'émulsion. Ils ont établi que les phospholipides qui composent l'huile de soja étant poly-insaturés, ils présentent une constante de vitesse plus élevée ( $2,97 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) que l'acide oléique mono-insaturé ( $0,67 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). En effet, l'oxygène singulet peut réagir avec les doubles liaisons des phospholipides pour former des groupements hydroperoxydes. La constante de vitesse totale du piégeage de l'oxygène singulet est de  $3,44 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . [264]

#### 4.6.5 Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux

L'acide hypochloreux HOCl est un oxydant puissant. Le piégeage du HOCl peut donc être un moyen de diminuer les dommages oxydatifs induits par la MPO. Pour cette expérience, le HOCl a été produit chimiquement, en l'absence de MPO, grâce à une solution de NaOCl dans du tampon phosphate pH 7,4 et détecté par spectroscopie de fluorescence avec la sonde APF (voir section 2.1.5).

Le propofol est capable d'agir comme piègeur de HOCl (figure 4.20). La molécule réduit la concentration en HOCl de 55% par rapport au contrôle solvant (éthanol) à  $100 \mu\text{M}$ . Dans la gamme de concentrations plasmatiques ( $10\text{-}50 \mu\text{M}$ ), le propofol piège respectivement entre 35 et 49% du HOCl en solution. Dans le cas du Diprivan, son solvant l'Intralipide réduit à lui seul presque totalement (95%) la concentration en HOCl. La littérature a déjà rapporté cette faculté [288]. Sa composition lipidique explique ce phénomène. En effet, lors du processus inflammatoire, les phospholipides composant les différentes membranes plasmiques sont des cibles du HOCl. Celui-ci provoque l'oxydation et la chloration des phospholipides en s'attaquant notamment aux groupements alcènes et amines [355]. Le Diprivan n'induit pas de réduction supplémentaire de la concentration en HOCl, par rapport à l'Intralipide. A la plus haute concentration ( $100 \mu\text{M}$ ), le PPFQ piège 48 % du HOCl en solution. Cette capacité chute et devient négligeable à partir d'une concentration de  $50 \mu\text{M}$ . La quinone n'a pas d'action significative à sa concentration physiologique de  $5 \mu\text{M}$ . Le PPFG et le PPFQD ne présentent pas d'action de piégeage significative supplémentaire par rapport à leur solvant respectif (éthanol et DMF).

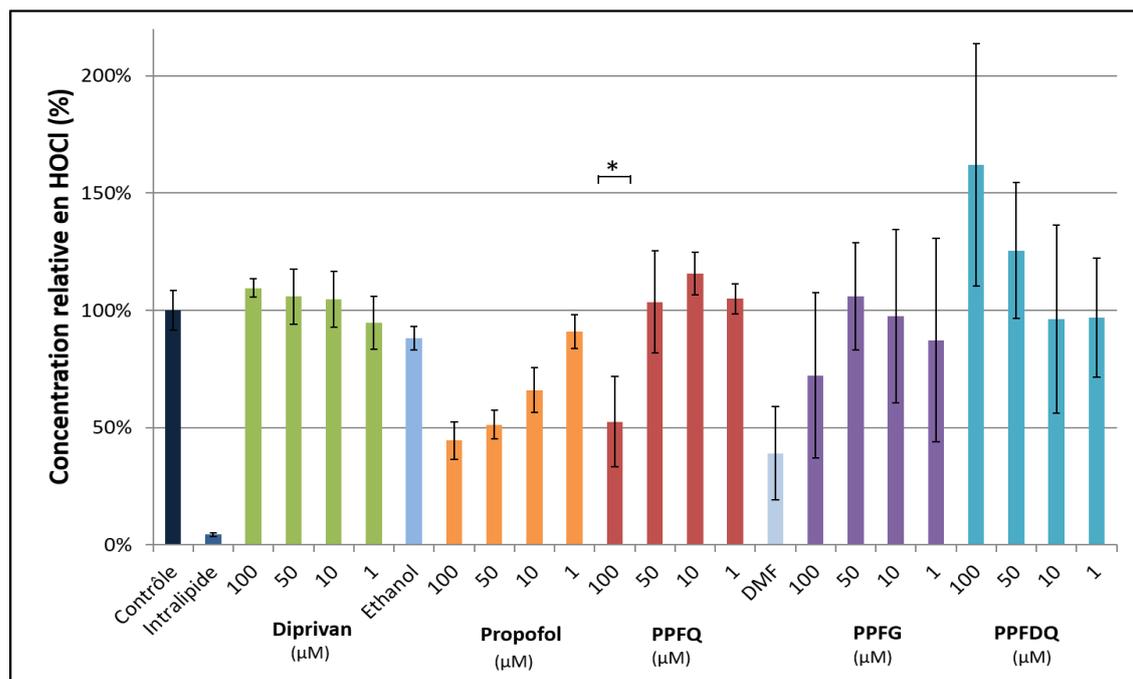


FIGURE 4.20 – Action de piégeage du propofol, de ses métabolites (PPFQ, PPFQ et PPFQ) et du Diprivan sur l'acide hypochloreux, produit par le NaOCl. Le pourcentage de piégeage du HOCl a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 (sauf propofol et Diprivan N=2) et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (éthanol, DMF).

#### 4.6.6 Bilan de l'action réductrice et antioxydante du propofol et de ses métabolites

Le propofol agit comme piègeur efficace de radicaux (ABTS<sup>+</sup>) et de ROS. Dans la gamme de concentrations détectées dans le sang de patient (10-50  $\mu$ M), la molécule montre une action significative contre l'anion superoxyde et le HOCl.

La formulation du propofol avec l'Intralipide a un impact sur l'action de la molécule active, en restreignant notamment la capacité du propofol à réduire les radicaux ABTS<sup>+</sup>. L'Intralipide est lui-même un piègeur très efficace de l'anion superoxyde et du HOCl.

Les métabolites quinones du propofol (PPFQ et PPFQ) ne montrent aucune action réductrice et n'agissent pas sur l'oxygène singulet ni sur l'acide hypochloreux. Par contre, leur structure et leur potentiel d'oxydoréducteur leur permettent d'être des oxydants puissants de l'anion superoxyde, permettant ainsi sa transformation en oxygène.

De manière générale, le PPFQ ne présente aucune action réductrice ou antioxydante significative. En effet, la molécule n'est pas capable de piéger des radicaux comme l'ABTS<sup>+</sup> ou des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde, oxygène singulet et acide hypochloreux).

## 4.7 Etude de l'action du propofol et de ses métabolites sur l'activité oxydante des PMNs

### 4.7.1 Viabilité cellulaire

Avant d'étudier l'effet inhibiteur du propofol et de ses dérivés sur différents mécanismes des PMNs (production de ROS et dégranulation), il est important d'évaluer la répercussion de ces composés sur la viabilité des cellules. Pour cela, l'impact de la plus forte concentration en molécules d'intérêt (100  $\mu\text{M}$ ) utilisée a été testée grâce au test d'exclusion au bleu trypan (voir section 2.2.2). Une incubation courte des PMNs en présence des composés d'intérêt durant dix minutes ne provoque pas d'augmentation significative de la mortalité cellulaire pour les quatre molécules testées par rapport à leur solvant (figure 4.21).

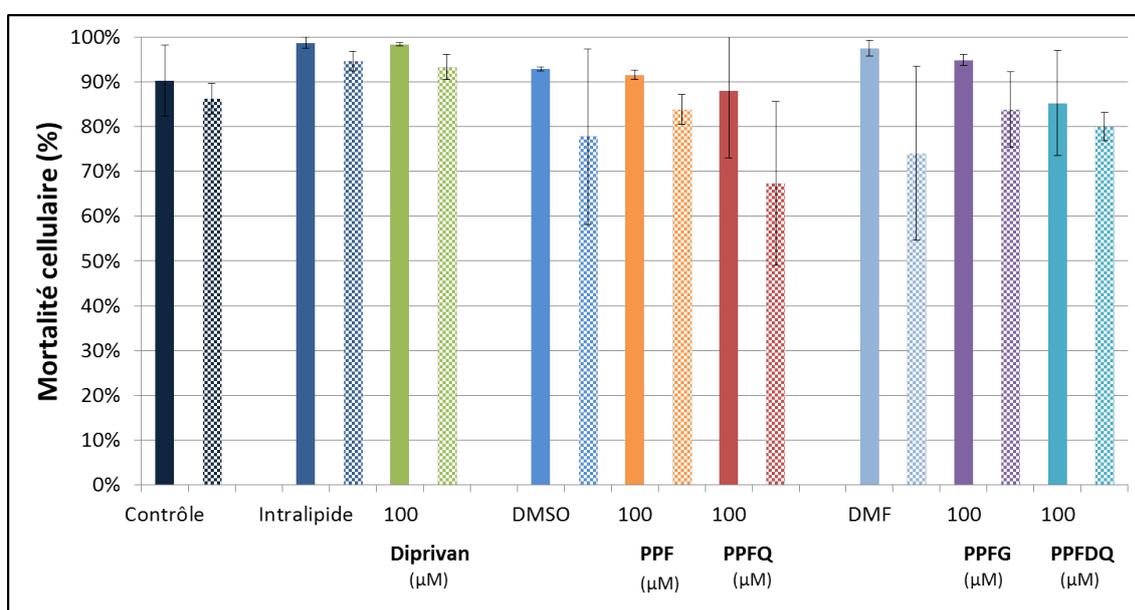


FIGURE 4.21 – Evaluation de la viabilité cellulaire de PMNs incubés en présence de propofol, de ses métabolites (PPFQ, PPFQ et PPFQ) et de Diprivan (100  $\mu\text{M}$ ) pendant dix minutes (couleur pleine) et une heure (couleur quadrillée), en terme de pourcentage de cellules vivantes. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2).

Lorsque le temps d'incubation passe à une heure, l'effet des solvants donne lieu à une augmentation de la mortalité cellulaire d'environ 11% pour le DMSO et 14% pour le DMF, par rapport au contrôle sans solvant. Le propofol, le PPFQ, le PPFQ et le Diprivan n'induisent pas d'accroissement de la mortalité par rapport au solvant. Par contre, le PPFQ provoque une légère diminution de la viabilité des PMNs de 10% comparativement au DMSO. Cependant, cet effet n'est pas significatif.

### 4.7.2 Inhibition de la production d'anions superoxydes

Lors du processus inflammatoire, les PMNs déversent au niveau du site inflammatoire différentes enzymes cytotoxiques, dont la MPO, qui sont impliquées dans la destruction des agents pathogènes. La libération des enzymes s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène, la flambée respiratoire, afin de générer des espèces réactives de l'oxygène (voir section 1.1.2). La première espèce produite est l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$  via le complexe NADPH oxydase. L'anion superoxyde est le précurseur d'autres ROS, dont le peroxyde d'hy-

drogène  $H_2O_2$  (substrat naturel de la MPO). Impacter la production d'anions superoxydes par les PMNs, soit en les piégeant, soit en inhibant leur formation en agissant directement sur les cellules, peut être un moyen de réduire l'activité oxydante de la MPO via l'inhibition de son substrat.

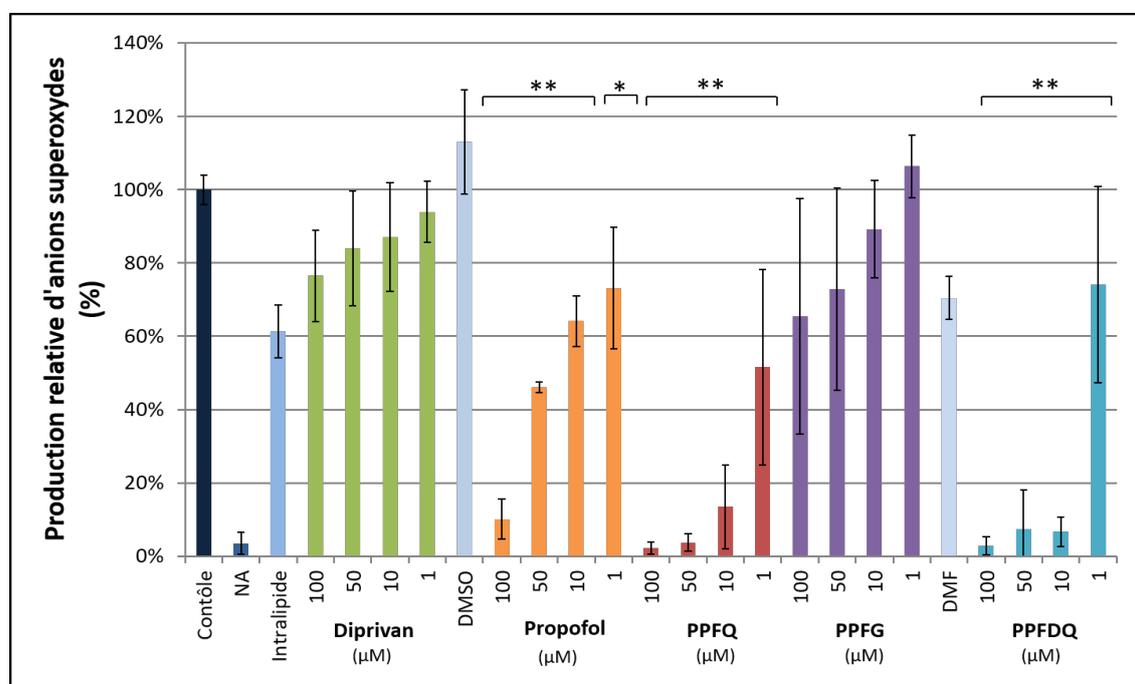


FIGURE 4.22 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPDQ) et du Diprivan sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO, Intralipide, DMF).

Dans un premier temps, les PMNs ont été incubés avec les molécules d'intérêt (propofol, Diprivan, PPFQ, PPFQ et PPFQ) pendant dix minutes et ont ensuite été activés avec du PMA, toujours en présence des molécules d'intérêt (figure 4.22). La production d'anions superoxydes par les cellules activées a été évaluée à l'aide du L-012, une sonde lumineuse (voir section 2.1.3). La figure 4.22 montre l'effet des différentes molécules sur la libération de ROS. Le propofol inhibe la production d'anions superoxydes de façon concentration-dépendante, par rapport à son solvant le DMSO qui lui influence peu la libération de ROS. Une diminution de la concentration en anions superoxydes de 90% est observée à 100  $\mu$ M. Le propofol conserve une action inhibitrice de 55% à 50  $\mu$ M (concentration clinique) et même de 27% à la plus faible concentration de 1  $\mu$ M. L'action inhibitrice induite par le propofol peut être partiellement attribuée à sa capacité de piégeage de l'anion superoxyde (figures 4.12 et 4.18). La molécule pourrait également avoir la capacité d'agir directement sur le mécanisme de production de l'espèce active de l'oxygène. Cette hypothèse sera examinée dans la suite de ce travail. Dans le cas du Diprivan, son solvant l'Intralipide provoque lui-même une inhibition d'environ 40% du signal de luminescence. Cet effet a déjà été observé [302, 288] et est attribué à la capacité de piégeage de ROS par les lipides composant l'émulsion. La plus haute concentration en Diprivan (100  $\mu$ M) provoque une inhibition supplémentaire de 24% par rapport à l'Intralipide.

En ce qui concerne les métabolites, le PPFQ inhibe presque totalement (>95%) la production d'anions superoxydes aux deux concentrations les plus élevées, par rapport au DMSO. A 1  $\mu\text{M}$ , la quinone diminue toujours la production de 48%. Le PPFQ présente une action inhibitrice forte, similaire à celle du PPFQ, lorsqu'il est présent en solution durant l'activation des PMNs. Le solvant DMF provoque une diminution du signal de luminescence de 30%. Le PPFQ fait décroître la production de  $\text{O}_2^-$  de plus de 90% pour des concentrations de 10 à 100  $\mu\text{M}$ . L'inhibition tombe à 26% à 1  $\mu\text{M}$ . De façon globale, le PPFQ présente une action inhibitrice dose-dépendante plus faible, avec une inhibition de 35% à 100  $\mu\text{M}$ . Les formes quinones (PPFQ et PPFQ) ont montré leur capacité de piégeage de l'anion superoxyde (figures 4.15, 4.17 et 4.18). Cependant, en tant que quinones, leur caractère lipophile permet de suspecter une interaction avec la membrane plasmique des PMNs et une potentielle interaction avec le complexe NADPH oxydase.

Afin d'obtenir des informations complémentaires sur le mécanisme d'action des différentes molécules d'intérêt sur les PMNs et éventuellement confirmer les hypothèses d'interaction du propofol, du PPFQ et du PPFQ avec la NADPH oxydase, une seconde expérience a été réalisée. Les PMNs ont été incubés pendant dix minutes avec les molécules d'intérêt. Ensuite, avant l'activation avec le PMA, les solutions ont été centrifugées (voir section 2.2.3) afin de ne conserver que les cellules et d'éliminer le surnageant contenant les molécules qui n'ont pas pénétré la membrane plasmique ou du moins qui n'ont pas interagi avec elle.

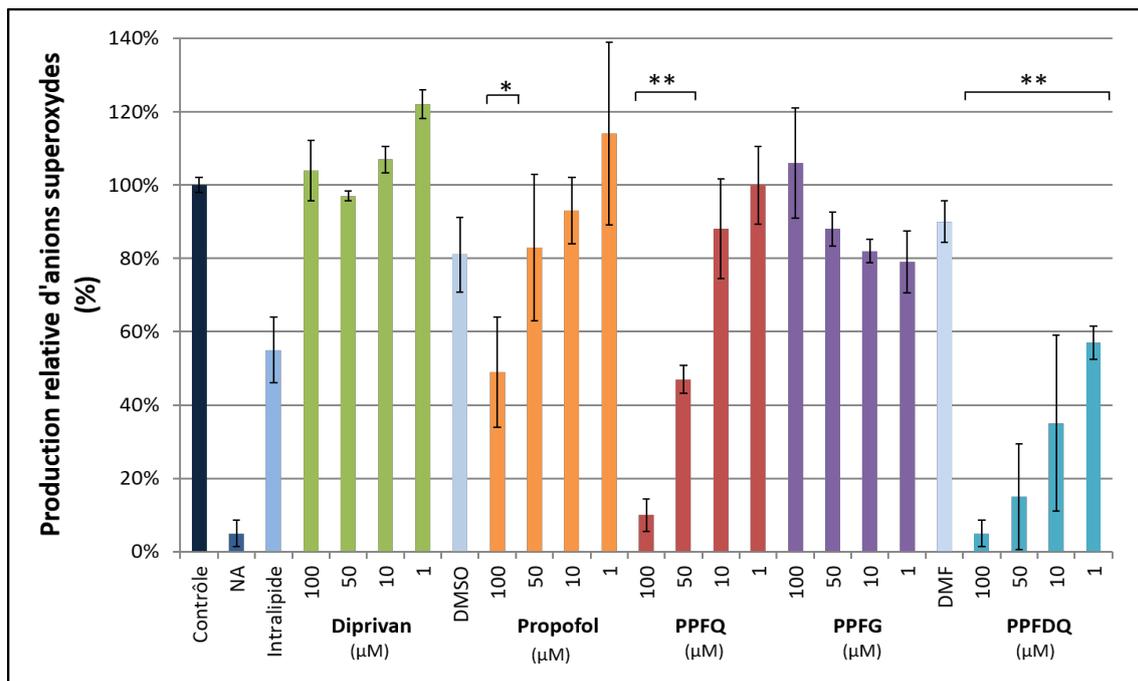


FIGURE 4.23 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPDQ) et du Diprivan sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Le propofol et ses dérivés ont été éliminés du milieu avant la mesure, après 10 minutes d'incubation. Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  (sauf Diprivan  $N=2$ ) et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P<0,01$  ou \* $P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (DMSO, Intralipide, DMF).

Lorsque le surnageant, contenant le propofol non incorporé dans les PMNs, est éliminé

avant l'activation des cellules (figure 4.23), une action inhibitrice résiduelle concentration-dépendante est toujours observée. En effet, l'inhibition chute à 50% et à 17% pour des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  respectivement. Le Diprivan perd également son action inhibitrice par rapport à son solvant. Cependant, l'Intralipide conserve son action inhibitrice proche de 45%. Le PPFQ perd également presque totalement son action lorsqu'il est éliminé de la solution. Dans le cas du PPFQ, la molécule voit son action fortement diminuer lorsqu'elle est éliminée de la solution avant l'activation des cellules. Cependant, après une incubation de dix minutes, le PPFQ inhibe toujours la production d'anions superoxydes de 12% à 10  $\mu\text{M}$ . La production de  $\text{O}_2^-$  est diminuée de 53% et de 90% à 50 et 100  $\mu\text{M}$  respectivement. Le PPFQ conserve une action inhibitrice très efficace, plus de 85%, aux concentrations 50 et 100  $\mu\text{M}$ . Par contre, la molécule perd partiellement son action à 10  $\mu\text{M}$  avec une inhibition de 65%. Cette expérience permet de mettre en évidence l'action du propofol et de ses deux dérivés sur le mécanisme de production de ROS au niveau cellulaire.

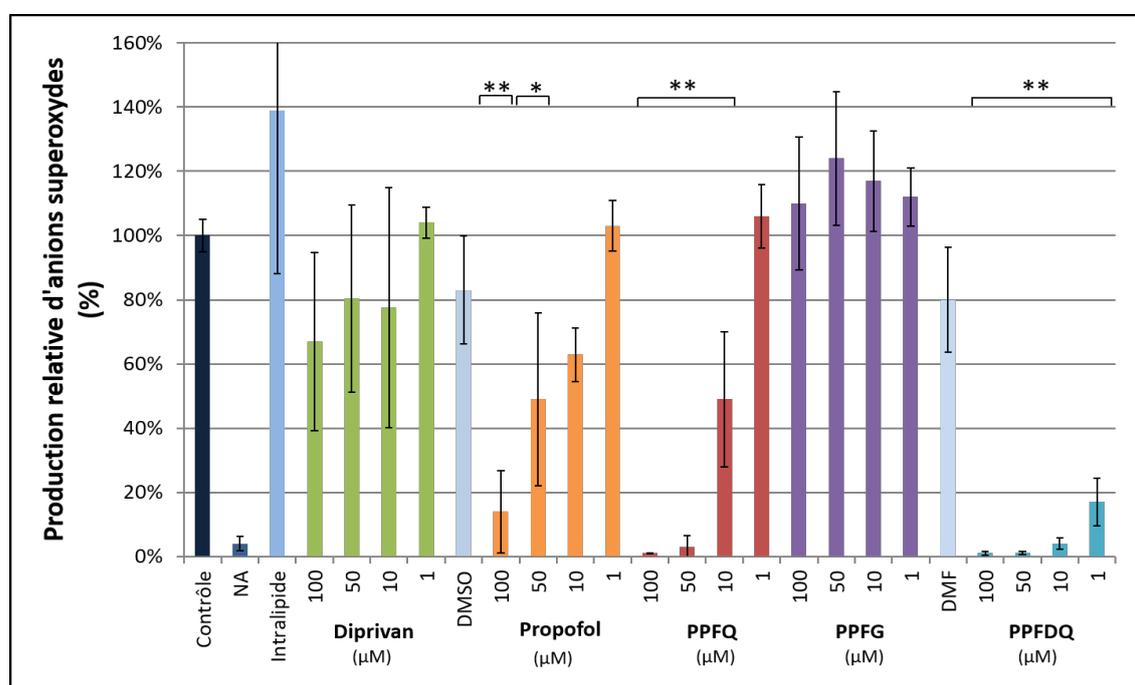


FIGURE 4.24 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPDQ) et du Diprivan sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Le propofol et ses dérivés ont été éliminés du milieu avant la mesure, après une heure d'incubation. Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (DMSO, Intralipide, DMF).

En passant d'un temps d'incubation de dix minutes à une heure avant la phase de centrifugation (figure 4.24), l'action inhibitrice du PPFQ augmente. La molécule bloque totalement la production d'anions superoxydes aux deux plus hautes concentrations (50 et 100  $\mu\text{M}$ ). L'inhibition tombe à 50% à 10  $\mu\text{M}$ . De façon similaire, l'action du PPFQ augmente avec le temps d'incubation. On peut observer une diminution de la concentration en anions superoxydes de 83% et 96% aux concentrations de 1 et 10  $\mu\text{M}$  respectivement. Le PPFQ perd presque totalement son action inhibitrice lorsqu'il est éliminé de la solution avant l'activation des PMNs, quel que soit le temps d'incubation.

En plus de leur capacité de piégeage de l'anion superoxyde (figures 4.15, 4.17 et 4.18), le PPFQ et le PPFQD agissent clairement comme inhibiteurs efficaces de la production de ROS par les PMNs activés avec du PMA. Les deux molécules semblent avoir un impact sur l'activité d'oxydoréduction du complexe NADPH oxydase. En effet, après l'élimination des molécules non incorporées dans les cellules avant leur activation, l'action inhibitrice des deux composés est toujours observée. Le caractère lipophile de leur structure quinone leur permet d'entrer dans la membrane plasmique ou du moins de s'y lier. La littérature indique que le caractère hydrophobe des quinones favorise leur incorporation dans la membrane cellulaire ou mitochondriale où elles jouent un rôle essentiel en tant que transporteurs d'électrons pour différents complexes membranaires [356, 357, 358]. Les deux quinones pourraient avoir une action sur la formation et l'activation du complexe NADPH oxydase ou avoir une action inhibitrice directe sur le complexe protéique formé [359]. En effet, les quinones pourraient interférer dans le processus de formation de l'anion superoxyde en captant des électrons, empêchant la réduction du FAD (flavine adénine dinucléotide) ou des hèmes contenus dans le cytochrome b556 (voir section 1.1.2.1) [25, 23]. Les quinones sont aussi capables de se lier aux protéines du complexe respiratoire I dans les mitochondries où elles sont réduites [360]. La liaison du PPFQ et PPFQD au complexe NADPH oxydase peut, par conséquent, aussi être envisagée.

Par rapport au PPFQD, le PPFQ perd partiellement sa capacité inhibitrice lorsqu'il est éliminé du milieu avant l'activation du complexe NADPH oxydase. L'incorporation du PPFQ dans la membrane semble plus lente que pour le PPFQD. Cela a été confirmé lors de l'allongement de la période d'incubation à une heure [359]. Ce plus long temps d'incubation permet aux inhibiteurs (PPFQ et PPFQD) d'entrer en plus grande quantité dans la membrane des PMNs. Aux concentrations physiologiques autour de 5  $\mu\text{M}$  [281], le PPFQ et le PPFQD peuvent inhiber la production de ROS et donc de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le substrat naturel de la MPO.

Dans le cas du propofol, l'augmentation du temps d'incubation à une heure permet d'accroître l'action inhibitrice dose-dépendante déjà observée après l'incubation de dix minutes. La molécule inhibe 86% la production de  $\text{O}_2^-$  à la plus haute concentration de 100  $\mu\text{M}$ . A la concentration physiologique de 50  $\mu\text{M}$ , on peut observer une inhibition de 51%. De façon surprenante, l'Intralipide perd son action inhibitrice lorsque le temps d'incubation augmente. Il provoque même l'effet inverse en augmentant la libération de ROS. Le Diprivan, par rapport à son solvant, voit son action augmenter avec une inhibition proche de 43% à la plus haute concentration de 100  $\mu\text{M}$ .

Tout comme le PPFQ, l'action inhibitrice du propofol diminue lorsqu'il est éliminé du milieu avant l'activation des PMNs après une incubation de dix minutes. Cela indique qu'il agit principalement comme piègeur de ROS sur un temps d'incubation court. Cependant, lorsque le temps d'incubation augmente (une heure), la molécule présente une action inhibitrice de la production de ROS non négligeable. Le propofol semble alors capable d'interagir avec les cellules et de perturber le mécanisme de production de l'anion superoxyde.

Comme pour les quinones, le caractère lipophile de la molécule peut lui permettre de s'insérer dans la membrane plasmique [297]. Diverses études ont décrit la capacité du propofol à pénétrer la membrane de liposomes ou de différents types cellulaires comme des erythrocytes, et à augmenter la fluidité membranaire [361, 362]. A faible concentration, le propofol peut déstabiliser des nanodomains lipidiques au sein des membranes plasmiques [363, 362, 364]. Cependant, Jin et al. [364] ont montré qu'à une concentration physiologique de l'ordre de 50  $\mu\text{M}$  et à température physiologique (37 °C), le propofol provoque l'effet inverse et augmente significativement la stabilisation et donc la rigidité de la membrane. Dans notre étude, les PMNs sont incubés en présence de propofol à 37 °C. Ils sont ensuite stimulés par le PMA. L'interaction du PMA avec les PMNs ne fait pas intervenir de récepteur membranaire. Le

PMA est capable de pénétrer la membrane plasmique pour atteindre le cytoplasme, interagir avec une protéine kinase (PKC) et déclencher la stimulation cellulaire (figure 1.5). La capacité d'interaction entre le propofol et les lipides membranaires pourrait potentiellement perturber la pénétration du PMA au sein des PMNs. L'étude de Jin et al. [364] montre qu'il faut attendre environ trente minutes pour observer les effets de stabilisation du propofol sur les membranes. Cela expliquerait l'augmentation de son action inhibitrice avec le temps d'incubation.

Le propofol est également capable d'interagir avec des protéines membranaires comme les récepteurs du fMLP, autre molécule activatrice des PMNs (figure 1.5). La molécule réduit l'interaction entre le fMLP et son récepteur membranaire [365, 366, 367] et de ce fait, inhibe la stimulation des cellules. Le propofol pourrait potentiellement se lier aux sous-unités membranaires de la NADPH oxydase et inhiber la formation du complexe. Une étude plus poussée serait cependant nécessaire pour identifier l'étape et les éléments réellement impactés par le propofol lors de l'assemblage de la NADPH oxydase.

D'autre part, l'étude de Mikawa et al. [326] a montré la capacité du propofol à inhiber différents mécanismes des PMNs, notamment la production de ROS par les cellules. Ils ont montré que la molécule anesthésiante atténue l'augmentation de la concentration en calcium suite à la stimulation des PMNs par du fMLP et suspectent un lien entre cette inhibition et celle de la production de ROS. Dans notre étude, les PMNs sont stimulés par un autre composé, le PMA, mais l'activation de la cellule par le PMA, et plus précisément la formation du complexe NADPH oxydase, nécessiterait l'intervention du calcium intracellulaire, bien que différents avis divergent à ce sujet [15].

Enfin, l'Intralipide possède une action réductrice importante de la production de ROS par les PMNs activés. Ce résultat peut s'expliquer partiellement par la capacité de piégeage des lipides composant l'émulsion. Cependant, une interaction avec les cellules peut être suspectée car l'Intralipide conserve son action inhibitrice même s'il est éliminé du milieu avant l'activation des PMNs (figure 4.24). Une étude révèle la capacité de l'Intralipide à altérer la chimiotaxie des PMNs [368, 369]. L'insertion des acides gras polyinsaturés composant l'émulsion au sein de la membrane augmente sa rigidité et réduit par conséquent la mobilité des cellules. L'augmentation de la rigidité membranaire induite par l'Intralipide pourrait, comme pour le propofol, réduire la pénétration du PMA au sein de la cellule et donc inhiber l'activation de la formation du complexe NADPH oxydase.

### 4.7.3 Inhibition de la dégranulation

La flambée respiratoire des PMNs peut être accompagnée de la libération du contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire ou dans le phagosome (voir section 1.1.1). La dégranulation des PMNs permet la libération d'enzymes cytotoxiques dont la MPO. Inhiber cette libération permettrait de réduire l'action oxydante des PMNs sur les tissus sains dans leur environnement lors d'une activation excessive des cellules.

La figure 4.25 montre que la stimulation des PMNs, grâce à l'association de la cytochalasine B et du fMLP, provoque une importante libération de MPO par rapport aux PMNs non activés. Le DMSO induit une diminution légère et non significative de la concentration en MPO. L'activation des PMNs en présence de propofol, du Diprivan et de PPFQ n'impacte pas la libération de MPO. Seul le PPFQ provoque une diminution de la dégranulation d'environ 18% à la plus haute concentration de 100 $\mu$ M. Par contre, en comparaison avec leur solvant respectif, le PPFQ (DMSO) et le PPFQ (DMF) diminuent significativement la quantité d'enzymes libérées par les cellules activées. Le PPFQ induit une diminution de la concentration en MPO de 17% à 10  $\mu$ M jusque 35% à 100  $\mu$ M. Le PPFQ réduit également la libération de MPO d'environ 40% à 100 $\mu$ M. La molécule conserve une inhibition de 18% à la plus faible

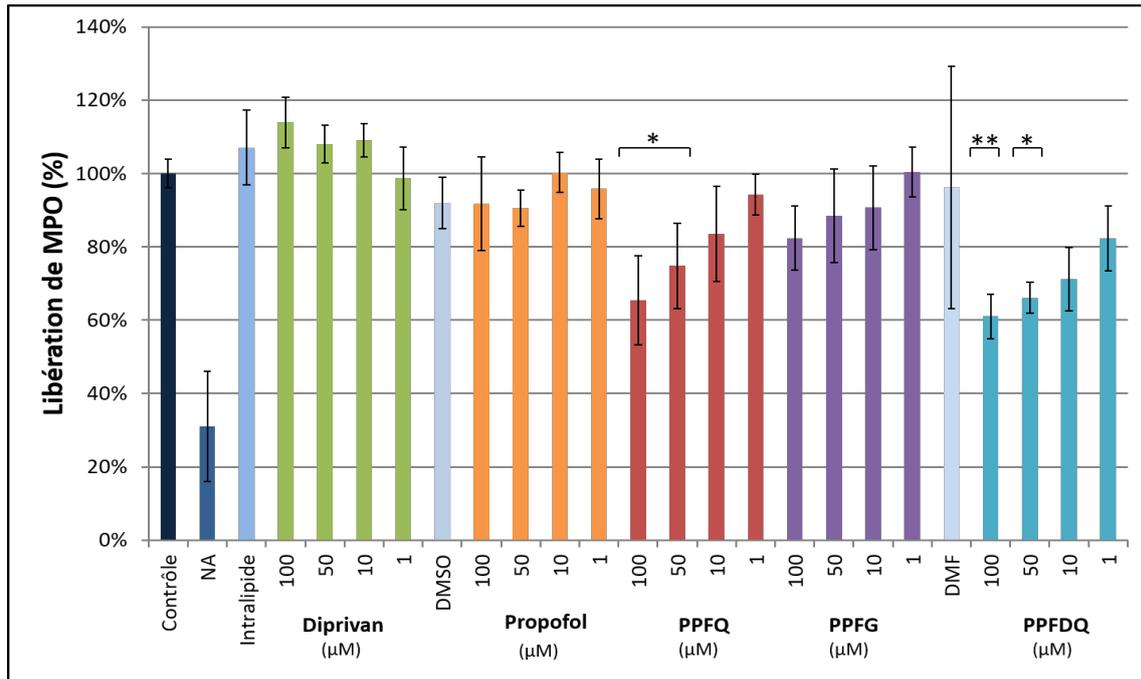


FIGURE 4.25 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPFQ) et du Diprivan sur la libération de myéloperoxydase par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). La MPO libérée est détectée par un test ELISA. Le pourcentage de libération de MPO a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO, Intralipide, DMF).

concentration testée de 1  $\mu\text{M}$ . Les deux composés peuvent donc impacter le phénomène de dégranulation des PMNs à concentration physiologique (environ 5  $\mu\text{M}$  [282]). Des études ont déjà montré la capacité de quinones à inhiber le processus de dégranulation mais le mécanisme n'est pas complètement élucidé [370, 371]. Dans un premier temps, les molécules pourraient s'insérer dans la membrane plasmique des PMNs [357] et altérer sa déformation qui est nécessaire à la fusion des granules et à la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Deuxièmement, les molécules pourraient interagir avec les récepteurs FRP1 afin d'empêcher la liaison du fMLP utilisé pour activer les cellules [372, 373, 374]. Enfin, le PPFQ et le PPFQ pourraient également perturber l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium en interagissant avec les canaux à  $\text{Ca}^{2+}$  lors de la stimulation des PMNs [12].

Les résultats obtenus pour le propofol sont surprenants en comparaison de ceux publiés par différentes études. En effet, l'article de Yang et al. [367] indique que le propofol peut inhiber de façon sélective la liaison du fMLP aux récepteurs FPR1 des PMNs, empêchant ainsi leur activation. De ce fait, le propofol inhiberait la production d'anions superoxydes et provoquerait la diminution de la concentration intracellulaire en calcium [326, 367]. Le propofol impacterait également le phénomène de dégranulation comme le montre l'inhibition de la libération d'élastase par les cellules [367]. Les résultats obtenus dans notre étude sont en contradiction avec ceux de l'équipe de Yang. En effet, aucune diminution significative de la libération de MPO n'est observée lorsque les PMNs sont incubés en présence de propofol. Cela montre que la molécule n'est pas capable d'inhiber la liaison du fMLP aux récepteurs FPR1. Un autre résultat divergent a également été obtenu par rapport à l'étude de Yang et al. En effet, la spectroscopie RPE a permis d'observer la capacité de piégeage du propofol envers l'anion superoxyde produit par un système acellulaire. Ces résultats ont confirmé ceux obte-

mus par Gülçin et al. [298] et par Mathy-Hartert et al. [288]. Or, lors de leur étude, Yang et al. [367] n'ont pas observé d'action de piégeage pour le propofol, bien qu'ils aient utilisé, comme dans notre travail, le système xanthine-xanthine oxydase. En revanche, ils n'ont pas utilisé la même technique d'analyse. Il s'agit d'une étude par spectroscopie d'absorption de la réduction du WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) induite par l'anion superoxyde. Sur base de toutes ces informations, il n'est donc pas évident de conclure à propos d'une quelconque action inhibitrice du propofol sur la dégranulation des PMNs.

#### 4.7.4 Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés

L'activation des PMNs par le couple cytochalasine B/fMLP permet la libération d'une quantité importante de MPO par rapport aux cellules non activées. La MPO libérée est active et cette activité oxydante peut être mesurée via le test SIEFED (voir section 2.2.5). La figure 4.26 montre que le DMSO n'a pas d'effet sur l'activité de la MPO libérée en comparaison avec le DMF qui provoque une décroissance de 40% de l'activité oxydante de l'enzyme. Par rapport à leur solvant, le PPFQ et le PPFQDQ présentent une action inhibitrice significative et dose-dépendante. Le PPFQ induit une diminution de l'activité de 40% à 10  $\mu\text{M}$  et celle-ci atteint 92% à 100  $\mu\text{M}$ . Par rapport au DMF, le PPFQDQ possède une action inhibitrice qui commence à 17% à 1  $\mu\text{M}$  et atteint 90% à la plus haute concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Le PPFQDQ présente globalement une action inhibitrice non significative proche de 30 % entre 10 et 100  $\mu\text{M}$ . Le propofol et le Diprivan quant à eux n'offrent pas d'action inhibitrice sur l'activité de la MPO libérée par les PMNs. On peut même observer une légère augmentation de l'activité pour une concentration de 10  $\mu\text{M}$  de propofol.

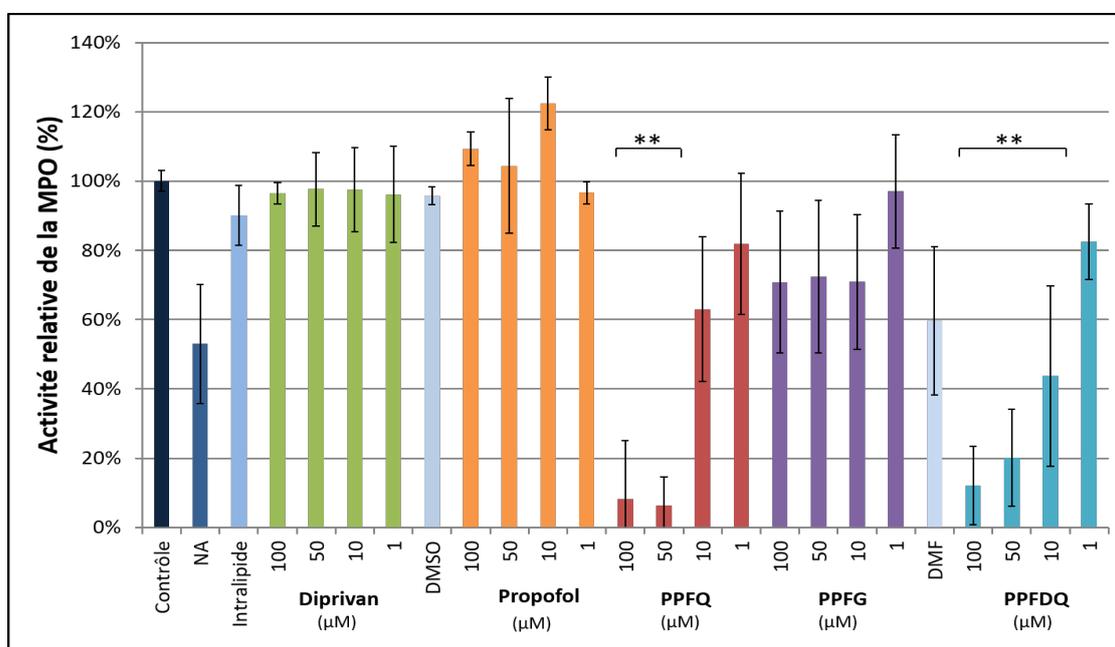


FIGURE 4.26 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFQ, PPFQDQ et PPDQ) et du Diprivan sur l'activité de myéloperoxydase libérée par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). L'activité de la MPO libérée a été évaluée par un test SIEFED. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport au contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=4 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (DMSO, Intralipide, DMF).

L'inhibition de l'activité de la MPO observée pour le PPFQ et le PPFQDQ peut partiellement s'expliquer par la capacité des deux composés à réduire la quantité d'enzyme libérée par les cellules (figure 4.25). Cependant, l'inhibition importante observée prouve l'aptitude des deux composés à interagir directement avec l'enzyme. En effet, le SIEFED montre que les molécules sont capables de se lier au site actif de l'enzyme et d'empêcher l'oxydation de la sonde fluorescente, l'Amplex Red, par le cycle de peroxydase de la MPO. Ces résultats sont prometteurs, et une fois complétés par d'autres études (action sur les cycles de peroxydase et de chloration, modélisation moléculaire,...) permettront potentiellement de montrer et d'expliquer l'action inhibitrice du PPFQ et du PPFQDQ sur l'activité de la MPO. En ce qui concerne le propofol et le PPFQ, d'autres études seront également nécessaires pour affiner la compréhension de leur interaction avec la MPO. En effet, même si ces premiers résultats sont en défaveur d'une liaison des molécules avec le site actif de l'enzyme, cela ne prouve pas que les composés ne puissent pas pénétrer la cavité et impacter l'activité oxydante de l'enzyme en échangeant des électrons avec les composés intermédiaires (composés I et II). De plus, il faut également tenir compte de la présence d'un grand nombre d'enzymes et de molécules en solution lors de la phase d'incubation du processus SIEFED réalisé sur le contenu de dégranulation. En effet, la solution contenant la MPO est le surnageant récolté après l'activation des PMNs par le fMLP. Ce surnageant contient l'ensemble des enzymes et molécules libérées par les cellules. Ces différents éléments sont susceptibles d'interférer dans l'interaction des molécules d'intérêt avec la MPO.

#### 4.7.5 Bilan de l'action du propofol et de ses métabolites sur les PMNs

Le propofol et ses deux dérivés quinones, le PPFQ et le PPFQDQ, montrent une action inhibitrice sur différents mécanismes des PMNs. Tout d'abord, les trois molécules sont des piègeurs efficaces de l'anion superoxyde, première espèce réactive de l'oxygène produite par les cellules activées. A cela s'ajoute une action inhibitrice du mécanisme de production de l'espèce oxydante. Le caractère lipophile des trois molécules et leur capacité à s'insérer dans la membrane plasmique des PMNs semblent être des paramètres essentiels dans leur mode d'action. Le propofol pourrait réduire la stimulation des cellules en modifiant de façon localisée la fluidité membranaire. La capacité de liaison avec diverses protéines membranaires, dont potentiellement les sous-unités membranaires de la NADPH oxydase est également une piste permettant d'expliquer l'action inhibitrice du propofol. Quant aux quinones, elles pourraient impacter l'échange d'électrons au sein de la membrane et ainsi perturber la réduction d'éléments essentiels au mécanisme de production de  $O_2^-$  par le complexe NADPH oxydase. Les résultats obtenus suggèrent une meilleure incorporation dans la membrane du PPFQDQ par rapport au PPFQ. Les deux molécules sont des inhibiteurs efficaces de la flambée respiratoire des PMNs, et ce, même à des concentrations physiologiques. Dans le cas du Diprivan, la forme injectable du propofol, l'émulsion lipidique (Intralipide) semble elle-même impacter la production de ROS. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer le mécanisme d'action exact des différentes molécules sur la membrane et la NADPH oxydase.

En ce qui concerne le phénomène de dégranulation et de libération de MPO par les PMNs activés, le propofol et le Diprivan n'ont pas laissé apparaître d'action inhibitrice significative. Ce résultat est surprenant compte tenu d'autres études ayant montré la capacité du propofol à inhiber la stimulation des PMNs par le fMLP en empêchant son interaction avec son récepteur membranaire et en réduisant la quantité de calcium intracellulaire. Par contre, le PPFQ et le PPFQDQ provoquent une légère inhibition de la dégranulation à hautes concentrations, supérieures à celles atteintes dans le sang de patients. En revanche, les deux quinones inhibent de façon plus significative l'activité oxydante de la MPO libérée par les cellules. L'analyse SIEFED indique que les deux composés sont capables de se lier au site actif de l'enzyme

et d'inhiber son activité. En revanche, cela ne semble pas être le cas pour le propofol. Pour autant, ce premier résultat négatif n'implique pas une totale incapacité de la molécule à interagir avec l'enzyme. En effet, une étude plus approfondie est nécessaire afin de vérifier si le propofol, en tant que phénol, est capable d'agir comme substrat réducteur dans les cycles oxydants de l'enzyme. En effet, la molécule ne semble pas pouvoir former un complexe stable avec l'enzyme mais elle pourrait néanmoins s'insérer dans le site actif et échanger des électrons.

Enfin, le PPFPG, le métabolite principal du propofol, n'a montré aucune action significative lors des différentes expériences réalisées.

## 4.8 Etude de l'action du propofol et de ses métabolites sur l'activité oxydante de la myéloperoxydase

Afin d'approfondir l'étude de l'action du propofol et de ses dérivés sur l'activité de la MPO, la modélisation moléculaire a été associée à la spectroscopie de fluorescence.

### 4.8.1 Modélisation moléculaire - Docking

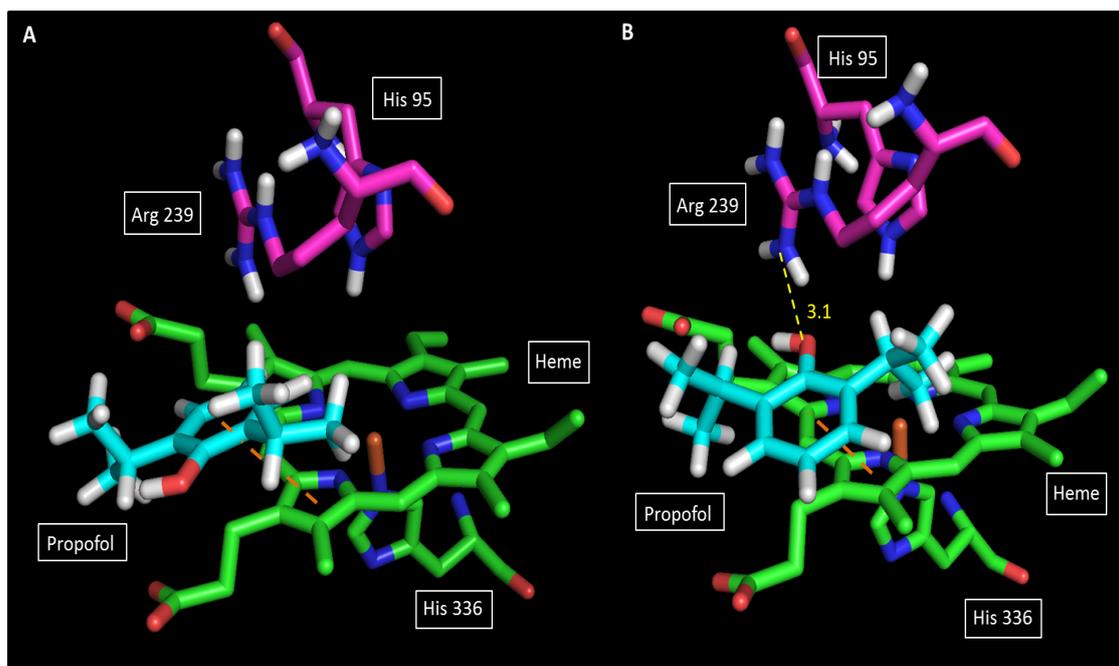


FIGURE 4.27 – Les deux solutions du complexe MPO-propofol obtenues par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

Le *docking* du propofol au sein du site actif de la MPO, grâce au logiciel GOLD, donne deux solutions. Le premier complexe (figure 4.27 A) correspond à la solution la plus fréquemment obtenue (83% d'occurrence) (voir section 2.3.1) et donc la solution la plus probable. Ce complexe place la molécule de propofol devant l'hème, avec une légère superposition au-dessus du cycle pyrrole D. Cette position permet une interaction  $\pi$ - $\pi$  entre le cycle phénolique et le cycle pyrrole de l'hème. Le plan du cycle aromatique du propofol est légèrement incliné par rapport au plan de l'hème. Ce positionnement est comparable à celui observé dans les structures cristallographiques décrites dans la littérature pour d'autres composés aromatiques

[41]. Dans ce premier cas de figure, l'orientation du propofol place le groupement hydroxyle vers le canal d'entrée et l'éloigne du centre du site actif, plus précisément du noyau de fer et de l'histidine 95, essentiels à la liaison du peroxyde d'hydrogène et au déclenchement des cycles oxydants de la MPO. Aucune liaison hydrogène n'est observée avec aucun acide aminé. L'encombrement stérique des deux groupes isopropyles entourant la fonction hydroxyle ne favorise pas son orientation vers le centre de la cavité hémique.

Inversement, la seconde solution obtenue (17% d'occurrence) (figure 4.27 B), moins probable, oriente le groupement hydroxyle vers l'intérieur de la cavité, permettant la formation d'un pont hydrogène avec l'arginine 439. Un empilement  $\pi$ - $\pi$  peut également être observé entre le cycle phénolique et le cycle pyrrole D de l'hème.

Le *docking* du PPFQ au sein de la cavité hémique de la MPO propose une solution unique (figure 4.28). Le positionnement du PPFQ est similaire à celui du propofol (figure 4.27 A). Le cycle de la molécule est placé presque parallèlement au plan du l'hème, au-dessus du cycle pyrrole D de la porphyrine, permettant une interaction  $\pi$ - $\pi$ . Cependant, dans le cas du PPFQ, l'oxygène en position para sur le cycle phénolique est orienté vers le centre de la cavité. Cela permet la formation de deux ponts hydrogène entre l'oxygène et le noyau de fer au centre de l'hème d'une part et l'histidine 95 d'autre part.

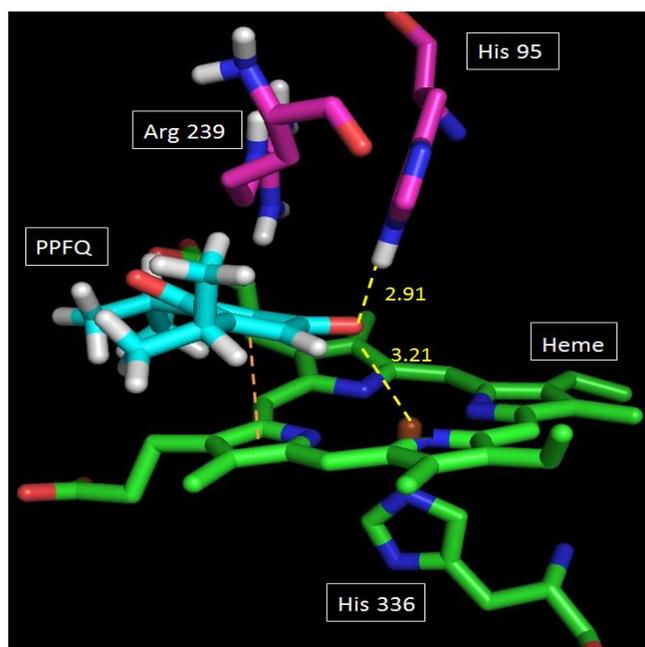


FIGURE 4.28 – Solution du complexe MPO-PPFQ obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

Pour le PPFQ, GOLD fournit deux structures de complexe. La solution la plus fréquemment obtenue (59% d'occurrence) (figure 4.29 A) place la molécule dans le canal d'entrée du site actif, avec un des bras isopropyles placé entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème. Le plan de la molécule est décalé par rapport à celui de l'hème, empêchant l'empilement  $\pi$ - $\pi$  entre le cycle aromatique du PPFQ positionné le plus profondément et le cycle pyrrole D de l'hème. Cependant, l'orientation de l'atome d'oxygène peut permettre l'interaction par pont hydrogène avec l'arginine 239. Le second complexe proposé par GOLD (41% d'occurrence) (figure 4.29 B) place le PPFQ plus profondément dans la cavité, entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème. Cela déplace l'atome d'oxygène, empêchant la

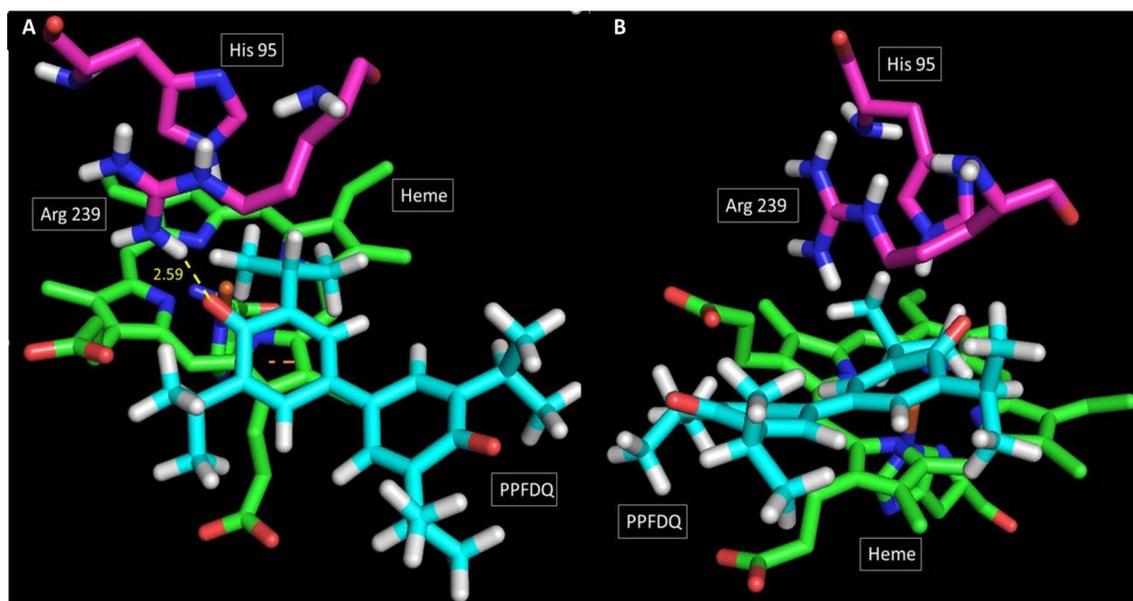


FIGURE 4.29 – Les deux solutions du complexe MPO-PPFDQ obtenues par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

formation du pont hydrogène avec l'arginine 239.

Une solution unique a été obtenue pour le complexe MPO-PPFG (figure 4.30). La partie propofol de la molécule est positionnée dans le canal d'entrée du site actif alors que la partie glucuronide se trouve entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème, sans superposition au-dessus de la porphyrine. La fonction acide du cycle glucuronique est orientée vers le centre de la cavité, permettant la formation d'un pont hydrogène avec l'arginine 239.

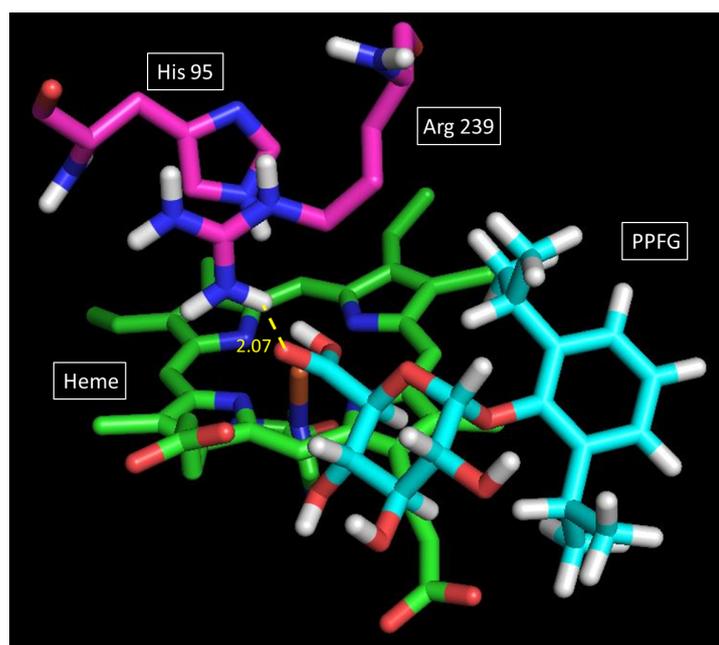


FIGURE 4.30 – Solution du complexe MPO-PPFG obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström.

### 4.8.2 Interaction avec le cycle de peroxydase

L'action inhibitrice des molécules d'intérêt sur l'activité de peroxydase de la MPO a été étudiée grâce à la spectroscopie de fluorescence (voir section 2.3.2). Les résultats présentés à la figure 4.31 illustrent l'action du propofol, du Diprivan et des trois dérivés (PPFG, PPFQ et PPFQD), par rapport à leurs solvants respectifs. Le propofol et le Diprivan montrent une action inhibitrice dose-dépendante. Les trois concentrations de propofol les plus élevées (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ), qui correspondent à la gamme des concentrations plasmatiques du propofol lors de l'induction et du maintien de l'anesthésie, provoquent une inhibition de l'activité de l'enzyme d'au moins 85%. A la plus faible concentration de 1  $\mu\text{M}$ , l'inhibition chute à 45%. Dans le cas du Diprivan, l'Intralipide provoque déjà une inhibition de 32%. De façon générale, le Diprivan présente une activité concentration-dépendante similaire à celle du propofol. La gamme de concentrations 10  $\mu\text{M}$ -100  $\mu\text{M}$  induit une inhibition forte de l'activité de peroxydase de la MPO supérieure à 80%.

En ce qui concerne les dérivés du propofol, le PPFQ possède également une action inhibitrice dose-dépendante, mais globalement plus faible que celle du propofol. La concentration la plus élevée (100  $\mu\text{M}$ ) provoque une inhibition totale de l'activité de l'enzyme. Celle-ci décroît à 63% à la concentration de 50  $\mu\text{M}$  et devient nulle aux deux plus faibles concentrations, correspondant aux concentrations physiologiques. Par contre, le PPFQD et le PPFG ne provoquent pas d'inhibition de l'activité peroxydasique de la MPO.

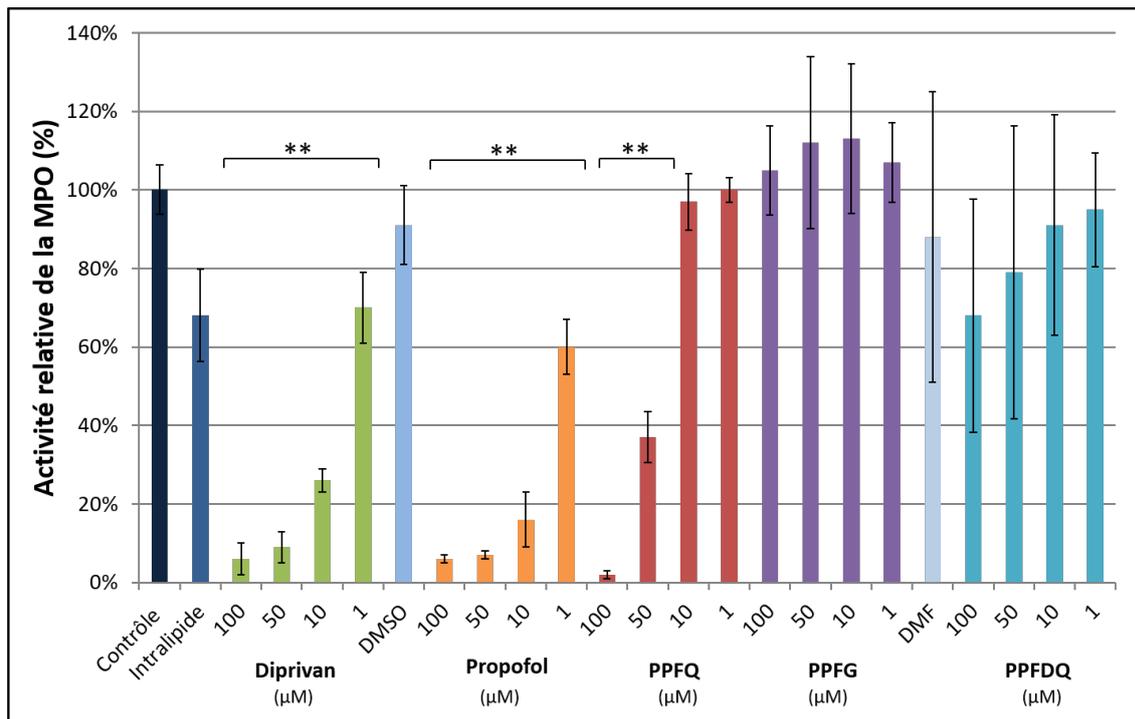


FIGURE 4.31 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPFQD) et du Diprivan sur l'activité peroxydasique de la MPO. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (Intralipide, DMSO ou DMF).

Cette analyse fournit des informations générales sur l'interaction entre l'inhibiteur et la MPO. Les résultats expérimentaux indiquent clairement que le propofol, le Diprivan et le PPFQ peuvent réduire l'activité peroxydasique de l'enzyme. Cependant, aucune différenciation

tion ne peut être faite entre les divers mécanismes d'inhibition possibles (voir section 1.3.3.1) : l'action réductrice stochiométrique des inhibiteurs sur les composés intermédiaires de l'enzyme (composés I et II), et par conséquent l'action de compétition avec les différents substrats de révélation ( $H_2O_2$ , nitrite, Amplex Red) et/ou l'action inhibitrice basée sur la liaison de la molécule d'intérêt au sein du site actif de l'enzyme, formant un complexe empêchant l'accès aux substrats de révélation. Dans la suite de ce travail, l'analyse SIEFED fournira des informations supplémentaires qui, en association avec les résultats de l'étude de l'action réductrice (voltammétrie et ABTS) et les hypothèses développées à partir du *docking*, permettront de mieux comprendre le mode d'interaction des inhibiteurs.

A ce stade, on peut tout de même remarquer que la structure phénolique du propofol et sa capacité réductrice sont en faveur d'une interaction en tant que substrat réducteur avec les composés redox (composés I et II) de la MPO. En effet, le potentiel redox du propofol (+524 mV vs ESH) est inférieur à ceux des couples composé I/composé II (1,35 V) et composé II/enzyme native (970 mV) [375]. Par conséquent, en associant ces résultats avec ceux du *docking* montrant la capacité du propofol à s'insérer suffisamment profondément dans le site actif de la MPO, il est très probable que la molécule puisse transférer un électron aux deux composés intermédiaires du cycle de peroxydase, et ainsi entrer en compétition avec les différents substrats intervenant dans l'analyse de fluorescence (nitrite et Amplex Red). A cette action réductrice peut potentiellement s'ajouter une capacité de liaison au site et de formation d'un complexe entre le propofol et la MPO.

En ce qui concerne le PPFQ, la quinone n'est pas capable de céder un électron aux composés I et II du cycle de peroxydase. Par conséquent, l'action de la molécule se ferait via son insertion et sa liaison dans la cavité active de la MPO.

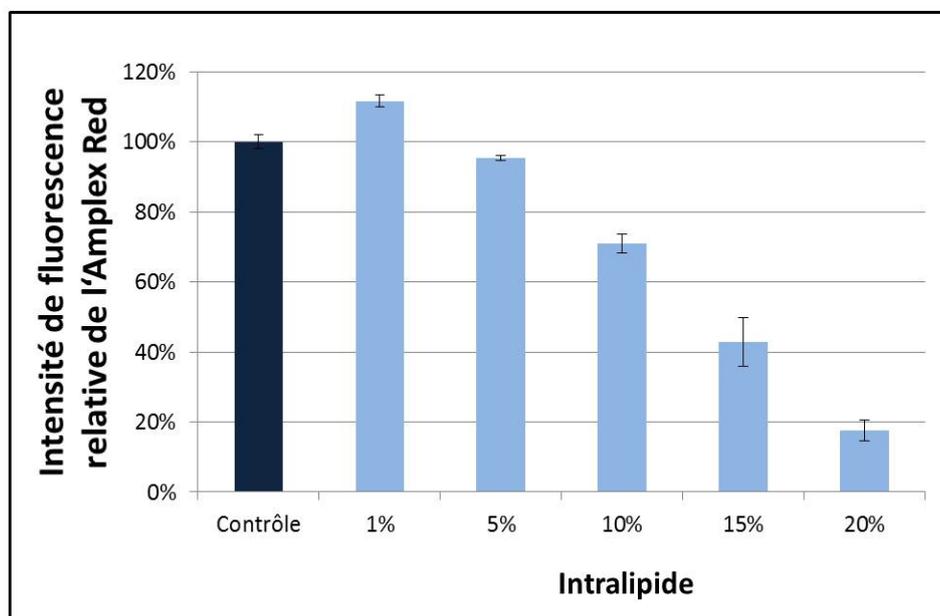


FIGURE 4.32 – Effet de la concentration en Intralipide sur l'intensité de fluorescence de la sonde Amplex Red, oxydée par le système MPO- $H_2O_2$ . Le pourcentage de l'activité de l'enzyme a été calculé pour l'Intralipide par rapport au contrôle sans solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=1$  et  $n=4$ ).

Pour finir, l'Intralipide 10% (concentration utilisée dans l'entièreté de ce travail) réduit l'intensité de fluorescence de la sonde Amplex Red. Une action inhibitrice des lipides composant la formulation envers l'activité peroxydasique de la MPO est peu probable. Par contre, l'incorpo-

ration d'une sonde fluorescente telle que la fluorescéine [376] ou la N-phényl-1-naphthylamine [377, 378] à l'intérieur d'une structure micellaire ou d'un liposome peut, suite à différentes interactions avec la structure lipidique, impacter son rendement de fluorescence. L'effet de la concentration en Intralipide sur le signal de fluorescence de l'Amplex Red, oxydé par le système MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a été évalué (figure 4.32). Le rendement de fluorescence de l'Amplex Red diminue avec l'augmentation de la concentration en lipides.

### 4.8.3 Interaction avec le cycle de chloration

Le cycle de chloration est une propriété unique de la MPO. En effet, le composé I peut subir une réduction à deux électrons en interagissant avec les ions chlorure abondants dans le plasma (110-141 mM [54]) pour former l'acide hypochloreux (voir section 1.2.2.1). Un moyen de moduler, voire d'inhiber l'action oxydante de la MPO consiste à contrôler son cycle de chloration en diminuant ou en empêchant la formation de HOCl. Vlasova et al. [54] ont montré que l'affinité du composé I avec les ions chlorure, et donc la prédominance du cycle de chloration par rapport au cycle de peroxydase, dépend du pH du milieu. L'activité de chloration augmente lorsque le pH diminue. Le milieu extracellulaire est caractérisé par un pH neutre avec une valeur comprise entre 7 et 7,5. Par contre, le phagolysosome des PMNs est caractérisé par une acidification du milieu pouvant atteindre un pH compris entre 4,7 et 6 [54, 76, 77]. De la même manière, des lésions inflammatoires, telles que les lésions athérosclérotiques [101, 379] sont caractérisées par un pH acide.

#### 4.8.3.1 Milieu acide - pH 5,5

Afin d'étudier l'action du propofol et de ses dérivés sur le système MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> en milieu acide, une analyse de fluorescence a été réalisée dans un tampon à pH 5,5 contenant des ions chlorure (voir section 2.3.3). La figure 4.33 montre que l'absence de Cl<sup>-</sup> en solution empêche l'oxydation de la sonde fluorescente APF, prouvant, dans cette étude, sa spécificité pour la capture du HOCl.

Pour cette série de mesures, le DMSO a été remplacé par le DMF car le DMSO réagit avec la sonde APF et inhibe son signal de fluorescence (voir section 2.1.5) [380]. L'Intralipide, quant à lui, induit une augmentation du signal de fluorescence de 36% par rapport au contrôle. Comme décrit à la section 4.8.2, ce type de comportement a déjà été observé pour différentes sondes fluorescentes [376, 377, 378]. L'impact de la concentration en Intralipide sur le signal de fluorescence de la sonde APF, oxydée par le système MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>, a été évalué (figure 4.34). La concentration en Intralipide utilisée comme solvant dans l'ensemble de ce travail est de 10%. Le rendement de fluorescence de l'APF augmente avec la concentration en lipides.

Le propofol ne révèle aucune action inhibitrice sur l'activité de chloration de la MPO, à l'exception de la plus haute concentration (100 μM) avec une inhibition de 16%. A pH acide, la molécule n'est pas capable de se lier à la MPO pour empêcher le déclenchement du cycle ou d'agir comme substrat compétiteur vis-à-vis des ions Cl<sup>-</sup> pour interagir avec le composé I. Le Diprivan, le PPFQ et le PPFQ n'induisent aucune inhibition significative de la formation d'HOCl. A pH 5,5, le PPFQ est la molécule qui présente le plus grand pouvoir inhibiteur. Aux deux concentrations les plus élevées (50 et 100 μM), la forme quinone du propofol inhibe au moins 90% de l'activité de chloration de la MPO. La molécule perd environ 50% de son action inhibitrice aux concentrations physiologiques de 10 et 1 μM. En considérant les résultats obtenus lors de l'étude du cycle de peroxydase, même réalisée à pH plus basique, ainsi que l'incapacité de la quinone d'agir comme élément réducteur, on peut supposer que le PPFQ

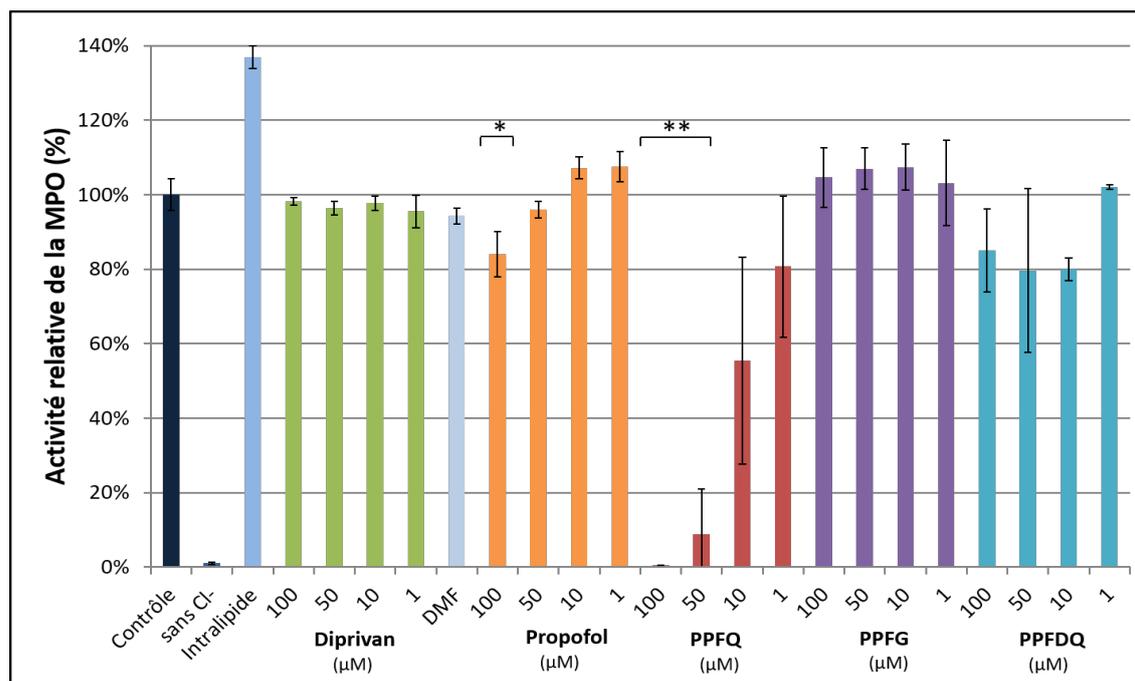


FIGURE 4.33 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPFQ) et du Diprovan sur l’activité de chloration de la MPO à pH 5,5. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type (N=3 (sauf Diprovan N = 2) et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMF).

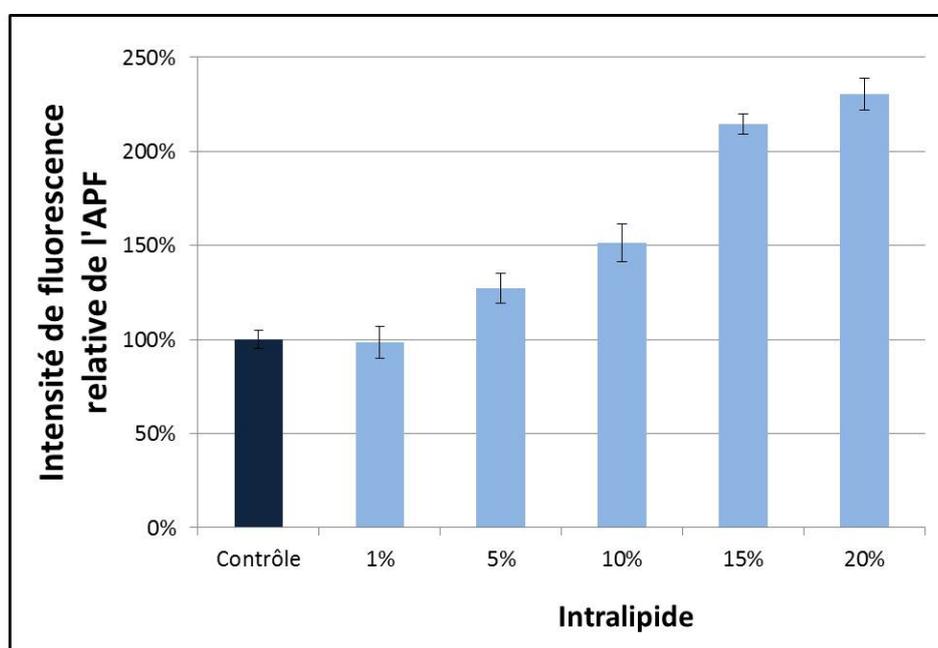


FIGURE 4.34 – Effet de la concentration en Intralipide sur l’intensité de fluorescence de la sonde APF, oxydée par le système MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>. Le pourcentage de l’activité de l’enzyme a été calculé pour l’Intralipide par rapport au contrôle sans solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type (N=1 et n=4).

agit en se liant dans le site actif de l’enzyme et en empêchant l’interaction d’autres substrats

comme le peroxyde d'hydrogène ou les ions  $\text{Cl}^-$ .

#### 4.8.3.2 Milieu extracellulaire - pH 7,4

Durant l'inflammation, la MPO peut être libérée en dehors des PMNs dans le milieu extracellulaire caractérisé par un pH plus alcalin. L'impact des molécules d'intérêt sur le cycle de chloration a donc également été évalué à pH 7,4, pH auquel les substrats réducteurs peuvent plus aisément dévier la MPO vers son cycle de peroxydase (figure 4.35) [54, 63, 381].

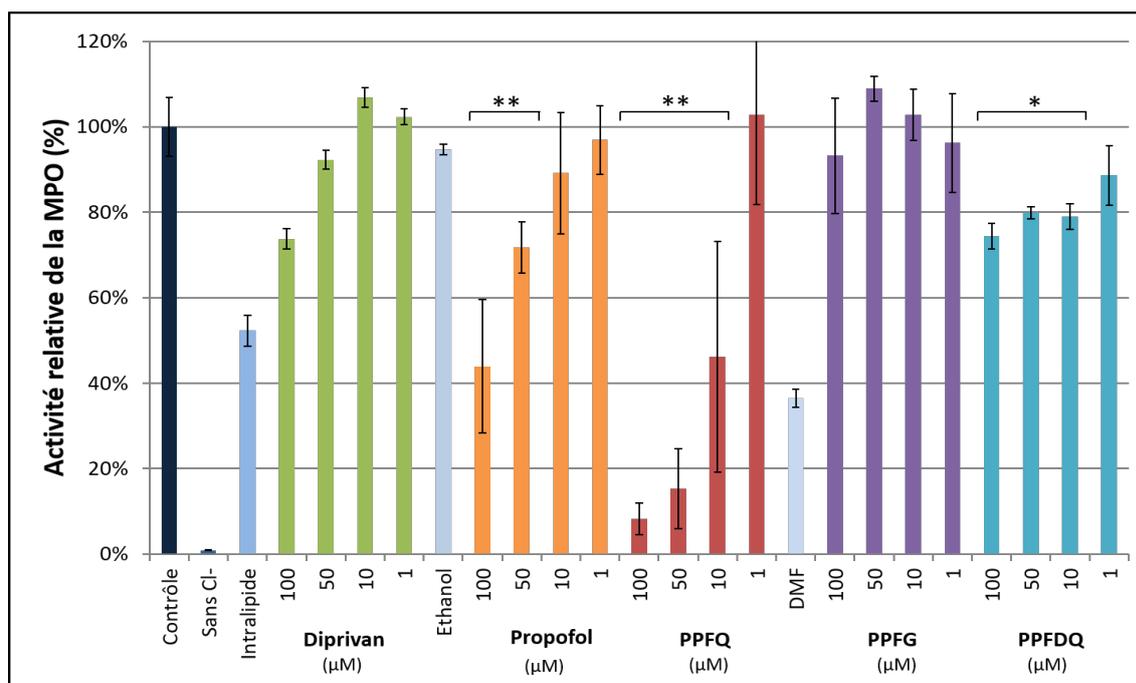


FIGURE 4.35 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPFQDQ) et du Diprivan sur l'activité de chloration de la MPO à pH 7,4. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 (sauf Diprivan N = 2) et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (éthanol, DMF).

Le DMF, utilisé pour remplacer le DMSO, inhibe le signal de fluorescence d'environ 65% par rapport au contrôle sans solvant. Par conséquent, le propofol et le PPFQ ont été dilués dans de l'éthanol. Par contre, en raison de l'insolubilité du PPFQ et du PPFQDQ dans l'éthanol, le DMF n'a pas pu être substitué pour ces deux molécules. Contrairement à l'étude à pH acide, l'Intralipide induit cette fois-ci une décroissance de 48% du signal de fluorescence. L'influence d'une concentration fixe d'Intralipide (10%) sur le signal de fluorescence de l'APF a donc été étudiée en fonction du pH de la solution (figure 4.36). Pour cela, des tampons phosphate contenant des ions  $\text{Cl}^-$  ont été préparés à différents pH. Pour chaque valeur de pH, un contrôle sans Intralipide a été réalisé et le pourcentage de variation du signal de fluorescence de l'APF, en présence d'Intralipide, a été calculé par rapport à ce contrôle. On retrouve l'augmentation du rendement de fluorescence lorsque le pH du milieu est acide. A partir de pH 7, une décroissance constante du rendement va de pair avec l'augmentation de la valeur du pH.

Comme attendu, l'action inhibitrice du propofol est plus élevée lorsque le pH augmente. Une diminution du signal de fluorescence de 58% est observée à 100  $\mu\text{M}$ . Aux concentrations retrouvées dans le plasma (10-50  $\mu\text{M}$ ), l'inhibition est comprise entre environ 11 et 28%.

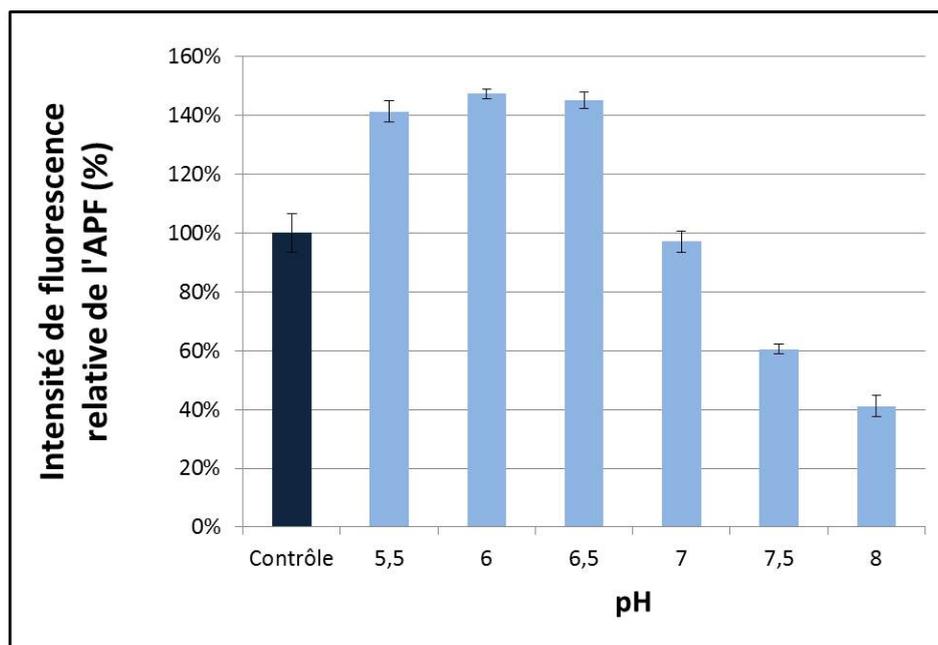


FIGURE 4.36 – Effet du pH sur l'influence de l'Intralipide 10% vis-à-vis de l'intensité de fluorescence de la sonde APF, mesurée avec l'analyse classique. Le pourcentage de l'activité de l'enzyme a été calculé pour l'Intralipide par rapport au contrôle sans solvant associé pour chaque valeur de pH, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=1 et n=4).

L'augmentation de la capacité inhibitrice du propofol vis-à-vis du cycle de chloration avec le pH du milieu confirme son mécanisme d'action en tant que substrat réducteur pour l'enzyme. En effet, l'oxydation des phénols est favorisée pour une gamme de pH neutre à basique, en fonction de leur pKa. Le pKa du propofol est de 11. Par conséquent, à pH 7,4, la concentration en molécules déprotonées est plus élevée qu'à pH 5,5, favorisant ainsi son oxydation et donc sa capacité à entrer en compétition avec les ions chlorure pour réagir avec le composé I. De plus, l'interaction des ions avec l'enzyme est défavorisée à pH neutre (voir section 1.2.2.3). Il faut cependant garder à l'esprit que l'inhibition de la production en HOCl peut également être due à la capacité du propofol à piéger le ROS (figure 4.20) Le Diprivan présente une action d'inhibition plus faible par rapport à son solvant (Intralipide). En effet, à la plus forte concentration, une inhibition de 25% est observée. Il semblerait donc que la présence des lipides en solution empêche l'interaction de la molécule active (propofol) avec l'enzyme. Comme à pH acide, le PPFQ et le PPFQ ne montrent pas d'action de ce type. Par contre, le PPFQ conserve une capacité d'inhibition concentration-dépendante. Le dérivé diminue la formation de HOCl de plus de 92 et 85% aux deux plus fortes concentrations et conserve une inhibition de 54% à 10 $\mu$ M. La capacité du PPFQ à réduire l'activité de chloration, indépendamment du pH du milieu est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la molécule inhibe l'activité oxydante de la MPO en se liant à la structure de l'enzyme.

#### 4.8.4 SIEFED

Le SIEFED permet d'évaluer la capacité de liaison des ligands au site actif de la MPO. Grâce à l'étape de lavage (voir section 2.2.4), seuls les composés d'intérêt capables de se lier dans la cavité (aux acides aminés, au noyau de fer ou à la structure hémique) peuvent décroître l'intensité de fluorescence de la sonde Amplex Red en empêchant l'insertion et l'interaction des substrats (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nitrite et Amplex Red) avec le site actif. Le propofol provoque

une action inhibitrice non négligeable (figure 4.37). La concentration la plus élevée (100  $\mu\text{M}$ ) inhibe 50% de l'activité de la MPO. Pour les concentrations correspondant aux concentrations plasmatiques, l'activité inhibitrice du propofol décroît de 40% (50  $\mu\text{M}$ ) à 15% (10  $\mu\text{M}$ ). Elle devient négligeable à 1  $\mu\text{M}$ . Lorsque le propofol est associé à l'Intralipide, la molécule n'est pas capable de se lier à l'enzyme et est éliminée par le lavage. Le Diprivan inhibe l'activité peroxydasique de la MPO uniquement de 20% à 100  $\mu\text{M}$ . Dans le cas du PPFDQ, aucune diminution significative de l'activité de la MPO n'est observée. Par contre, le PPFQ inhibe entièrement l'action peroxydasique de l'enzyme aux deux plus hautes concentrations (50 et 100  $\mu\text{M}$ ). A concentration physiologique, entre 1 et 10  $\mu\text{M}$ , le dérivé présente une inhibition modérée mais non négligeable, comprise entre 15% et 45%. Le PPFG montre également sa capacité à se lier au site actif de l'enzyme. Il provoque une inhibition de 43% et 29% à 100  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  respectivement.

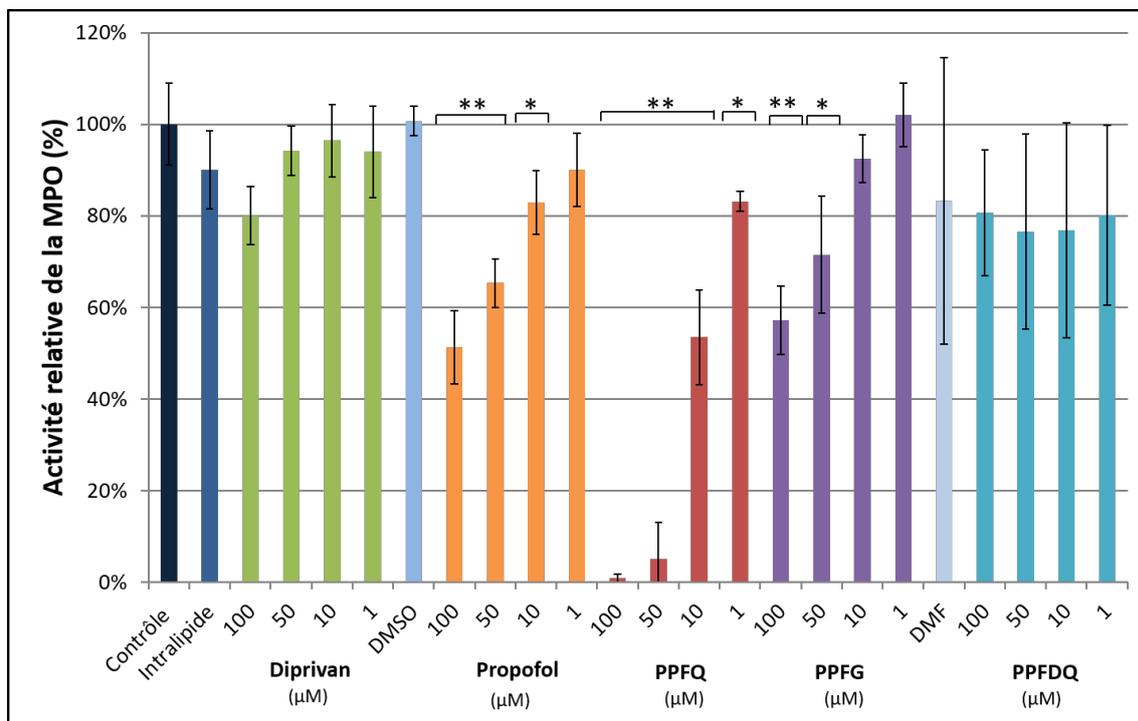


FIGURE 4.37 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG, PPFQ et PPFDQ) et du Diprivan sur l'activité peroxydasique de la MPO, mesurée par analyse SIEFED. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (Intralipide, DMSO ou DMF).

Le SIEFED démontre clairement la capacité du propofol à se lier au site actif de la MPO à des concentrations élevées. Les liaisons et interactions formées sont capables de résister à l'étape de lavage. Ce résultat est en accord avec le *docking* qui propose deux solutions de complexe, dont une seule est caractérisée par un pont hydrogène avec un acide aminé du site actif. Dans le cas du Diprivan, la formulation n'est pas capable d'inhiber l'activité de la MPO. Il semble que la présence de la structure lipidique empêche la molécule active d'accéder ou de se lier au site actif. En associant les résultats du SIEFED à ceux obtenus grâce au *docking*, on peut conclure que le PPFQ peut plus facilement se lier à l'enzyme que le propofol. La présence d'un second atome d'oxygène dans le composé augmente la possibilité de former des liaisons hydrogène avec les différents éléments de la cavité active. Le PPFQ présente une action inhibi-

trice supérieure lors du SIEFED par rapport à l'analyse de fluorescence classique (figure 4.31) aux concentrations intermédiaires ( $50 \mu\text{M}$  et  $10 \mu\text{M}$ ). En plus du fait que le PPFQ n'ait pas d'action réductrice, ces résultats suggèrent que la molécule interagit avec la MPO en se liant à son site actif, empêchant par conséquent le déclenchement du cycle de peroxydase. Pour le PPFQ, l'ajout d'un groupement glucuronide au propofol ne semble pas empêcher le composé de se lier à la MPO. Ce résultat est surprenant car, en analyse classique, une perte totale d'inhibition est observée pour toutes les concentrations (figure 4.31). Or, l'analyse classique étudie la combinaison des modes d'action des inhibiteurs (action anticatalytique et action réductrice). Cependant, en raison du temps d'incubation plus court que celui du SIEFED, la composante catalytique de l'inhibition est plus faible que la composante réductrice. Le PPFQ ne présente pas d'action réductrice et il semblerait que sur ce temps d'incubation plus court, la molécule ne puisse pas se lier efficacement à l'enzyme. Il est nécessaire d'attendre une période d'incubation de deux heures pour observer une interaction et une inhibition significatives aux plus fortes concentrations.

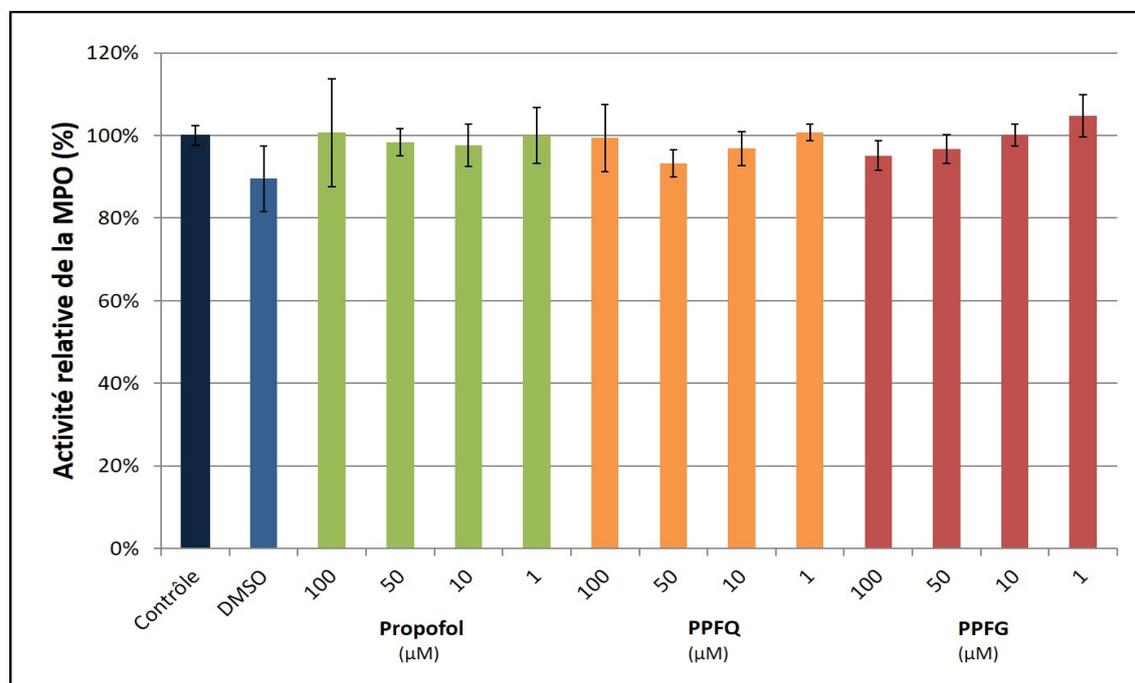


FIGURE 4.38 – Action du propofol, de ses métabolites (PPFG et PPFQ) sur l'activité peroxydasique de la MPO, mesurée par ELISA. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=1$  et  $n=6$ ).

Afin de s'assurer que la diminution du signal de fluorescence mesuré lors de l'analyse SIEFED ne provient pas d'un changement conformationnel de la MPO induit par son interaction avec le ligand, un test ELISA a été effectué. En effet, une telle modification pourrait empêcher la liaison de l'enzyme aux anticorps couvrant le fond des multi-puits (voir annexe D). La figure 4.38 montre les résultats du test ELISA réalisé pour le propofol, le PPFQ et le PPFG. Les trois molécules n'empêchent pas la liaison de la MPO aux anticorps.

#### 4.8.5 Spectroscopie d'absorption - Stopped-flow

Les résultats précédents montrent la capacité du propofol à pénétrer dans le site actif et à interagir, en tant que substrat réducteur efficace, avec les intermédiaires redox de la MPO. Par

conséquent, une étude de spectroscopie d'absorption *stopped-flow* (voir annexe D) a permis d'évaluer les constantes de vitesse bimoléculaires pour les réactions de réduction des composés I et II par le propofol (figure 4.39).

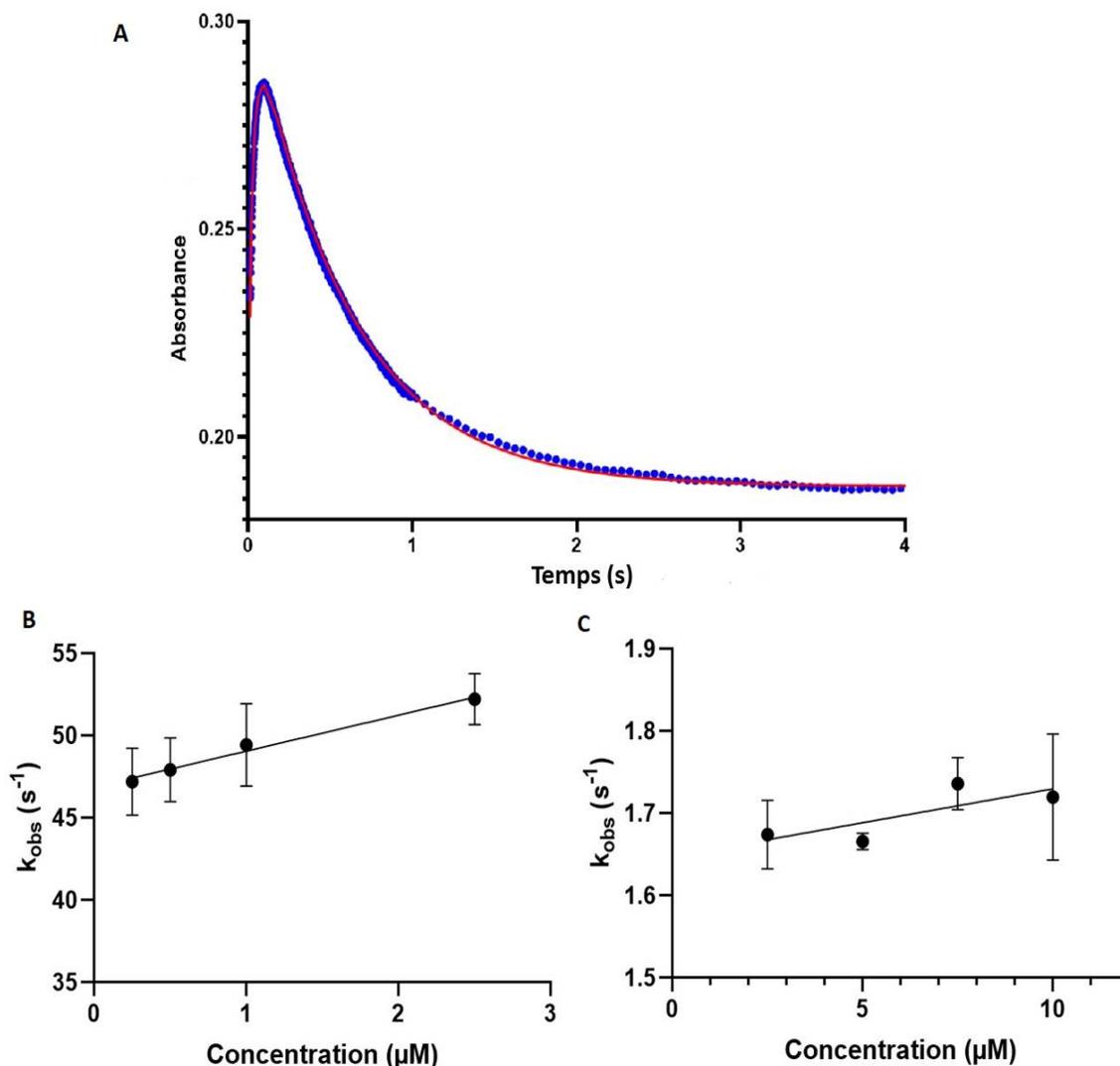


FIGURE 4.39 – Etude *stopped-flow* de la réaction du propofol avec les composés I et II de la MPO (pH 7 à 20°C). A. Evolution temporelle de l'absorbance de la solution (MPO (4,6  $\mu M$ ),  $H_2O_2$  (46  $\mu M$ ) et propofol (2,5  $\mu M$ )) à 456 nm. Courbe rouge : courbe d'ajustement exponentielle pour la formation du composé II (croissance) et pour la conversion du composé II en enzyme native (décroissance). B. Relation linéaire entre la constante de pseudo-premier ordre  $k_{obs}$  et la concentration en propofol, pour la formation du composé II. C. Relation linéaire entre la constante de pseudo-premier ordre  $k_{obs}$  et la concentration en propofol, pour la conversion du composé II en enzyme native.

Le système *stopped-flow* permet de faire réagir la MPO avec l' $H_2O_2$  afin de former le composé I. Une concentration d' $H_2O_2$  dix fois plus élevée que celle de la MPO permet une conversion totale de l'enzyme. Le composé I peut alors rapidement réagir avec le propofol afin de former le composé II. La partie A de la figure 4.39 illustre l'évolution temporelle de l'absorbance à 456 nm de la solution de composé I contenant une concentration de propofol de 2,5  $\mu M$ . La croissance de l'absorbance est due à la réduction par le propofol du composé I en composé II. Elle est suivie par une décroissance exponentielle résultant de la réduction du composé II en enzyme native. Un ajustement de courbe réalisé sur les deux phases exponen-

tielles permet de déterminer les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre  $k_{obs}$  des deux réactions de réduction. Ce processus est reproduit pour différentes concentrations de propofol.

Pour la réduction du composé I, la partie B de la figure 4.39 montre la dépendance entre la constante  $k_{obs}$  et la concentration en propofol. La pente de l'ajustement linéaire permet d'estimer une constante de vitesse de second ordre valant  $2,2 \cdot 10^6 \text{ Ms}^{-1}\text{s}^{-1}$  à pH 7. Le propofol est un bon donneur d'électron pour le composé I de la MPO, permettant ainsi la formation du composé II. La constante de vitesse du propofol est supérieure d'environ deux ordres de grandeur à celle des ions chlorure ( $2,4 \cdot 10^6 \text{ Ms}^{-1}\text{s}^{-1}$  à pH 7 [381]) et est du même ordre de grandeur que celle d'autres substrats comme l'indole, la tryptamine, la mélatonine [160, 381], la curcumine [148], le methimidazole et la mercaptopurine [149]. Ce résultat est en accord avec la littérature qui indique que le cycle de peroxydase (et donc l'oxydation de substrats comme des phénols) domine le cycle de chloration à pH neutre [54].

La constante de vitesse bimoléculaire de la réduction par le propofol du composé II a été évaluée grâce au graphique illustré dans la partie C de la figure 4.39. La valeur est de  $8,2 \cdot 10^3 \text{ Ms}^{-1}\text{s}^{-1}$  à pH 7. Celle-ci est proche de celle obtenue pour des substrats comme la tyrosine, l'indole [381] ou encore la mercaptopurine ou la cystéamine [149]. Le propofol réduit le composé II plus lentement que le composé I. En effet, il y a un écart d'environ deux ordres de grandeur entre les deux constantes de vitesse. Cette différence peut s'expliquer par la différence entre les potentiels d'oxydoréduction des couples composé I/composé II (1,35 V) et composé II/enzyme native (0,97 V) [375]. En effet, la différence entre les potentiels redox du propofol et du couple composé I/composé II est plus grande que celle relative au couple composé II/enzyme native. Par conséquent, le composé I est un oxydant plus puissant pour le propofol que le composé II. En reliant ces résultats à l'ensemble de ceux décrits précédemment, on peut conclure que le propofol peut agir comme substrat réducteur dans le cycle de peroxydase de la MPO, en favorisant l'accumulation du composé II et en ralentissant par conséquent l'activité oxydante de l'enzyme. A pH neutre, proche du pH physiologique du milieu extracellulaire, le propofol peut détourner l'enzyme du cycle de chloration vers le cycle de peroxydase en interagissant fortement avec le composé I.

#### 4.8.6 Bilan de l'action du propofol et de ses métabolites sur la myéloperoxydase

Le propofol agit principalement sur l'activité de la MPO en tant que substrat réducteur. Le SIEFED et le *docking* ont mis en évidence la difficulté de la formation d'un complexe MPO-propofol. Cependant, la molécule est capable de s'insérer dans le site actif de l'enzyme et d'y échanger des électrons avec les composés I et II du cycle de peroxydase. L'association de la voltammétrie cyclique et de l'étude cinétique de la réactivité du propofol avec les intermédiaires de l'enzyme montre que la molécule est un réducteur efficace du composé I. Par contre, elle ralentit l'activité de l'enzyme via son interaction plus faible avec le composé II. Etant capable de réagir avec le composé I, le propofol agit comme substrat compétiteur de l'ion chlorure à pH neutre. A concentration physiologique, le propofol réduit l'activité de chloration de l'enzyme. Cependant, cette action baisse avec la diminution du pH du milieu. Par conséquent, dans le milieu extracellulaire, caractérisé par un pH proche de 7, le propofol favorise le cycle de peroxydase de l'enzyme par rapport à la chloration.

Le PPFQ est le seul dérivé du propofol montrant une action inhibitrice de l'activité oxydante de la MPO. La molécule inhibe aussi bien le cycle de peroxydase que le cycle de chloration quel que soit le pH et même plus efficacement que le propofol lui-même. L'association des différents résultats, et principalement le SIEFED, sont en faveur de la liaison du PPFQ au

sein du site actif de l'enzyme. En effet, la présence d'un second atome d'oxygène en position para, par rapport au groupement hydroxyle originel de la molécule de propofol, permet la formation de ponts hydrogène avec l'histidine 95 et le noyau de fer au centre de l'hème. Dans cette configuration, les deux bras isopropyles du propofol sont orientés vers le canal d'accès au site actif. Cela réduit leur encombrement stérique observé pour le propofol. Ces liaisons empêcheraient l'interaction avec le peroxyde d'hydrogène et donc le déclenchement de la formation du composé I, premier intermédiaire à la fois des cycles de peroxydase et de chloration.

Dans le cas du PPFQ, la molécule a montré une action inhibitrice sur la MPO libérée par des PMNs activés. Cependant, aucune action n'est observée sur la MPO humaine isolée. De même, le PPFQ ne révèle aucune action inhibitrice sur les cycles de peroxydase et de chloration.

## 4.9 Conclusion

Le propofol est un phénol utilisé en clinique en tant que composé anesthésiant. Il fait partie des molécules les plus fréquemment utilisées pour initier et maintenir un état sédatif lors d'opérations ou dans les unités de soins intensifs. De nombreuses études se sont intéressées à sa capacité antioxydante et anti-inflammatoire. Grâce à son action de piègeur de radicaux et de ROS, le propofol possède un effet neuroprotecteur. Il protège également différents organes contre l'ischémie-reperfusion. Au niveau du système inflammatoire, le propofol est capable d'inhiber différents mécanismes des leucocytes dont notamment le phénomène de nérose, la libération de cytokine, la chimiotaxie ou encore la phagocytose.

Sur base de ces connaissances, il a paru intéressant d'approfondir l'étude de l'impact du propofol sur le mécanisme inflammatoire. Afin d'évaluer le bénéfice de son utilisation lors du traitement de pathologies inflammatoires, ce travail s'est intéressé à l'action de la molécule sur différents intermédiaires essentiels, aussi bien cellulaires (PMNs), enzymatiques (MPO) que chimiques de ce processus complexe. En effet, l'ajout d'une action potentiellement immunomodulatrice lors de son utilisation, notamment en unité de soins intensifs chez des patients souffrant de pathologies de ce type (sepsis, COVID-19,...), pourrait apporter un bénéfice supplémentaire non négligeable.

Afin de pouvoir être injecté aux patients, le propofol doit être associé à une émulsion lipidique, l'Intralipide (Diprivan). L'impact de cette structure micellaire sur l'action de la molécule active a dû être évalué. Après l'injection, le propofol est métabolisé rapidement par le foie. C'est pourquoi, il est essentiel d'étudier l'action anti-inflammatoire des métabolites pour obtenir une évaluation plus complète de l'impact réel du propofol dans l'organisme. Pour cela trois métabolites ont été choisis pour cette étude : le propofol- $\beta$ -glucuronide, métabolite principal du propofol, ainsi que deux composés quinones, la 2,6-diisopropyl-1,4-quinone (PPFQ) et la 3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone (PPFDQ).

Le propofol est un piègeur efficace de radicaux et de ROS, dans une gamme de concentrations pouvant être mesurées dans le sang de patient (10-50  $\mu$ M). Cette propriété lui permet notamment de réduire l'anion superoxyde produit lors de la flambée respiratoire des PMNs activés. A cette action s'ajoute également une capacité à inhiber le processus de production de ce ROS par les cellules. Lors d'un bref temps d'incubation des PMNs en présence de propofol, celui-ci agit majoritairement en tant que piègeur de  $O_2^-$ . Par contre, lorsque l'incubation se prolonge, la molécule démontre clairement une capacité d'interaction supplémentaire avec les cellules. Le caractère lipophile de la molécule lui permet de pénétrer la membrane plasmique où elle pourrait réduire la production d'anions superoxydes via différents mécanismes potentiels. L'effet du propofol peut être lié à sa capacité de modification locale de la fluidité membranaire. La molécule peut de ce fait réduire la stimulation de cellules en empêchant la pénétration d'une molécule stimulatrice comme le PMA au sein des cellules. Le propofol est également capable de se lier à des protéines membranaires. Une interaction avec les sous-unités membranaires du complexe NADPH oxydase est envisageable. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour identifier le mécanisme d'action de la molécule.

Le propofol n'impacte pas de manière significative le processus de dégranulation des PMNs. Bien qu'il ne réduise pas la libération de myéloperoxydase par les PMNs activés, la molécule est capable d'agir en tant qu'inhibiteur réversible de l'enzyme. En effet, le propofol ne peut se lier au site actif de l'enzyme et former un complexe qu'à haute concentration. Cependant, le placement de la molécule à l'entrée du site actif lui permet d'être suffisamment proche de l'hème pour rendre possible l'échange d'électrons. C'est pourquoi, dans la gamme de concentrations physiologiques, le propofol peut jouer le rôle de substrat réducteur pour les deux

composés du cycle de peroxydase de l'enzyme (composés I et II). La molécule étant très réactive avec le composé I, elle est capable de détourner l'enzyme de son cycle de chloration et d'inhiber la formation d'acide hypochloreux à pH basique. Cette action diminue avec le pH du milieu. Par conséquent, le propofol peut être un inhibiteur du cycle de chloration de la MPO dans le milieu extracellulaire. En tant que phénol, il agit également comme piègeur de HOCl. Ensuite, après avoir dévié l'enzyme vers son cycle de peroxydase, le propofol est capable de réduire le composé II. Néanmoins, cette interaction est moins efficace que la réduction du composé I. Par conséquent, le propofol permet de ralentir l'activité oxydante de l'enzyme en la maintenant sous sa forme moins réactive, le composé II.

La présence de l'Intralipide semble réduire de façon générale l'action de la molécule active *in vitro*, notamment envers les PMNs. Le Diprivan conserve cependant une action inhibitrice significative sur l'activité de peroxydase de la MPO à pH physiologique. De plus, l'émulsion lipidique présente elle-même une action antioxydante en tant que piègeur de radicaux et de ROS tels que l'anion superoxyde ou l'acide hypochloreux.

En ce qui concerne les métabolites et dérivés du propofol étudiés au cours de ce travail, les deux composés quinones ont donné des résultats très intéressants, là où, le métabolite principal, le propofol- $\beta$ -glucuronide, n'a globalement montré aucune action inhibitrice significative, qu'elle soit antioxydante ou inhibitrice de la MPO ou des processus cellulaires des PMNs. Le PPFQ ne semble donc pas contribuer au potentiel anti-inflammatoire du propofol *in vivo*. Le PPFQ et le PPFQDQ apparaissent comme des piègeurs de l'anion superoxyde très efficaces. A cela s'ajoute leur capacité à inhiber la production de ROS par des PMNs activés. En effet, tout comme pour le propofol, leur caractère lipophile leur permet de pénétrer la membrane plasmique. Au sein des membranes, les quinones sont connues pour jouer le rôle de transporteur d'électrons. On peut donc suspecter qu'elles puissent interférer dans l'échange d'électrons nécessaire à la réduction de l'oxygène en anion superoxyde opéré par le complexe protéique NADPH oxydase. Des analyses complémentaires restent nécessaires afin de comprendre le mode d'action complet des deux composés. Les deux quinones, et particulièrement le PPFQDQ, sont des inhibiteurs efficaces de la flambée respiratoire des PMNs, et ce, même à des concentrations physiologiques (1  $\mu$ M). Elles peuvent donc également impacter indirectement l'activité oxydante de la MPO en inhibant la formation de son substrat naturel, le peroxyde d'hydrogène. Les différents tests réalisés sur l'enzyme elle-même ont montré que le PPFQ peut influencer directement son activité en jouant le rôle d'inhibiteur anticatalytique. En effet, la quinone inhibe aussi bien le cycle de peroxydase que celui de chloration, et ce, également à pH acide. La présence d'un second atome d'oxygène opposé au groupement hydroxyle de la molécule de propofol permet une meilleure interaction entre celle-ci et le site actif de l'enzyme. Cela peut entraver l'insertion de substrat comme le peroxyde d'hydrogène et donc empêcher le déclenchement des cycles de la MPO. Une étude de co-cristallisation du PPFQ avec l'enzyme permettrait de vérifier la création réelle du complexe MPO-inhibiteur et viendrait alors confirmer les résultats obtenus grâce au SIEFED et au *docking*.

En conclusion, les différents résultats acquis sont en faveur d'une action immunomodulatrice du propofol et de deux de ses dérivés et métabolites (la 2,6-diisopropyl-1,4-quinone - PPFQ et la 3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone - PPFQDQ) aux concentrations détectées dans le sang de patient lors de l'induction et du maintien de l'anesthésie. Cela constitue un atout supplémentaire lors de l'utilisation de la molécule en unité de soins intensifs pour des patients souffrant de divers traumatismes ou pathologies inflammatoires.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de deux publications, une première concernant le propofol dans *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* [382] et une

---

seconde sur l'action de ses dérivés et métabolites dans le journal *Free Radical Biology and Medicine* [383].



## Chapitre 5

# Anticancéreux

Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, Jean Nicolas Marjolin (1828) et Caesar Hawkins (1833), chirurgiens français et anglais, sont les premiers à suggérer un lien entre le phénomène inflammatoire et le cancer. Ils observent, quelques années après une brûlure, l'apparition et la prolifération de cellules cancéreuses, appelées carcinome, près des cicatrices [384, 385]. En 1863, Rudolf Virchow montre la présence de leucocytes au sein de tissus tumoraux et formule l'hypothèse selon laquelle la présence de ces cellules immunitaires dans les tissus inflammés indiquerait le lieu où se développent des cellules cancéreuses [385, 122]. Il a ensuite fallu attendre environ un siècle pour approfondir la compréhension et apporter la preuve du rôle essentiel du processus inflammatoire dans la tumorigenèse. En effet, Harold F. Dvorak a mis en évidence les similitudes entre le mécanisme de développement de nombreuses pathologies inflammatoires et celui de tumeurs cancéreuses. Au cours de ces deux phénomènes, on retrouve une séquence commune d'évènements tels que l'invasion du tissu conjonctif (le stroma) par les cellules, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'extravasation sanguine, l'accumulation de différentes protéines plasmatiques, l'activation du système de coagulation sanguine extravasculaire, l'apparition d'une structure fibreuse favorisant la migration cellulaire (tissu cicatriciel (inflammation) et desmoplasie (cancer)), le déclenchement de l'angiogenèse et la synthèse de collagène. [386]

De nombreuses preuves attestent du lien étroit entre inflammation et cancer. Il a été montré qu'une personne atteinte d'une pathologie inflammatoire chronique présente une prédisposition à développer un cancer [387, 388]. On estime que le développement d'environ un quart des cancers est associé à un processus inflammatoire chronique, induit par des agents physico-chimiques ou infectieux [389]. Par exemple, les personnes souffrant de colite ulcéreuse ont dix fois plus de risque de développer un cancer colorectal [390]. En effet, plus la situation inflammatoire se prolonge dans le temps, plus le risque d'engendrer un cancer est important [388]. Le processus inflammatoire génère la production de diverses molécules comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNOS), dont le but est de détruire les agents pathogènes mais aussi de stimuler la régénération cellulaire. Dans le cas d'une inflammation aiguë, la production de nouvelles cellules démarre lorsque celle de ROS et RNOS est terminée. Par contre, en cas d'inflammation chronique, la production de ROS et RNOS étant continue, elle se superpose à la génération des nouveaux tissus, provoquant de ce fait leur altération. Les espèces réactives peuvent induire des dégâts au niveau de l'ADN cellulaire, ce qui entraîne le développement de mutations pouvant mener à l'apparition de cancers [391]. Inversement, le développement d'un cancer provoque l'inflammation. Tout comme les cellules du système immunitaire, les cellules cancéreuses sécrètent des cytokines, protéines médiatrices de l'inflammation. Cette production continue provoque l'infiltration des tissus cancéreux par les cellules inflammatoires, telles que des macrophages et des leucocytes, afin de créer un micro-

environnement protecteur et favorable au développement de l'angiogenèse et de métastases [389, 392, 393].

Le lien entre cancer et inflammation est en réalité complexe. L'inflammation joue un double rôle dans le processus cancéreux. Elle peut promouvoir le développement de tumeurs, comme expliqué précédemment, mais elle peut également restreindre leur progression [119]. Deux stratégies peuvent donc être envisagées dans le cas du traitement des cancers.

D'une part, les cellules cancéreuses peuvent être perçues par l'organisme comme des éléments étrangers à éliminer et celui-ci peut tenter de se défendre grâce à son système immunitaire. Apetoh et al. [394] ont notamment montré que les cellules cancéreuses détruites par chimiothérapie ou radiothérapie possèdent des propriétés stimulatrices du système inflammatoire inné. Ces cellules mourantes libèrent différentes protéines qui vont activer les cellules immunitaires comme les lymphocytes T. Celles-ci vont alors participer à l'élimination des cellules cancéreuses [119]. En se basant sur ce mécanisme, des chercheurs ont tenté de booster le système immunitaire de patients afin de les traiter. C'est ainsi que s'est développée l'immunothérapie. Différentes stratégies ont été investiguées. Il y a tout d'abord l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques, produits en laboratoire, qui vont reconnaître et se lier à différents éléments spécifiques des cellules cancéreuses cibles. Les anticorps signalent alors la présence de celles-ci au système immunitaire afin de les éliminer [395]. Des vaccins anticancéreux sont également en cours d'étude. Contrairement aux vaccins classiques, ils ne sont pas administrés à titre préventif mais bien lorsque le cancer est présent et encore de taille restreinte. Certains de ces vaccins utilisent des cellules dendritiques. Ces cellules du système immunitaire sont isolées à partir du sang du patient, multipliées en laboratoire, avant d'être mises en présence de cellules cancéreuses prélevées chez le patient. Les cellules ont ainsi à leur surface des éléments antigènes des cellules cancéreuses. Elles peuvent ensuite être réinjectées au patient afin de déclencher le système immunitaire et d'activer les lymphocytes [396]. Il existe également une immunothérapie cellulaire qui consiste à injecter au patient des cellules immunitaires, principalement des lymphocytes activés [396, 397]. Une autre branche de l'immunothérapie utilise quant à elle des virus oncologiques. En effet, l'injection contrôlée de virus spécifiques, c'est-à-dire modifiés afin d'augmenter leur cytotoxicité ou leur pouvoir stimulateur du système immunitaire, peut être une voie de traitement. Les virus vont pénétrer les cellules cancéreuses et s'y multiplier, provoquant la mort cellulaire. Ils vont également avoir un impact sur l'environnement tumoral et stimuler la réponse immunitaire du corps [398]. De nombreuses études ont été réalisées sur l'immunothérapie depuis plusieurs décennies sans résultats particulièrement probants. Cependant depuis 2007, elle suscite un regain d'intérêt grâce aux résultats encourageants de l'étude de Downey et al. [399], qui montrent la capacité d'un anticorps monoclonal, l'ipilimumab, à augmenter le taux de survie chez des patients atteints d'un mélanome métastatique [400]. Actuellement, l'immunothérapie est utilisée en clinique, aux côtés de la chimiothérapie et de la radiothérapie.

D'autre part, il existe un intérêt à contrôler l'inflammation associée au cancer.

Tout d'abord, un traitement efficace des pathologies inflammatoires chroniques permettrait de prévenir l'apparition de certains types de cancers [393]. C'est pourquoi le développement et l'étude de molécules aux propriétés anti-inflammatoires représentent un sujet de recherche important.

En parallèle, des recherches s'intéressent à l'impact positif de l'inhibition de l'inflammation lors du traitement de tumeurs cancéreuses. De nombreuses études se sont portées sur l'investigation de l'effet synergique d'une prise d'un traitement anti-inflammatoire combinée à une chimiothérapie [401]. Une étude récente de 2021 s'est penchée sur l'effet de ce type d'association chez des patientes souffrant d'un cancer du sein étendu ou métastaté et ne répondant pas

bien à la chimiothérapie seule [402]. Le traitement, combinant le NG-monométhyl-L-arginine et les taxanes, a permis de réduire la taille de la tumeur chez environ la moitié des patientes. La molécule anti-inflammatoire, dans ce cas-ci inhibitrice de la production d'oxyde nitrique, est capable de réduire l'inflammation dans l'environnement tumoral, favorisant ainsi la pénétration des cellules immunitaires au sein de la tumeur [403]. On peut noter également que l'administration de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens permet, d'une part, de prévenir l'apparition du cancer colorectal [404, 405] et, d'autre part, d'améliorer son traitement [406]. En effet, les molécules anti-inflammatoires inhibent la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), enzyme essentielle à la production de cytokines, les prostaglandines, intervenant dans le déclenchement du processus inflammatoire. L'inhibition de la COX-2 induit une régression de la tumeur, en stoppant la prolifération et la migration des cellules épithéliales malades [407, 408] et en supprimant l'environnement inflammatoire de la tumeur, notamment via l'arrêt de l'angiogenèse [406, 409, 410]. L'administration d'une molécule anti-inflammatoire en combinaison d'une chimiothérapie peut également modifier la pharmacocinétique et le métabolisme de la molécule anticancéreuse, augmentant son action ou diminuant sa toxicité [393, 411, 412]. L'administration de certaines molécules anti-inflammatoires peut également réduire les effets secondaires de la chimiothérapie, améliorant ainsi le confort de vie du patient [413, 414, 393].

De nombreuses études portent sur l'investigation de l'action antitumorale de molécules, utilisées en premier intention comme anti-inflammatoire. Cependant, il peut aussi être intéressant d'évaluer l'impact anti-inflammatoire de molécules reconnues comme anticancéreuses. Celles-ci peuvent-elles, en plus de leur action cytotoxique sur les cellules cancéreuses, réduire l'environnement pro-oxydant des tumeurs ? Certaines de ces molécules anticancéreuses ont montré des propriétés anti-inflammatoires, ou du moins immunomodulatrices [415, 416] et antioxydantes [417, 418], selon des mécanismes partiellement connus. Ceux-ci induisent l'apoptose des cellules du système immunitaire comme les lymphocytes. Les molécules anticancéreuses peuvent-elles également interagir avec les PMNs, provoquer leur apoptose ou altérer des processus comme la production de ROS ou la libération d'enzymes ? Il est également intéressant d'étudier leur potentiel effet inhibiteur sur la myéloperoxydase, marqueur essentiel de l'inflammation.

De tels mécanismes anti-inflammatoires offrirait à ces molécules des atouts pharmacologiques supplémentaires importants dans le cadre du traitement du cancer. En effet, elles pourraient ainsi éliminer les cellules tumorales et diminuer parallèlement l'effet stimulateur de l'environnement oxydant. La compréhension des mécanismes immunomodulateurs pourrait également permettre de considérer leur utilisation pour d'autres types spécifiques de cancers caractérisés par la présence de PMNs et de MPO dans leur environnement. Enfin, l'utilisation des composés anticancéreux efficaces pourrait aussi être envisagée pour le traitement d'autres pathologies, comme les maladies inflammatoires chroniques.

## 5.1 Molécules anticancéreuses

Les molécules anticancéreuses sont classées en différentes catégories en fonction de leur mode d'action. Leur cible principale est l'ADN. Elles peuvent agir en tant qu'agents alkylants, agents intercalants ou comme antimétabolites.

Les agents alkylants se lient de façon covalente aux atomes d'azote et d'oxygène des bases puriques et pyrimidiques composant l'ADN [419]. La cible principale des agents alkylants est la guanine qui présente quatre sites potentiels de liaison [420]. Ces liaisons s'établissent lors de l'étape de répllication de l'ADN, lorsque les deux brins sont séparés. Les agents peuvent se lier de façon monovalente à un seul nucléotide ou alors de façon bivalente et former des

ponts intra- ou inter-brins. Ces liaisons vont empêcher la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Les agents alkylants peuvent également induire des cassures simple et double brin. Ces lésions vont alors conduire à l'apoptose de la cellule cancéreuse. [419, 420] Il existe huit familles d'agents alkylants : les moutardes azotées, les aziridines, les nitrosourées, les sulfonates d'alkyle, les oxazaphosphorines, les triazènes, les complexes du platine et la mitomycine C.

Les agents intercalants sont des molécules planes aromatiques capables de s'insérer dans l'espace situé entre deux paires de bases nucléiques au sein de la structure double brin de l'ADN, perpendiculairement à l'axe de l'hélice. Cette insertion modifie la structure de l'ADN, provoquant l'allongement du brin. Cela peut induire l'inhibition du phénomène de réplication et de multiplication cellulaire. Parmi les agents intercalants, on trouve les dérivés de la camptothécine ou encore les anthracyclines. [421, 422]

Les antimétabolites agissent selon deux modes d'action. Tout d'abord, les antipuriques et les antiprimidiques, qui sont des analogues structuraux des bases nucléiques. Ils vont s'incorporer dans l'ADN à la place des bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (uracile, thymine et cytosine). Ils vont se substituer aux vraies bases lors de la réplication de l'ADN, bloquant ainsi le processus. Le second mode d'action s'attaque à la synthèse des bases elles-mêmes. Les antifoliques interfèrent au niveau de la synthèse des bases nucléiques en inhibant la dihydrofolate réductase. Cette enzyme intervient dans la synthèse de l'acide folique, précurseur des bases nucléiques. D'autres antimétabolites, comme l'hydroxyurée, inhibent la ribonucléoside diphosphate réductase. Cette enzyme permet la transformation des nucléotides en désoxynucléotides. [419, 423]

Toutes les molécules anticancéreuses n'interagissent pas avec l'ADN. Certaines, appelées antimitotiques, agissent sur le fuseau mitotique, élément essentiel au phénomène de mitose, le processus de division cellulaire. Le fuseau est formé par l'auto-assemblage d'une protéine, la tubuline. Les antimitotiques peuvent être divisés en deux familles : les inhibiteurs de la formation du fuseau et les stabilisants du fuseau. Les inhibiteurs de la création du fuseau mitotique vont inhiber la polymérisation de la tubuline. Les stabilisants du fuseau vont quant à eux inhiber la dépolymérisation du fuseau en complexant la tubuline [419]. Les antimitotiques inhibent donc la division et la multiplication des cellules cancéreuses.

Enfin, les inhibiteurs des tyrosines kinases peuvent également être cités. Les tyrosines kinases sont des enzymes essentielles aux différents processus de régulation cellulaire (développement, croissance, division et signalisation intracellulaire). Elles permettent d'activer différentes protéines intervenant dans ces processus, en leur donnant un groupement phosphate provenant d'une molécule d'ATP. Les inhibiteurs des tyrosines kinases peuvent agir selon différents mécanismes : la compétition avec l'ATP ou avec le substrat protéique, ou encore la liaison à différents sites de l'enzyme provoquant un changement conformationnel et empêchant de ce fait son activation [424, 425].

## 5.2 Choix des molécules

Les molécules anticancéreuses sont caractérisées par une grande diversité de structures. Le choix des composés pour cette étude s'est basé sur différents critères structuraux pouvant être en faveur d'une action inhibitrice envers la MPO. Pour commencer, la taille des molécules est importante dans la recherche d'inhibiteurs de la MPO. En effet, pour pouvoir s'insérer dans le site actif de l'enzyme et y interagir (liaisons, échange d'électrons), les inhibiteurs potentiels

doivent avoir une taille maximale de quelques acides aminés. De même, une structure plane facilite l'insertion de la molécule dans la cavité hémique. Ensuite, des fonctions chimiques comme des fonctions hydroxyles, amines, cétones et carboxyles permettent aux inhibiteurs de former des liaisons telles que des ponts hydrogène avec différents acides aminés ou le noyau de fer du site actif. Pour finir, la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques permet de stabiliser la formation d'un complexe entre l'inhibiteur et le site actif, via un empilement  $\pi$ - $\pi$  entre les cycles de l'inhibiteur et les cycles pyrroles de l'hème.

Un descriptif des six molécules choisies pour ce travail est repris ci-dessous. Celles-ci ne représentent qu'un petit échantillon des candidates potentielles à l'inhibition de la MPO. Les molécules retenues présentent une diversité de structures et de fonctions chimiques. La corrélation entre ces caractéristiques et l'action effective des molécules permettra dans le futur de peaufiner une nouvelle sélection de composés à étudier. Il faut également garder à l'esprit que les critères choisis se basent uniquement sur l'inhibition de la MPO. Or, de mauvais candidats à l'inhibition de l'enzyme pourraient tout de même présenter une action antioxydante ou encore agir sur les PMNs. Par conséquent, les perspectives d'investigation de l'action anti-inflammatoire des molécules anticancéreuses restent encore très nombreuses.

Parmi les molécules sélectionnées, la 6-thioguanine pourrait sortir du lot. En effet, cette molécule présente une structure similaire à celle d'un inhibiteur suicide connu de la MPO, la thioxanthine [163, 164]. Les deux composés présentent un atome de soufre, essentiel à la thioxanthine pour se lier de façon covalente à l'hème de l'enzyme. On peut donc supposer que la 6-thioguanine puisse interagir de façon similaire avec la MPO.

### 5.3 Hydroxyurée

L'hydroxyurée, également appelée hydroxycarbamide, est une hydroxylamine synthétisée pour la première fois en 1869 [426]. Mais il a fallu attendre les années 1960 pour découvrir son action anticancéreuse [427, 428, 429]. L'hydroxyurée est un analogue hydroxylé de l'urée et est un antimétabolite. Elle est utilisée comme agent anticancéreux pour le traitement des maladies myéloprolifératives, types de cancers du sang liés à la surproduction de cellules sanguines diverses [430, 431].

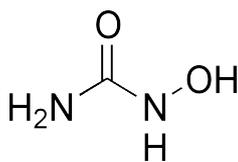


FIGURE 5.1 – Structure de l'hydroxyurée.

#### Propriétés physico-chimiques

La formule empirique de l'hydroxyurée est  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ . Sa structure est comparable à celle de l'urée mais diffère néanmoins par la présence d'un groupement hydroxyle sur un des atomes d'azote. Sa masse molaire est de 76,054 g/mol. L'hydroxyurée se trouve sous forme d'un cristal blanc et est soluble dans l'eau.

#### Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

L'hydroxyurée est administrée principalement par voie orale mais également par voie intraveineuse [432]. Les doses sont de l'ordre du gramme (20-30 mg/kg [433]). L'évolution de la concentration plasmatique en hydroxyurée est relativement équivalente quel que soit le mode

d'administration. Cependant, la concentration plasmatique maximale atteinte suite à l'administration par voie intraveineuse ( $\approx 1\text{mM}$ ) est supérieure à celle obtenue par voie orale (entre 100 et 800  $\mu\text{M}$ ) [432, 434, 435].

La demi-vie de l'hydroxyurée dans l'organisme est comprise entre trois et quatre heures [432]. La molécule est métabolisée au niveau du foie en différents produits dont l'urée ou l'oxyde nitrique [433, 436, 437]. Les divers métabolites sont éliminés par voie rénale [436, 437, 433]. L'hydroxyurée non modifiée est également détectée dans l'urine [433].

### Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

L'hydroxyurée est capable de piéger les radicaux DPPH, de façon cependant moins efficace que l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique [418]. Une étude de *spin trapping* en spectroscopie RPE a également montré sa capacité à piéger le radical hydroxyle de façon dose-dépendante [418]. Cette propriété de piégeage peut partiellement expliquer l'impact positif de l'hydroxyurée dans le traitement de la drépanocytose, maladie provoquant la déformation et la dégradation des globules rouges et caractérisée par l'induction d'un stress oxydant important [438, 439].

Une étude suggère que l'hydroxyurée peut être un substrat pour le cycle de peroxydase de la HRP afin de former, via une succession de trois oxydations, l'oxyde nitrique en passant par le radical nitroxy et le C-nitrosoformamide. [440, 441] L'étude de Maiocchi et al. indique que l'hydroxyurée est un très bon substrat pour la MPO et, plus particulièrement, pour le composé II du cycle de peroxydase [442]. De ce fait, l'hydroxyurée augmente la vitesse du cycle de peroxydase en permettant le passage du composé II vers la forme native de l'enzyme.

Dans les années 60-70, des études ont mis en lumière la capacité de l'hydroxyurée à réduire, voire empêcher, le développement de différents types de bactéries (*Chlamydia trachomatis* [443], *Staphylococcus epidermidis* [444], *Pseudomonas aeruginosa* [445]), en impactant la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Dans les années 90, son utilisation a présenté un intérêt dans le traitement du VIH. En effet, des études *in vitro* ont prouvé la capacité de la molécule à inhiber la synthèse de l'ADN dans des lymphocytes infectés [446]. Par la suite, des études cliniques ont montré que la combinaison de l'hydroxyurée avec une seconde molécule, la didanosine, permet de supprimer la charge virale de patients atteints du VIH. Cependant, des questions sur la toxicité de la molécule se sont posées [447]. Plus récemment, l'hydroxyurée a démontré une capacité à inhiber la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C [448].

L'hydroxyurée est utilisée pour le traitement des maladies myéloprolifératives [430, 431]. Il apparaît notamment qu'elle présente une action antithrombotique en réduisant l'expression du facteur tissulaire, une glycoprotéine intervenant dans l'induction du mécanisme de coagulation sanguine, au niveau des PMNs [449].

## 5.4 6-Thioguanine

La 6-thioguanine, 2-amino-6-purinethiol, est une molécule agissant comme antimétabolite. En tant qu'analogue de la base nucléique guanine, elle peut prendre la place de celle-ci lors du processus de synthèse de l'ADN. Plus précisément, des molécules de 6-thioguanine ayant traversé la membrane des cellules cancéreuses par diffusion facilitée sont, dans un premier temps, phosphorylées en nucléotides qui vont remplacer des molécules de guanine au sein de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire. Cette phase correspond à l'étape de réplication de

l'ADN. La molécule a donc une action cytostatique, c'est-à-dire qu'elle empêche la division cellulaire et provoque l'arrêt de la multiplication des cellules. Les nucléotides inhibent également des enzymes essentielles à la synthèse des purines (glutamine-5-phosphoribosylpyrophosphate aminotransférase, IMP déshydrogénase) [450]

La 6-thioguanine a été utilisée en clinique à partir de 1950, comme la 6-mercaptopurine, pour le traitement de la leucémie lymphoblastique chez l'enfant [451, 452]. La 6-thioguanine sert également dans des thérapies pour la maintenance de la rémission de leucémies myéloïdes [453]. Cependant, le développement de traitements plus performants, ainsi que des effets secondaires (fièvre, frissons, toux, saignement, syndrome d'obstruction sinusoidale du foie), ont réduit considérablement l'utilisation de la 6-thioguanine en tant que molécule anticancéreuse [454, 455]. Néanmoins, des études plus récentes continuent à s'intéresser à son action, notamment contre le cancer de la prostate ou encore en synergie avec d'autres composés [454, 456, 457, 458].

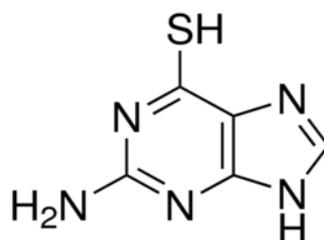


FIGURE 5.2 – Structure de la 6-thioguanine.

L'utilisation de la 6-thioguanine est passée du traitement du cancer à celui de pathologies inflammatoires. En effet, cette molécule est utilisée activement pour le traitement de pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique [459, 460, 461]. La 6-thioguanine présenterait également un intérêt pour le traitement de l'hépatite auto-immune chez des patients intolérants à l'azathiopurine [462].

#### 5.4.1 Propriétés physico-chimiques

La formule empirique de la 6-thioguanine est  $C_5H_5N_5S$ . Sa masse molaire est de 167,193 g/mol. La 6-thioguanine se trouve sous forme d'un cristal blanc et est soluble dans le DMSO et des solutions alcalines (NaOH).

#### 5.4.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

La 6-thioguanine est administrée majoritairement par voie orale, bien que des études aient montré que la voie intraveineuse permet une meilleure absorption de la molécule dans le sang [463] ainsi qu'une meilleure incorporation de celle-ci dans l'ADN cellulaire [453]. En effet, après une prise orale, la concentration plasmatique maximale peut varier entre 0,03 et 0,94  $\mu\text{M}$  et reste constante entre 2 et 4 heures, selon le patient [453]. En revanche, après une injection par intraveineuse, la concentration peut atteindre en moyenne une concentration de 95  $\mu\text{M}$  [463, 464]. La demi-vie biologique varie entre 80 et 90 minutes [465, 466].

La 6-thioguanine est métabolisée au niveau du foie. Il existe trois voies métaboliques distinctes (figure 5.3). La principale fait intervenir l'hypoxanthine guanine-phosphoribosyltransférase qui convertit la 6-thioguanine en 6-thioguanosine monophosphate. Ensuite, celle-ci est

transformée successivement en 6-thioguanosine diphosphate et en 6-thioguanosine triphosphate via l'intervention d'une kinase. Ces trois métabolites sont repris sous l'appellation de nucléotides de la 6-thioguanine (6-TGN). La xanthine oxydase peut quant à elle transformer la 6-thioguanine en acide 6-thiourique. Pour finir, la 6-thioguanine est un substrat de la thiopurine S-méthyltransférase, qui la transforme en 6-méthyl-thioguanine. Les nucléotides (6-TGN) peuvent également être méthylés par cette enzyme. [467] La métabolisation des thiopurines et par conséquent de la 6-thioguanine est indispensable à leur action anticancéreuse et a donc lieu au sein des cellules cancéreuses [450].

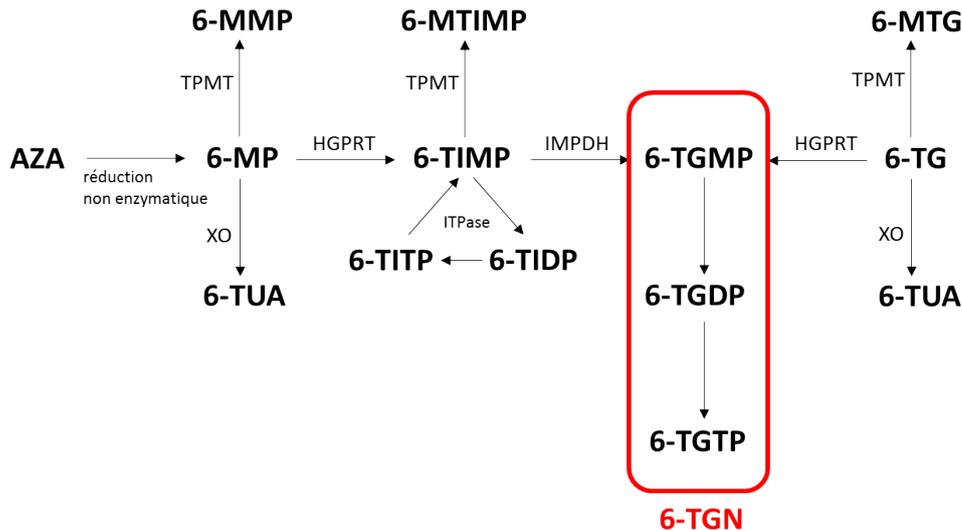


FIGURE 5.3 – Synthèse des processus du métabolisme de la 6-thioguanine (6-TG), de l'azathioprine (AZA) et de la 6-mercaptopurine (6-MP) [467]. La 6-thioguanine est métabolisée par l'hypoxanthine guanine-phosphoribosyltransférase (HGPRT) en 6-thioguanine monophosphate (6-TGMP) et ensuite en 6-thioguanine diphosphate (6-TGDP) et 6-thioguanine triphosphate (6-TGTP) (les trois nucléotides 6-TGN). La 6-thioguanine peut réagir avec la xanthine oxydase (XO) pour donner l'acide 6-thiourique (6-TUA) ou avec la thiopurine-S-méthyltransférase (TPMT) pour donner la 6-méthyl-thioguanine (6-MTG). L'azathioprine est transformée par réduction non enzymatique en 6-mercaptopurine. Cette dernière peut, comme la 6-thioguanine, suivre trois voies réactionnelles. Elle peut réagir avec la TPMT pour donner la 6-méthylmercaptopurine (6-MMP), avec la xanthine oxydase pour donner l'acide 6-thiourique (6-TUA). La réaction de la 6-mercaptopurine avec la HGPRT donne la 6-thioinosine-monophosphate (6-TIMP). Celle-ci peut également réagir selon trois mécanismes. Elle peut subir un cycle en étant phosphorylée en 6-thioinosine-diphosphate (6-TIDP) et puis en 6-thioinosine-triphosphate (6-TITP) par l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). La 6-TIMP peut réagir avec le TPMT afin de donner la 6-méthyl-thioinosine monophosphate (6-MTIMP). Par contre en réagissant avec l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), la 6-TIMP produit la 6-thioguanine monophosphate (6-TGMP), premier nucléotide de la 6-thioguanine.

### 5.4.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

Les thiopurines sont utilisées dans le traitement des pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique [459, 460, 461] et, plus particulièrement, pour maintenir les états de rémission. La mercaptopurine et l'azathioprine sont les composés les plus fréquemment utilisés [468, 469]. Cependant, il apparaît qu'environ un quart des patients peuvent présenter une intolérance à ces deux molécules et sont contraints d'arrêter le traitement dans les trois premiers mois [470, 471]. C'est pourquoi la 6-thioguanine est utilisée comme alternative chez ces patients intolérants ou résistants à ces deux composés [472, 473]. De plus, les métabolites finaux de la mercaptopurine, de l'azathioprine

prine et de la 6-thioguanine sont communs (6-thioguanosine monophosphate, -diphosphate et -triphosphate) [474]. Cependant, dans le cas de la 6-thioguanine, leur formation est plus directe et ne nécessite pas la formation de différents composés intermédiaires (figure 5.3) [467, 475, 476]. Enfin, il semblerait que l'enzyme thiopurine méthyltransférase (TPMT) intervienne en plus faible proportion dans le processus de métabolisation de la 6-thioguanine, ce qui réduit la production d'autres métabolites, les 6-méthylmercaptapurine ribonucléotides, intervenant dans le problème d'hépatotoxicité des thiopurines [477, 478].

Les nucléotides de la 6-thioguanine agissent comme immunosuppresseurs via différents mécanismes. En effet, ils s'insèrent dans l'ADN et l'ARN des cellules, notamment des leucocytes comme les lymphocytes T [479, 480, 481]. Par exemple, un traitement d'un mois par de l'azathioprine induit une diminution de la quantité de lymphocytes et de PMNs dans le sang des patients [482]. Un des métabolites de la 6-thioguanine, la 6-thioguanosine triphosphate, peut également se lier à une GTPase, le Rac1, enzyme intervenant dans différents mécanismes cellulaires (croissance, mouvement, différenciation). Cette liaison module l'activité de l'enzyme et induit l'apoptose des lymphocytes [483, 484].

La toxicité hépatique et plus précisément, le syndrome d'occlusion sinusoidale apparaît comme une complication induite par une utilisation prolongée de la 6-thioguanine [479].

## 5.5 5-Fluorouracile

Le 5-fluorouracile, 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, est un antimétabolite synthétisé par Charles Heidelberger en 1957 [485]. Il s'est basé sur différents résultats montrant, d'une part, que la base azotée uracile est impliquée en plus grande quantité dans la synthèse de l'ARN des cellules cancéreuses du foie que dans celle des cellules saines [486] et, d'autre part, que la présence d'un atome de fluor dans les composés organiques augmente leur toxicité [487]. Il a donc remplacé un atome d'hydrogène de l'uracile par un atome de fluor.

Après avoir pénétré dans les cellules cancéreuses, le 5-fluorouracile est métabolisé sous plusieurs formes et peut par conséquent, agir via différentes voies. En effet, C. Heidelberger a montré la capacité du 5-fluorouracile à s'incorporer dans l'ARN et l'ADN de cellules tumorales humaines [488, 489, 490]. La métabolisation du 5-fluorouracile en 5-fluorouridine-5'-triphosphate et en 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate permet son incorporation dans l'ARN et l'ADN, respectivement [488]. La compréhension du mécanisme d'action du 5-fluorouracile en tant qu'anticancéreux a été améliorée grâce à la découverte d'un second processus, son action inhibitrice de la thymidylate synthase. Cette enzyme intervient dans le processus de synthèse de l'ADN. En effet, elle catalyse la formation de la thymidine, un déoxyribonucléoside, précurseur de l'ADN [491]. Dans le cas de cette inhibition, c'est le métabolite 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate qui est impliqué [488].

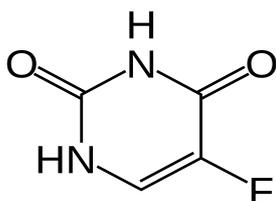


FIGURE 5.4 – Structure du 5-fluorouracile.

Le 5-fluorouracile est un anticancéreux utilisé, seul, en combinaison avec d'autres composés ou en complément de la radiothérapie, dans le traitement de nombreux types de cancers : cancer du sein [492, 493], du pancréas [494, 495], de l'estomac [494, 496], de la peau [497, 498],... Depuis les années 1990, le 5-fluorouracile est le composé le plus employé pour le traitement du cancer colorectal [499]

### 5.5.1 Propriétés physico-chimiques

La formule empirique du 5-fluorouracile est  $C_4H_3FN_2O_2$ . Sa structure est comparable à celle de la base azotée, l'uracile, à laquelle est ajouté un atome de fluor. Sa masse molaire est de 130,077 g/mol. Il se trouve sous forme d'un cristal blanc et est soluble dans les solvants organiques comme le DMSO et l'éthanol.

### 5.5.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

Le 5-fluorouracile est administré par voie intraveineuse à des doses comprises entre 400 et 600 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle [500, 501]. Il possède une demi-vie dans le plasma très courte, de l'ordre de 12 minutes [502, 503]. De ce fait, cet anticancéreux doit être administré de façon prolongée afin de pouvoir détruire un maximum de cellules cancéreuses.

Suite à l'administration de 5-fluorouracile, la concentration plasmatique atteint des valeurs proches de 20-30  $\mu$ M mais décroît rapidement et devient indétectable deux heures après l'injection [500, 502]. La molécule est métabolisée au niveau du foie par l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase. Entre 60 et 90 % de la dose reçue est éliminée par voie urinaire dans les 24 heures [502].

### 5.5.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

Très peu de recherches se sont intéressées à l'action antioxydante du 5-fluorouracile. Une étude a montré qu'une concentration de 10  $\mu$ M de 5-fluorouracile peut réduire la peroxydation lipidique d'environ 25% dans le foie de souris. La molécule serait également capable d'inhiber l'oxydation de l'ABTS mais de façon moins efficace que la molécule antioxydante de référence, le Trolox, analogue de la vitamine E [417].

Par contre, il a été démontré que le 5-fluorouracile provoque l'inflammation de la muqueuse intestinale, induisant des ulcères [504]. Cet effet serait partiellement lié à l'infiltration des tissus par des leucocytes neutrophiles [505]

## 5.6 Cladribine

La cladribine, 2-chloro-2'-déoxyadénosine, est un antimétabolite synthétique utilisé pour traiter la leucémie à tricholeucocytes [506, 507]. La première publication concernant son utilisation remonte à 1972 [508]. La cladribine démontre une action intéressante dans le traitement de lymphomes [509, 510, 511] et est également utilisée pour traiter la sclérose en plaques [512].

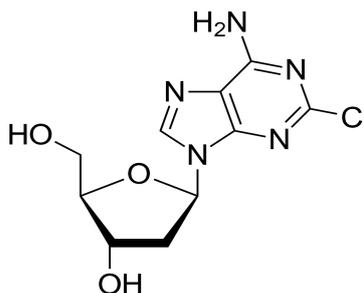


FIGURE 5.5 – Structure de la cladribine.

La cladribine est incorporée dans les lymphocytes et d'autres cellules hématopoïétiques où elle est métabolisée en 2-chlorodésoxyadénosine-5'-triphosphate (CdATP). La CdATP s'incorpore dans les brins d'ADN, bloquant ainsi la division cellulaire et la réparation de l'ADN. De plus, le CdATP inhibe également la ribonucléotide réductase. Ces différentes actions provoquent la mort cellulaire par apoptose. [513]

### 5.6.1 Propriétés physico-chimiques

La formule empirique de la cladribine est  $C_{10}H_{12}ClN_5O_3$ . Sa masse molaire est de 285,69 g/mol. La molécule se trouve sous forme d'un cristal blanc et est soluble dans le DMSO.

### 5.6.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

La cladribine est majoritairement administrée par voie intraveineuse à des doses variant de 0,09 mg/kg à 0,14 mg/kg par jour. Après une période de perfusion de deux heures, la concentration plasmatique maximale atteint des valeurs comprises entre 100 et 400 nmol/l [514, 515]. Une administration orale ou sous-cutanée est également possible, avec une biodisponibilité de 37-51% et de 100% respectivement [515, 516]. La demi-vie biologique terminale de la cladribine varie entre 5,7 et 19,7 heures [515]. Elle est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de passer dans le liquide céphalo-rachidien. La concentration en molécules dans le liquide correspond à environ 25% de la concentration plasmatique [515].

La cladribine est métabolisée en 2-chloroadénine par voie hépatique et intestinale. Ce métabolite est détectable dans le sang mais ne présente pas d'action anticancéreuse [515].

### 5.6.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

Des études ont montré l'action positive et sûre de la cladribine en tant que thérapie contre les rechutes de la sclérose en plaques, maladie inflammatoire auto-immune chronique du système cérébral [517, 518, 519]. L'imagerie par résonance magnétique montre également que l'administration de cladribine permet de réduire significativement l'atrophie cérébrale induite par la maladie [520]. La cladribine s'attaque aux lymphocytes, cellules du système immunitaire, et réduit leur nombre, les empêchant par conséquent de s'attaquer et de détruire les gaines de myéline couvrant les neurones au niveau du cerveau mais aussi de la moelle épinière [512].

D'autres cellules du système immunitaire, les macrophages, issues de la différenciation des monocytes, jouent également un rôle dans le développement des lésions caractéristiques de la sclérose en plaques. Une étude *in vitro* a montré la capacité de la cladribine, à des concentrations thérapeutiques adaptées, à réduire la libération de cytokines (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) par

les macrophages activés sans induire la mort cellulaire par apoptose [521]. La molécule est également capable de diminuer l'action de phagocytose des macrophages activés mais n'agit pas sur les cellules non activées [521]. La cladribine peut provoquer l'apoptose des cellules microgliales, macrophages spécifiques du système nerveux, cibles potentielles du traitement contre la sclérose en plaques. La molécule réduit également leur production de cytokines (IL-6, IL-1  $\beta$  et TNF- $\alpha$ ). Cependant, elle ne présente pas d'effet sur les astrocytes, cellules gliales spécialisées [522, 523].

Il apparaît également que des patients subissant une rechute de sclérose en plaques et traités avec de la cladribine voient leur taux d'homocystéine diminuer, un acide aminé dont l'accumulation induit des effets pro-oxydants et cytotoxiques, notamment au niveau du système nerveux. En parallèle, l'action antioxydante totale du sérum des patients, mesurée via l'action de réduction ferrique du plasma (FRAP), augmente en réponse au traitement [524].

La cladribine est également efficace dans le traitement d'une autre maladie auto-immune, la maladie coeliaque [525, 526]. Celle-ci est provoquée par une réponse excessive des lymphocytes en réaction à l'absorption du gluten au niveau de l'intestin grêle.

## 5.7 Melphalan

Le melphalan, 4-(bis(2-chloroethyl)amino)-L-phenylalanine, est un agent alkylant utilisé dans le traitement du myélome multiple, cancer d'un certain type de globules blancs (les plasmocytes [527, 528, 529]) ainsi que des carcinomes ovariens [528, 530] et mammaires [531]. Le traitement au melphalan à haute dose est accompagné d'une autogreffe de cellules souches sanguines [528, 250]. Le melphalan est insoluble en solution aqueuse et subit rapidement une hydrolyse pour être transformé en monohydroxymelphalan et dihydroxymelphalan dans le sang [532]. Par conséquent, afin d'augmenter les performances de la molécule, différents types de véhicules comme des cyclodextrines [533, 534, 535] ou d'autres structures telles que des nanocages [536] sont développés pour l'amener intacte au niveau de son site d'action.

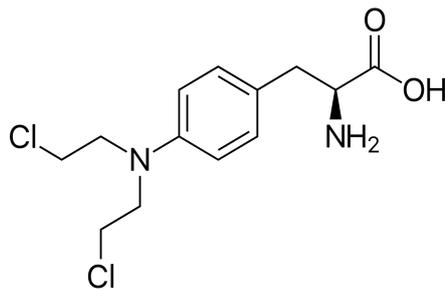


FIGURE 5.6 – Structure du melphalan.

### 5.7.1 Propriétés physico-chimiques

La formule empirique du melphalan est  $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ . Sa masse molaire est de 305,2 g/mol. Il se trouve sous forme d'un cristal blanc et est soluble dans le DMSO et l'éthanol.

### 5.7.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

Le melphalan est administré par voie intraveineuse. Sa posologie est comprise entre 2,5 et 5 mg/kg et peut être répartie sur deux à trois jours [250].

La demi-vie du melphalan dans l'organisme est d'environ 90 minutes [537, 538]. La concentration plasmatique après un traitement de sept jours peut atteindre une valeur d'environ 1,5  $\mu\text{M}$  [537, 538, 539]. Le melphalan ne subit pas de métabolisme enzymatique. Il est hydrolysé dans le sang en monohydroxymelphalan et dihydroxymelphalan. Ces deux composés sont principalement éliminés par voie urinaire [250].

### 5.7.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

Très peu de données existent sur une action potentiellement antioxydante et/ou anti-inflammatoire du melphalan. Cependant, des premières études récentes ont montré que l'inhalation de faibles doses de melphalan (environ 100 fois moindre que les doses thérapeutiques) par des patients souffrant d'une forme sévère de COVID-19 permet d'améliorer leur état [540, 541]. En effet, une diminution du taux de cytokines IL-6, de protéines CRP marqueurs de l'inflammation et des dommages tissulaires dans les poumons a pu être observée. Par contre, l'utilisation de doses cliniques de melphalan provoque l'effet inverse. Lors du traitement de mélanomes, il induirait une stimulation du système immunitaire en augmentant la production et la libération de cytokines (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , CCL2) dans la zone tumorale, induisant l'apoptose des cellules cancéreuses [542, 543].

## 5.8 Crizotinib

Le crizotinib, (R)-3-[1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl) ethoxy]-5-[1-(piperidin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl] pyridin-2-amine, est un inhibiteur de la tyrosine kinase et plus précisément de l'ALK (Kinase du Lymphome Anaplasique) et du c-Met (Mesenchymal-Epithelial Transition factor), deux tyrosines kinases impliquées dans le développement de différents types de cancers (angiogénèse, croissance, métastase) [544, 545].

Le premier inhibiteur de la tyrosine kinase développé et utilisé en clinique était l'imatinib [546]. Par la suite, différents inhibiteurs ont été synthétisés, chacun caractérisé par un spectre de kinases cibles et une pharmacocinétique spécifiques [546, 547]. Le crizotinib est un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP au récepteur des kinases [548]. Son utilisation clinique est autorisée depuis 2011 [549] et il est produit par Pfizer. Il est utilisé principalement dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules caractérisé par une anomalie d'ALK [544, 548]. Le crizotinib a également démontré des effets positifs sur les cancers gastriques, via l'inhibition de la kinase MET [550] ou via la dégradation de l'ADN suite à une augmentation de production de ROS intracellulaires [551]. Il agit sur les myélomes multiples en inhibant la topoisomérase II et la polymérisation de la tubuline [552] ou encore sur les lymphomes anaplasiques à grandes cellules et les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires via l'inhibition de l'ALK [553, 554].

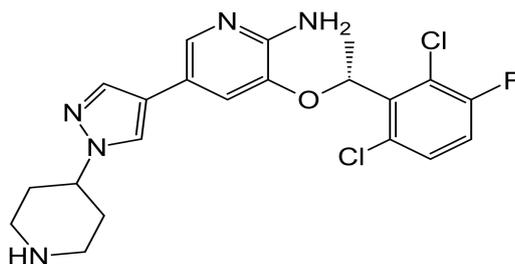


FIGURE 5.7 – Structure du crizotinib.

### 5.8.1 Propriétés physico-chimiques

La formule empirique du crizotinib est  $C_{21}H_{22}Cl_2FN_5O$ . Sa masse molaire est de 450,337 g/mol. Il se trouve sous forme d'un cristal blanc et est soluble dans les solvants organiques, DMSO et DMF.

### 5.8.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

Le crizotinib est administré par voie orale avec une posologie de 250 mg deux fois par jour [555, 554]. La concentration plasmatique atteint sa valeur maximale après 5-6 heures [554]. Après une période de quatorze jours de prise de la molécule, un état d'équilibre est atteint avec une concentration moyenne de 1  $\mu$ M [556].

La demi-vie du crizotinib dans l'organisme est d'environ 42 heures [554]. La molécule est métabolisée au niveau du foie par des isoenzymes du cytochrome P450 [548, 554]. Lorsque l'état d'équilibre est atteint, le crizotinib agit lui-même comme inhibiteur du cytochrome, réduisant de ce fait son élimination [554].

### 5.8.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

Très peu d'études ont été menées sur l'action antioxydante et anti-inflammatoire du crizotinib. En 2019, le Dr. Banstola décrit dans sa thèse son action anti-inflammatoire intéressante dans le traitement de maladies neurodégénératives [420]. En effet, la molécule diminue l'expression de cytokines et l'activation des kinases ERK1/2 dans des cellules microgliales. Le crizotinib est cytotoxique vis-à-vis des PMNs et induit par conséquent une diminution de leur nombre dans le sang lors du traitement de patients atteints d'un neuroblastome [557].

Par contre, il a également été établi que le crizotinib peut être hépatotoxique. En effet, il provoque l'apoptose des cellules via une activation de la production de ROS intracellulaires [558].

## 5.9 Etude de l'action réductrice et antioxydante des anticancéreux

### 5.9.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Les potentiels d'oxydoréduction des six différentes molécules anticancéreuses ont été déterminés grâce à la voltammétrie cyclique dans du tampon phosphate pH 7,4. Ce dernier constitue le milieu principalement utilisé au cours de ce travail.

Le voltammogramme de la 6-thioguanine (figure 5.8) présente un premier pic d'oxydation à 355 mV. Une vague est ensuite clairement observée par rapport au contrôle (tampon phosphate avec 10% de DMSO). Le potentiel de demi-vague est de 770 mV. Aucun pic de réduction inverse n'est observé pour les deux oxydations. Kraske et al. [559] ont montré que deux mécanismes d'électro-oxydation de la 6-thioguanine existent en fonction du potentiel. Une première oxydation est possible à faible potentiel via le groupement thiol de la molécule [560]. Ils ont proposé un mécanisme d'oxydation à un électron conduisant à la formation d'un radical thiyl  $S^\cdot$  (figure 5.9 a). Deux molécules de 6-thioguanine peuvent alors s'associer via la formation d'un pont disulfure (-S-S-) entre les deux radicaux thiyl, rendant le processus irréversible. Kraske et al. ont étudié l'impact du pH du milieu sur le potentiel d'oxydation du groupement thiol de la 6-thioguanine. A pH 7,4, celui-ci est proche de 256 mV vs SCE

(électrode de calomel). Le second mécanisme, advenant à un potentiel plus élevé est, quant à lui, un processus d'oxydation à deux électrons faisant intervenir une molécule d'eau du milieu pour permettre la formation de la 8-oxo-thioguanine (figure 5.9 b) [559, 560]. Différentes équipes de recherche ont également étudié l'électro-oxydation de la 6-thioguanine via la voltammétrie cyclique [561, 562, 563, 564] et ont observé ce mécanisme d'oxydation dans une gamme de potentiels comparable à celle obtenue durant ce travail.

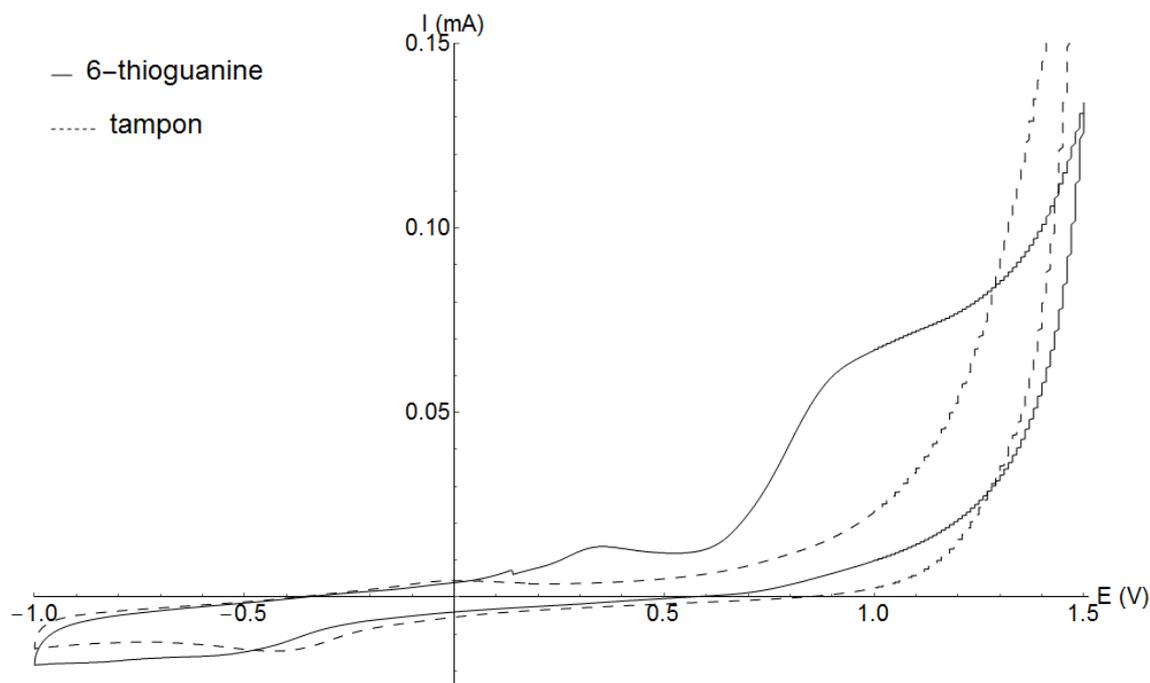


FIGURE 5.8 – Voltammogramme de la 6-thioguanine (5 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

L'oxydation de la 6-thioguanine, par son interaction avec des radicaux ou des ROS, se fait via son groupement thiol. Par conséquent, le potentiel de demi-pic du premier pic d'oxydation irréversible de la molécule fournit une estimation du potentiel redox de la molécule [169]. Un potentiel de + 249 mV vs SCE, soit + 493 mV vs ESH (électrode standard à hydrogène (voir annexe E) est ainsi obtenu.

Le voltammogramme de la cladribine (figure 5.11) ne montre aucun pic d'oxydation et de réduction entre 0 et 1,5 V dans les conditions expérimentales de ce travail. Il n'y a également aucun pic pour des potentiels négatifs. L'augmentation de la concentration en cladribine aurait peut-être permis d'observer un pic d'oxydation. Cependant, cette mesure n'a pu être réalisée étant donné la quantité de composé nécessaire ainsi que son coût. De-los-Santos-Alvarez et al. [565] ou encore Pontinha et al. [566] ont montré que la cladribine présente un pic d'oxydation irréversible à 1,24 V dans du tampon phosphate pH 9 et à 1,31 V à pH 7. Dans les deux études, une concentration de 100 mM a été nécessaire pour observer le pic d'oxydation de la cladribine. Le potentiel d'oxydation de la molécule apparaît à un potentiel élevé supérieur à 1 V et l'amplitude du pic d'oxydation diminue à chaque cycle consécutif. A partir du second cycle, un couple de pics d'oxydation et de réduction apparaît aux alentours de 0,1 V. Pontinha et al. [566] proposent un mécanisme d'oxydation de la cladribine (figure 5.10). Il s'agit d'un processus irréversible qui correspond à la cession de deux électrons et de deux protons par

le groupement adénine de la molécule. Le radical formé est hydroxylé par l'eau en solution, cette forme pouvant ensuite subir une seconde oxydation réversible à un électron.

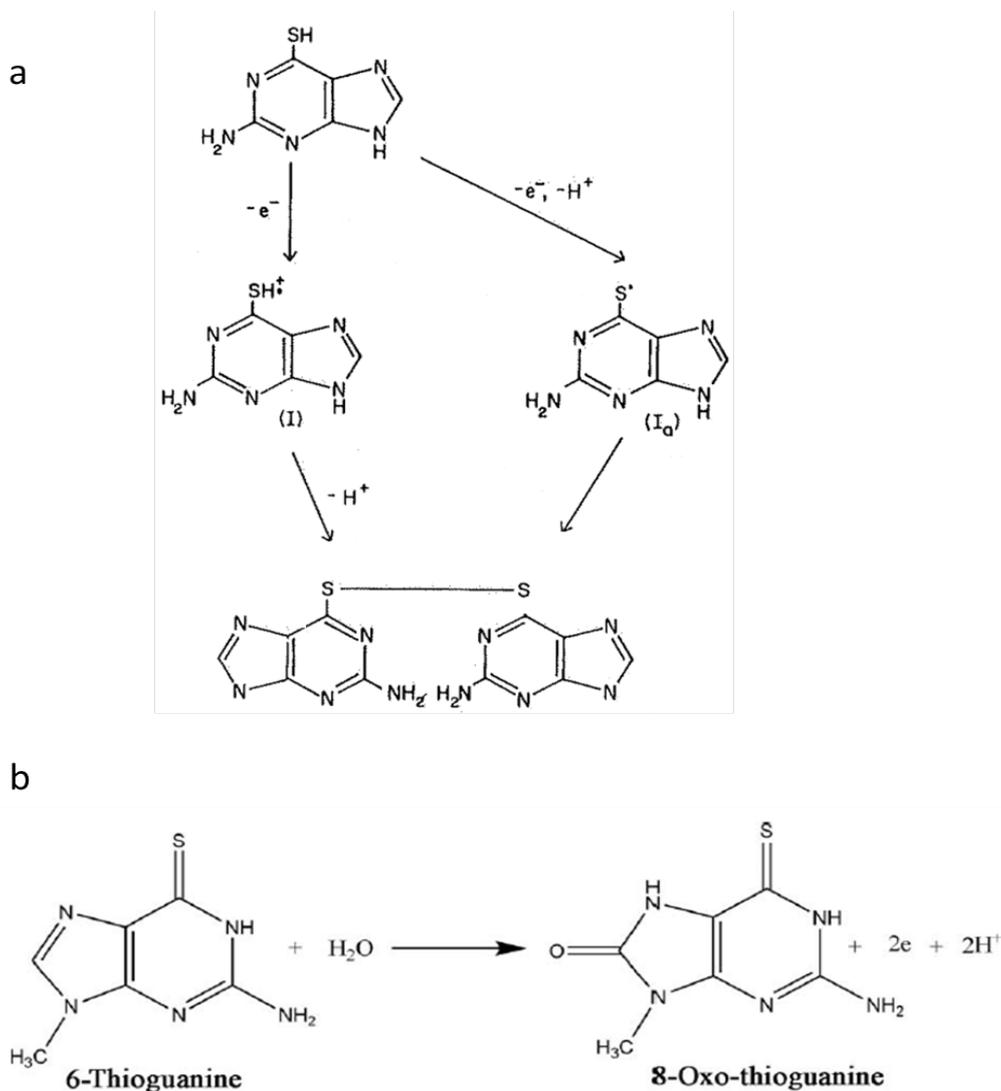


FIGURE 5.9 – Mécanismes d'oxydation de la 6-thioguanine. a) Oxydation à un électron du groupement thiol de la molécule et association de deux radicaux pour former un dimère via l'établissement d'un pont disulfure. b) Oxydation à deux électrons d'un hétérocycle de la molécule pour former le 8-oxo-thioguanine. Images originales de Kraske et al. [559] et de Ensafi et al. [561].

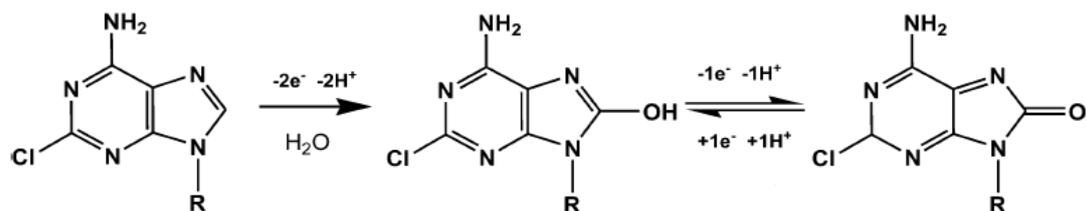


FIGURE 5.10 – Mécanisme d'oxydation de la cladribine. Image originale de Pontinha et al. [566].

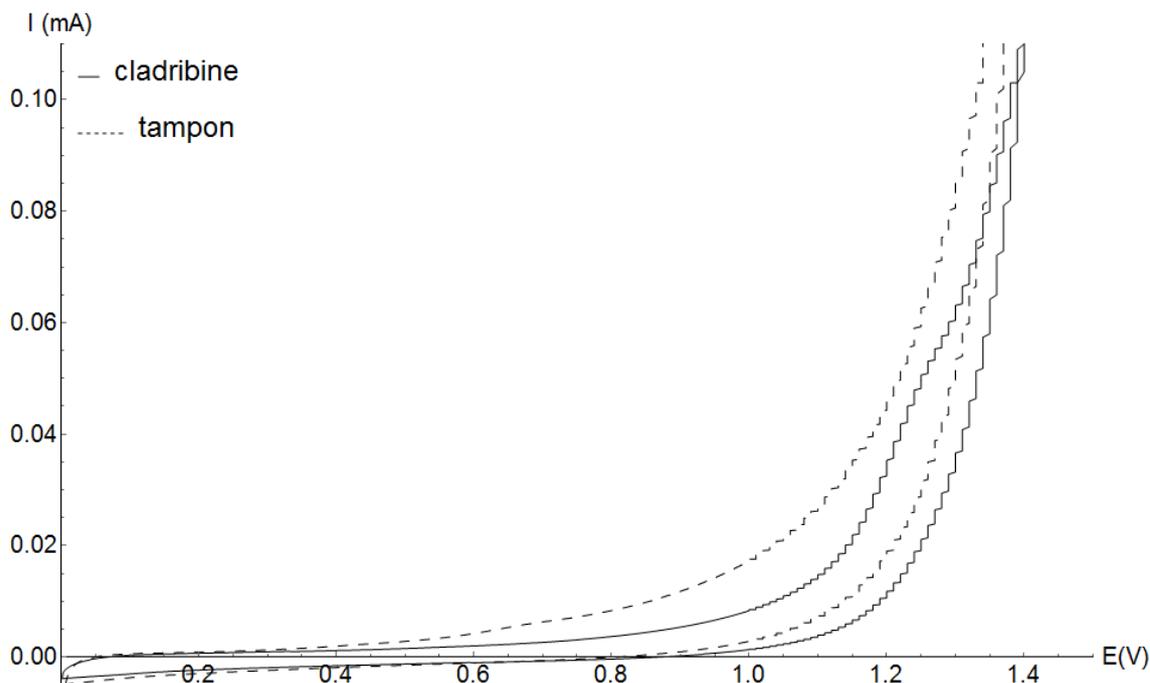


FIGURE 5.11 – Voltammogramme de la cladribine (1 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

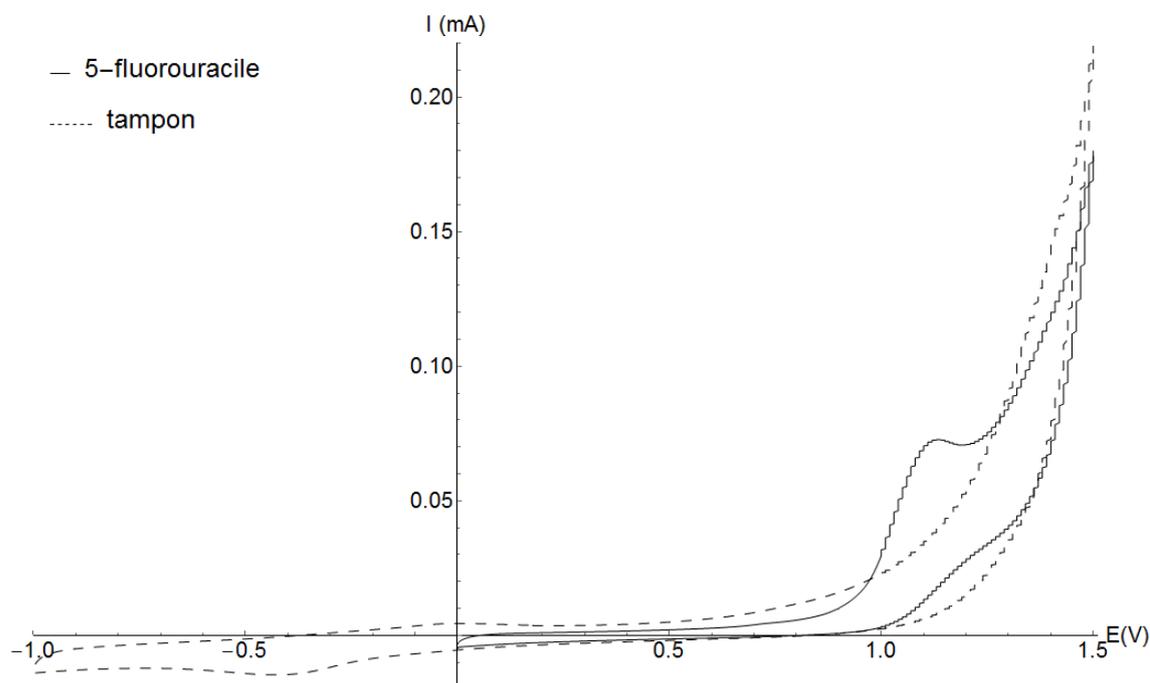


FIGURE 5.12 – Voltammogramme du 5-fluorouracile (10 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

Le voltammogramme du 5-fluorouracile (figure 5.12) montre un simple pic d'oxydation à 1,13 V. Aucun pic de réduction associé n'est observé. Par conséquent, l'électro-oxydation du

5-fluorouracile est irréversible. Un résultat comparable a été obtenu lors de différentes études voltammétriques [567, 568]. Le mécanisme d'oxydation à deux électrons de la molécule proposé par Bukkitgar et Shetti [567] est repris à la figure 5.13. Le potentiel redox du 5-fluorouracile est estimé à +1,02 V vs SCE, soit +1,26 V vs ESH (le potentiel de demi-pic).

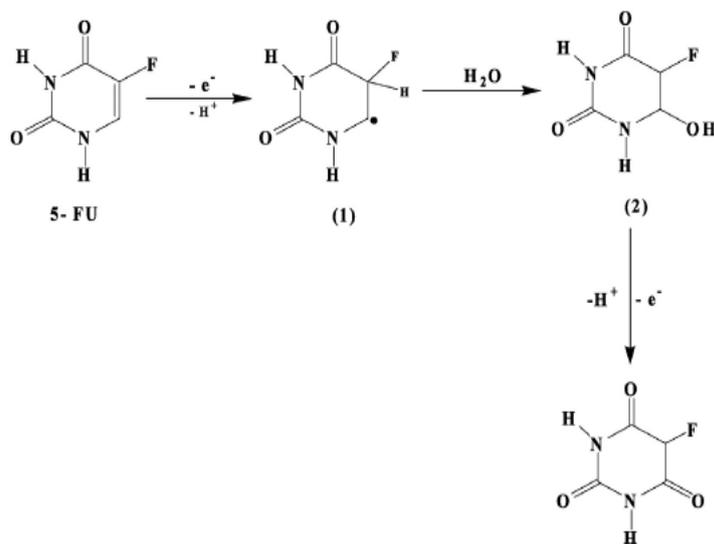


FIGURE 5.13 – Mécanisme d'oxydation du 5-fluorouracile. Image originale de Bukkitgar et al. [567].

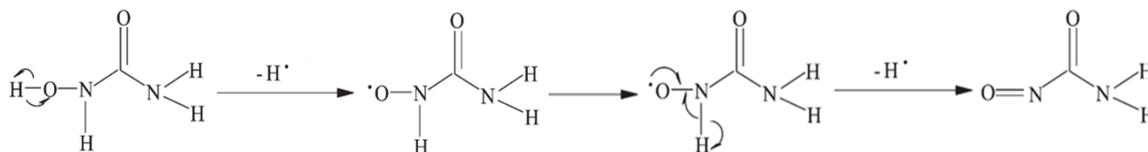


FIGURE 5.14 – Mécanisme d'oxydation de l'hydroxyurée via sa structure d'acide hydroxamique et formation du produit final, le nitrosoformamide. Image originale de Naik et al. [569].

La figure 5.15 illustre le voltammogramme de l'hydroxyurée. Un premier pic d'oxydation est observé à 228 mV. Il est suivi par un second à 750 mV. Aucun pic de réduction associé n'apparaît. Cela suggère que le processus d'oxydation de l'hydroxyurée est irréversible. Ce mécanisme de deux oxydations irréversibles successives a déjà été observé dans la littérature [569], bien que les valeurs des potentiels obtenues soient plus élevées pour un pH 8, proche de celui utilisé dans ce travail. Le mécanisme d'électro-oxydation proposé par Naik et al. [569] suggère deux processus successifs à un électron. L'hydroxyurée perdrait un électron et un proton conjointement, à deux reprises, pour donner un produit final, le nitrosoformamide (figure 5.14). Ce composé a également été détecté suite à l'oxydation de l'hydroxyurée par un système peroxydasique, tel que la peroxydase de raifort, confirmant ce mécanisme d'oxydation [441].

L'oxydation de l'hydroxyurée étant un processus irréversible, le potentiel d'oxydoréduction de la molécule a été estimé grâce au potentiel de demi-pic d'oxydation [169] : + 191 mV vs SCE, soit + 435 mV vs ESH.

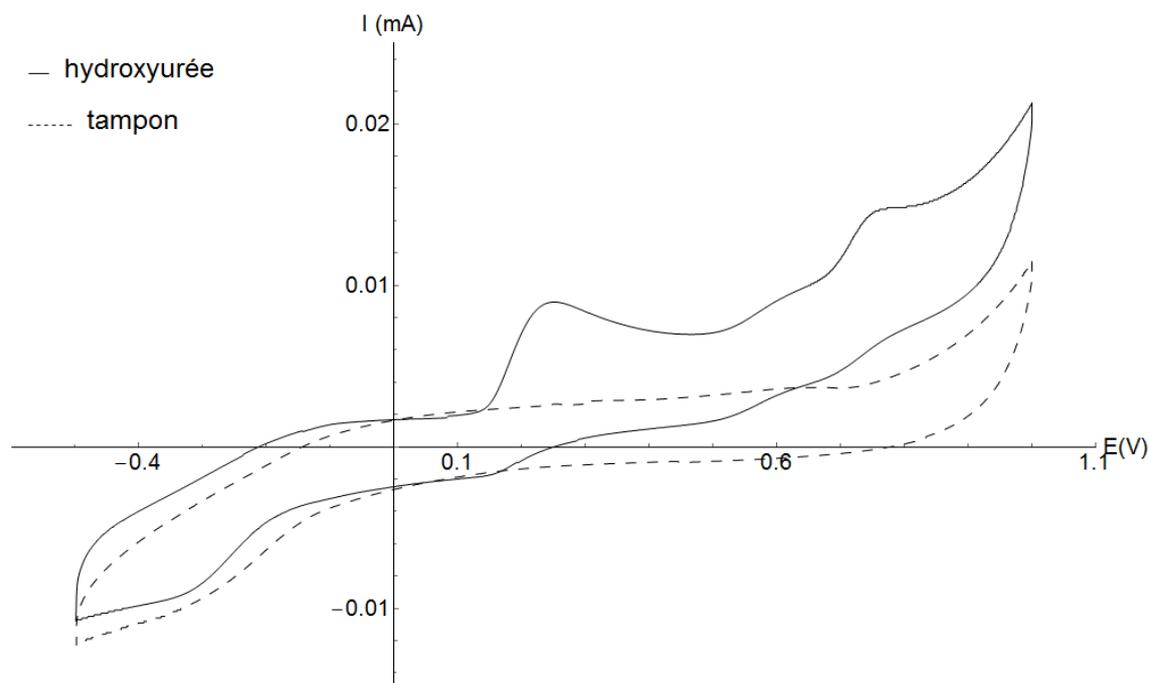


FIGURE 5.15 – Voltammogramme de l'hydroxyurée (1 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

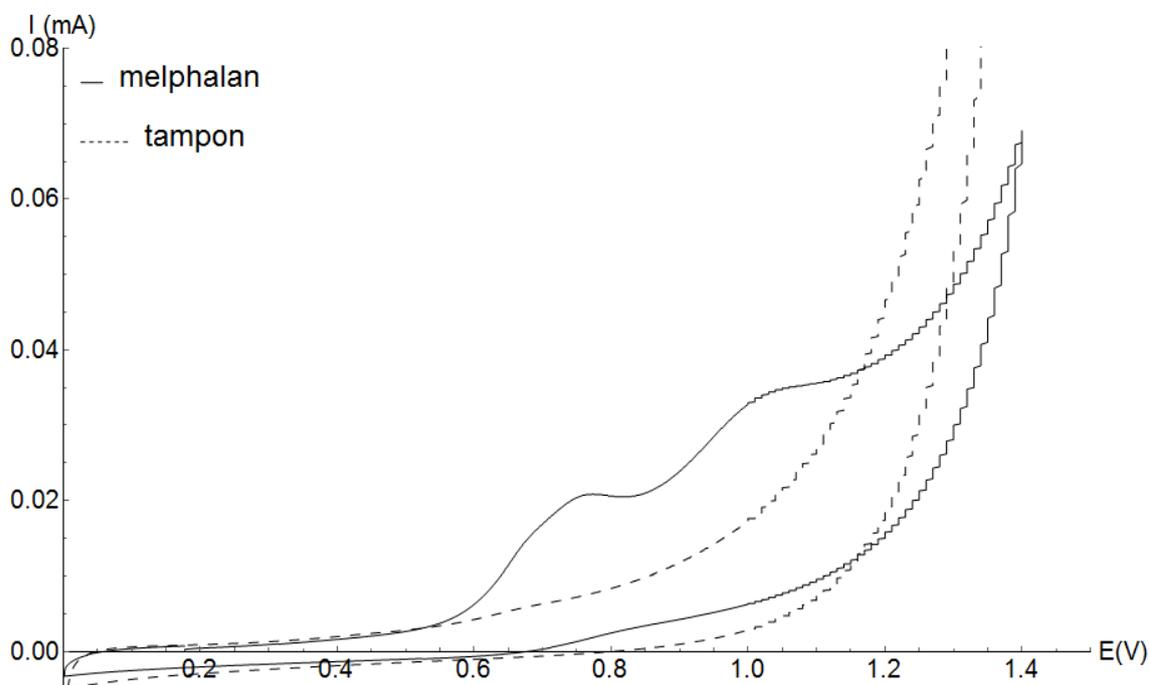


FIGURE 5.16 – Voltammogramme du melphalan (1 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

L'électro-oxdation du melphalan est un processus irréversible (figure 5.16). Le voltammogramme de la molécule montre deux pics d'oxydation sans pics de réduction associés à 774 mV et 1035 mV. Le potentiel de demi-pic du premier pic est de +669 mV vs SCE, soit +913

mV vs ESH, et représente une estimation du potentiel d'oxydoréduction de la molécule.

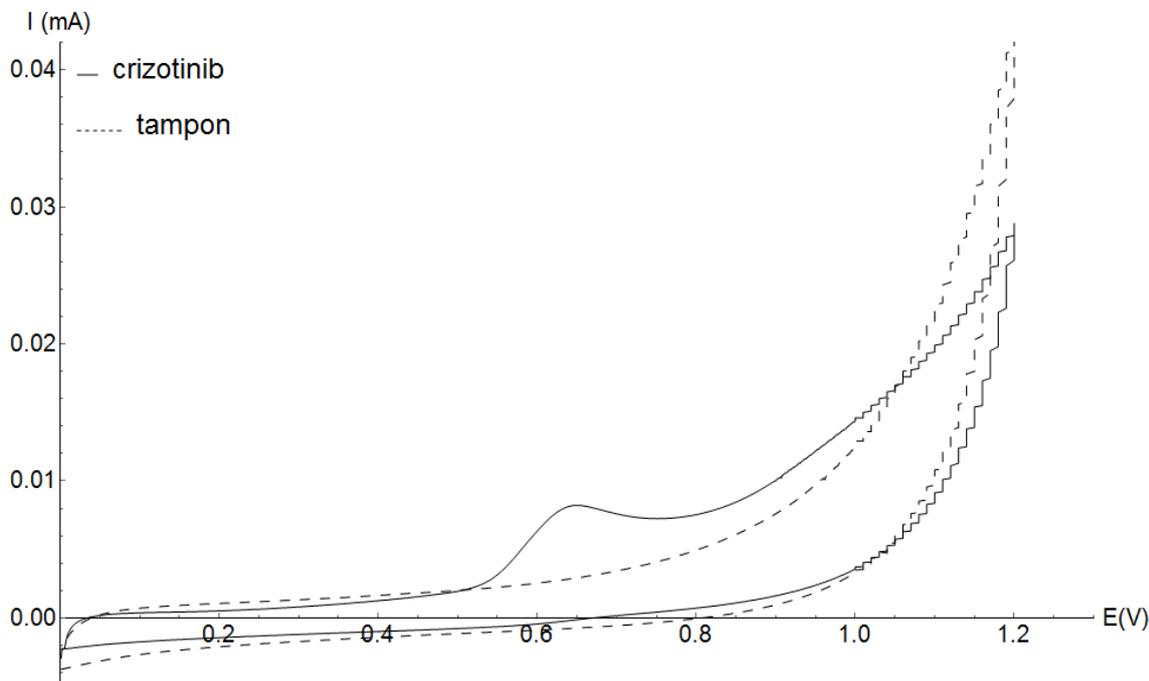


FIGURE 5.17 – Voltammogramme du crizotinib (200  $\mu\text{M}$ ) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMF)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

Barek et al. [570, 571] ont également étudié le melphalan grâce à la voltammétrie cyclique et ont aussi observé un processus d'oxydation irréversible. Cependant, un seul pic d'oxydation se distingue à 910 mV. Cette différence entre les voltammogrammes peut s'expliquer par la différence entre les milieux utilisés. En effet, Barek et al. ont étudié le melphalan dans de l'acide sulfurique 0,1 M (pH 1) [571]. La basification du milieu pour atteindre une valeur de 7,4 peut modifier le mécanisme d'électro-oxydation et le potentiel auquel il se produit. En effet, pour de nombreux composés chimiques, la basification du milieu provoque la diminution du potentiel d'oxydation [567, 569, 572, 295]. L'oxydation du melphalan est due à celle de la structure phénylalanine de la molécule, via un processus à deux électrons et deux protons [570]. Ermis et al. [573] ont établi que le potentiel d'oxydation de la phénylalanine diminue lorsque le pH du milieu augmente.

Le voltammogramme du crizotinib présente un pic d'oxydation à 650 mV (figure 5.17). Le processus d'électro-oxydation du crizotinib est irréversible. En effet, aucun pic de réduction n'est associé au pic d'oxydation. Par conséquent, le potentiel redox de la molécule est estimé par le potentiel de demi-pic à +581 mV vs SCE, soit +825 mV vs ESH. Aucune publication reprenant un voltammogramme du crizotinib n'a été trouvée. Une étude plus approfondie du comportement redox de la molécule peut être une perspective intéressante.

### 5.9.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS

L'action réductrice des six molécules anticancéreuses sur les cations radicalaires  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a été évaluée grâce à la spectroscopie d'absorption (voir section 2.1.2). L'absorbance de la solution  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a été mesurée immédiatement après l'ajout des molécules d'intérêt (figure 5.18). La mesure a ensuite été répétée après une incubation de 30 minutes dans le noir et à température ambiante (figure 5.19).

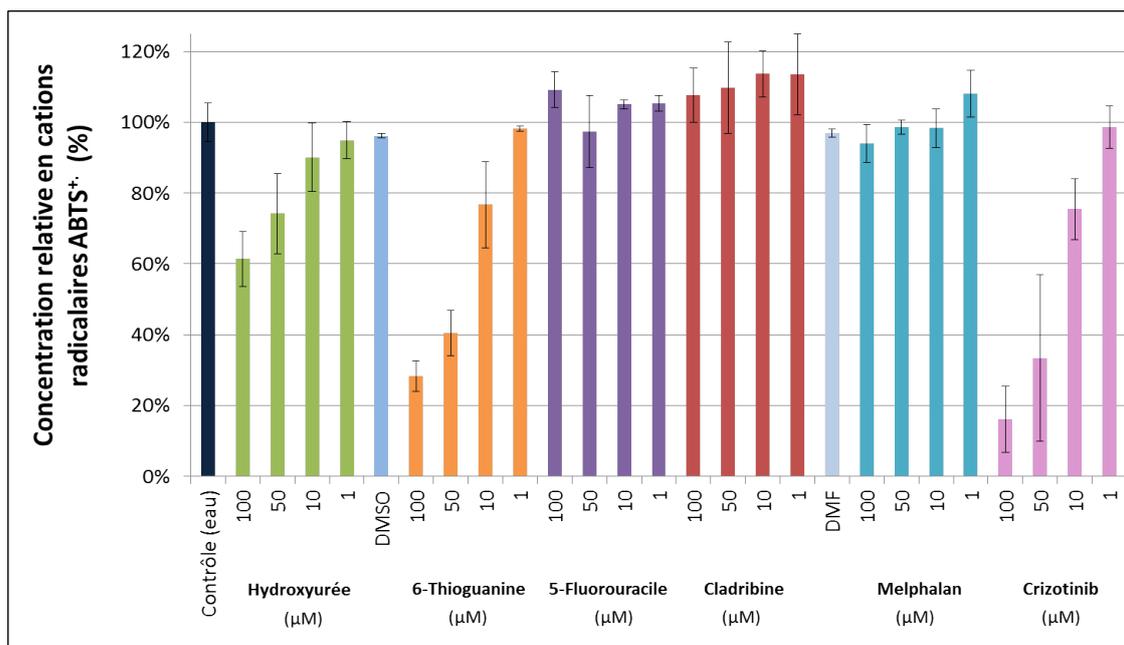


FIGURE 5.18 – Action réductrice de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur les radicaux  $ABTS^{+\cdot}$  en solution aqueuse. La mesure a été réalisée immédiatement après l’ajout de la solution d’ $ABTS^{+\cdot}$  dans les puits de la plaque d’analyse. Le pourcentage de l’activité de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2 et n=3).

La seule molécule soluble dans l’eau, l’hydroxyurée, induit directement une diminution de la concentration en radicaux de 39% à 100  $\mu M$  et de 26% à 50  $\mu M$ . Son action est négligeable à plus faible concentration. La quantité de radicaux réduits par l’hydroxyurée augmente considérablement dans le temps. Après 30 minutes, elle atteint 85% à 100  $\mu M$ , 69% à 50  $\mu M$  et 23% à 10  $\mu M$ . La comparaison du potentiel d’oxydoréduction de l’hydroxyurée et de l’ $ABTS$  permet de comprendre l’activité réductrice de la molécule. En effet, étant caractérisée par un potentiel redox (435 mV) inférieur à celui du couple  $ABTS^{+\cdot}/ABTS$  (698 mV), elle est capable d’agir comme substrat réducteur envers le radical  $ABTS^{+\cdot}$ .

L’hydroxyurée a déjà montré une activité antioxydante. Liu et al. [418] ont démontré la capacité dose-dépendante de la molécule à piéger des radicaux (DPPH). La structure d’acide hydroxamique de la molécule d’hydroxyurée est à l’origine de cette propriété antiradicalaire. D’autres dérivés de l’acide hydroxamique ont montré des propriétés antioxydantes comparables [574, 575, 576, 577]. Le groupement OH de l’acide hydroxamique permet de céder un électron aux espèces radicalaires (figure 5.14). Cependant, la structure de la molécule ne permet pas de stabiliser efficacement son état radicalaire par délocalisation de l’électron. Par conséquent, le radical formé étant instable, il peut à son tour oxyder une molécule dans son environnement dont l’ $ABTS$ , ce qui réduit le bilan de l’action de piégeage de l’hydroxyurée envers les radicaux  $ABTS^{+\cdot}$ .

La cinétique de réaction de l’hydroxyurée envers les radicaux  $ABTS^{+\cdot}$  semble plus lente que celle de la 6-thioguanine. En effet, directement après l’ajout de la molécule dans la solution de radicaux, la 6-thioguanine induit une diminution de la concentration en radicaux variant de 72 % à 100  $\mu M$  à 23% à 10  $\mu M$ . La quantité de radicaux réduits augmente légèrement dans le temps à 91% et 78%, pour les deux plus hautes concentrations 100  $\mu M$

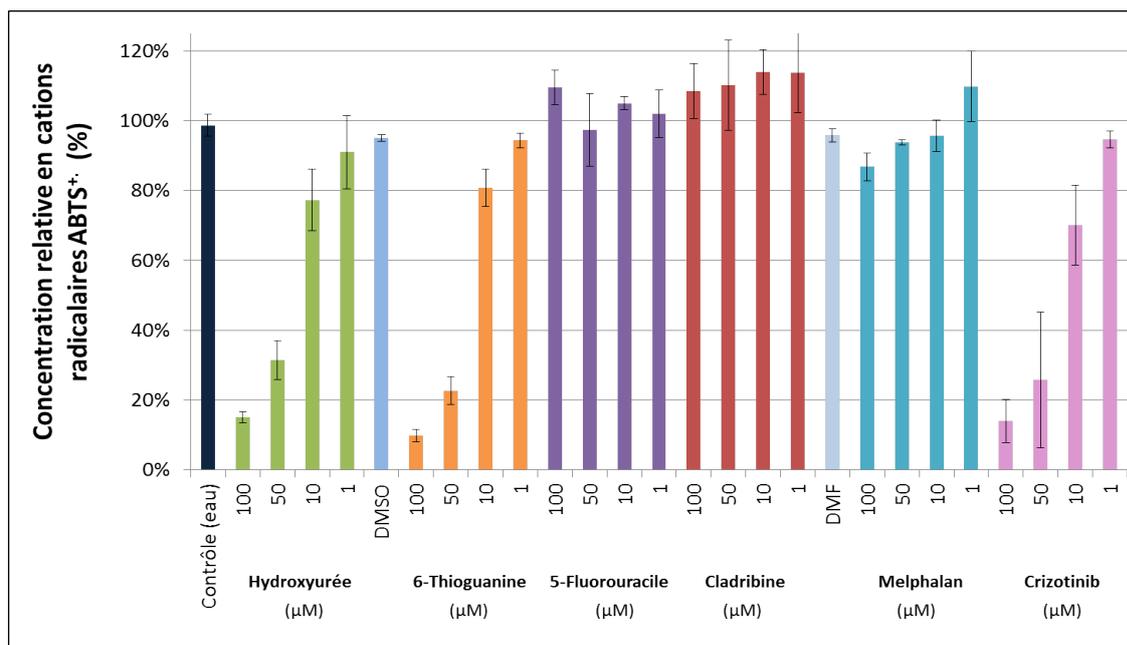


FIGURE 5.19 – Action réductrice de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur les radicaux ABTS<sup>•+</sup> en solution aqueuse. La mesure a été réalisée après une incubation de la plaque pendant trente minutes dans le noir suite à la première mesure. Le pourcentage de l’activité de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type (N=2 et n=3).

et 50  $\mu\text{M}$  respectivement. Ce résultat est en accord avec la valeur du potentiel redox de la molécule déterminé par voltammétrie cyclique. En effet, avec une valeur de 493 mV, il est inférieur à celui du couple ABTS<sup>•+</sup>/ABTS (698 mV). La 6-thioguanine peut donc agir comme agent réducteur vis-à-vis des radicaux ABTS<sup>•+</sup>. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Jelacic et al. [578] montrant la capacité de piégeage de la molécule vis-à-vis du DPPH. Dans les conditions expérimentales de ce travail, la 6-thioguanine piège plus efficacement les espèces radicalaires que l’hydroxyurée. Cela s’explique par la plus grande stabilité de l’état radicalaire de la 6-thioguanine par rapport à celui de l’hydroxyurée. En effet, dans le cas de la 6-thioguanine, l’électron non apparié situé sur l’atome de soufre suite à l’oxydation de la molécule peut se délocaliser dans la structure bicyclique et stabiliser le radical par effet mésomère.

Le crizotinib semble être le composé anticancéreux le plus efficace. Il présente une action de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> allant de 84% à 25% pour les concentrations de 100  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  respectivement. Comme pour les deux autres composés efficaces, l’action perdure dans le temps et augmente même légèrement pour la concentration de 10  $\mu\text{M}$ . En effet, après trente minutes, le piégeage de radicaux atteint 30% à cette concentration. L’action du crizotinib vis-à-vis d’espèces radicalaires n’a pas été étudiée précédemment. Aucune comparaison ne peut donc être réalisée avec les résultats de cette étude. Cependant, ceux-ci sont surprenants si on se réfère aux valeurs des potentiels d’oxydoréduction. En effet, l’étude voltammétrique donne un potentiel redox pour le crizotinib de +825 mV vs ESH. Ce potentiel étant supérieur à celui du couple ABTS<sup>•+</sup>/ABTS (698 mV), le crizotinib ne devrait pas agir comme réducteur de l’ABTS. Une étude électrochimique plus approfondie devrait être réalisée pour essayer d’expliquer ces résultats contradictoires.

Le 5-fluorouracile, la cladribine et le melphalan ne présentent pas d'action significative de piégeage sur le radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , même après une incubation de 30 minutes. Ces résultats sont en accord avec les valeurs de potentiel d'oxydoréduction déterminées dans ce travail. En effet, les trois molécules sont caractérisées par des potentiels largement supérieurs au potentiel redox du couple  $\text{ABTS}^{\bullet+}/\text{ABTS}$ . Par conséquent, les trois composés ne sont pas capables d'agir comme éléments réducteurs et ne peuvent pas piéger les radicaux  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

### 5.9.3 Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde

La spectroscopie RPE a permis d'obtenir une première évaluation de la capacité de piégeage des molécules anticancéreuses envers l'anion superoxyde. Le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase permet de produire l'anion superoxyde qui réagit ensuite avec le *spin trap* DMPO pour former un adduit de spin plus stable DMPO-OOH (voir section 2.1.3).

Trois molécules anticancéreuses, le 5-fluorouracile, le melphalan et la cladribine réagissent très faiblement avec l'anion superoxyde et n'entrent pas efficacement en compétition avec le DMPO (figures 5.22-5.24) pour réduire la formation de l'adduit DMPO-OOH. La 6-thioguanine présente un meilleur potentiel de piégeage de l'anion superoxyde (figure 5.21). Une diminution de 39% de l'intensité du signal RPE du DMPO-OOH est observée à  $100\mu\text{M}$  et de 32% à  $50\mu\text{M}$ . L'hydroxyurée et le crizotinib (figures 5.20 et 5.25) agissent également comme piègeurs de l'anion superoxyde. Une concentration de  $100\mu\text{M}$  induit une inhibition de la formation de l'adduit DMPO-OOH de 22% pour le crizotinib et de 17% pour l'hydroxyurée. Néanmoins, de manière générale, ces résultats indiquent que les six molécules anticancéreuses ne sont pas des piègeurs très efficaces de l'anion superoxyde. En effet, seuls deux composés, à une haute concentration ( $100\mu\text{M}$ ) arrivent à piéger moins de 40% des ROS produites par le système enzymatique. Aucune des molécules n'entre efficacement en compétition avec le piègeur de *spin* DMPO.

Lorsque la xanthine oxydase est utilisée en tant que producteur d'anions superoxydes, il faut également tenir compte d'une possible interaction entre les molécules testées et l'enzyme. Par exemple, dans l'organisme, elle intervient dans le métabolisme de la 6-thioguanine (voir section 5.4.2). La 6-thioguanine peut-elle donc entrer en compétition avec la xanthine en tant que substrat et de ce fait réduire la production d'anions superoxydes, indépendamment d'une quelconque action de piégeage ?

Afin de s'affranchir d'une éventuelle interférence du système enzymatique et ainsi obtenir plus d'informations quantitatives sur la capacité de piégeage des six molécules anticancéreuses, une seconde technique a été choisie (figure 5.26). L'anion superoxyde a été produit chimiquement par décomposition du  $\text{KO}_2$  et détecté avec une sonde chimiluminescente, le L-012. L'hydroxyurée, le 5-fluorouracile, le melphalan et la cladribine ne montrent pas d'action significative de réduction de l'anion superoxyde. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la spectroscopie RPE. La 6-thioguanine laisse apparaître une capacité de piégeage très efficace. Elle peut réduire la concentration de ROS de 90% ou plus pour des concentrations de  $10\mu\text{M}$  ou supérieures. Elle présente également une action de piégeage de 49% à la plus faible concentration testée,  $1\mu\text{M}$ . De façon similaire, le crizotinib piège plus de 78% de l'anion superoxyde en solution à partir de  $10\mu\text{M}$  ainsi que pour des concentrations supérieures. A la plus faible concentration ( $1\mu\text{M}$ ), une diminution de 44% de la concentration en anions superoxydes est observée.

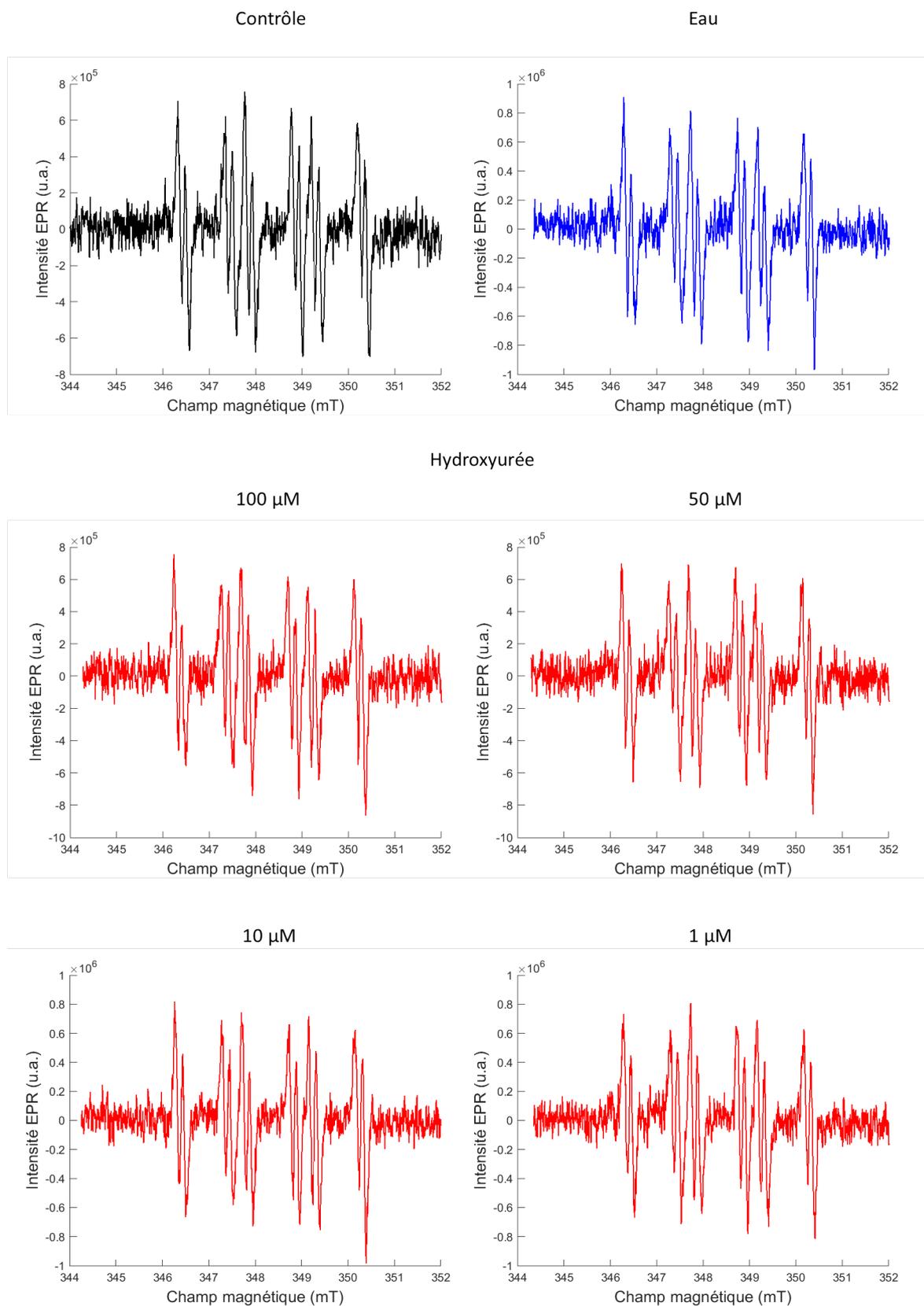


FIGURE 5.20 – Action de piégeage de l'hydroxyurée sur l'anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

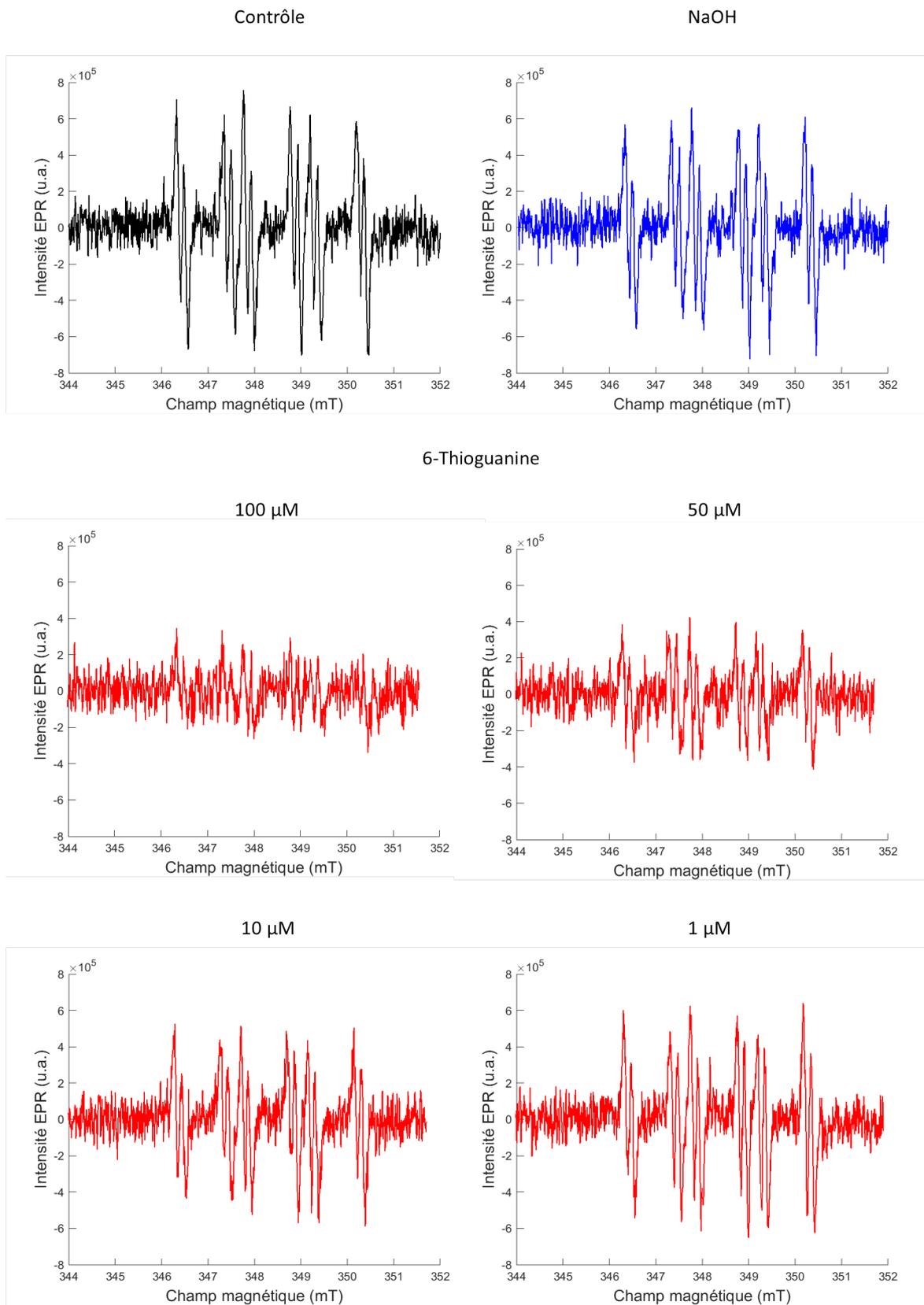


FIGURE 5.21 – Action de piégeage de la 6-thioguanine sur l’anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

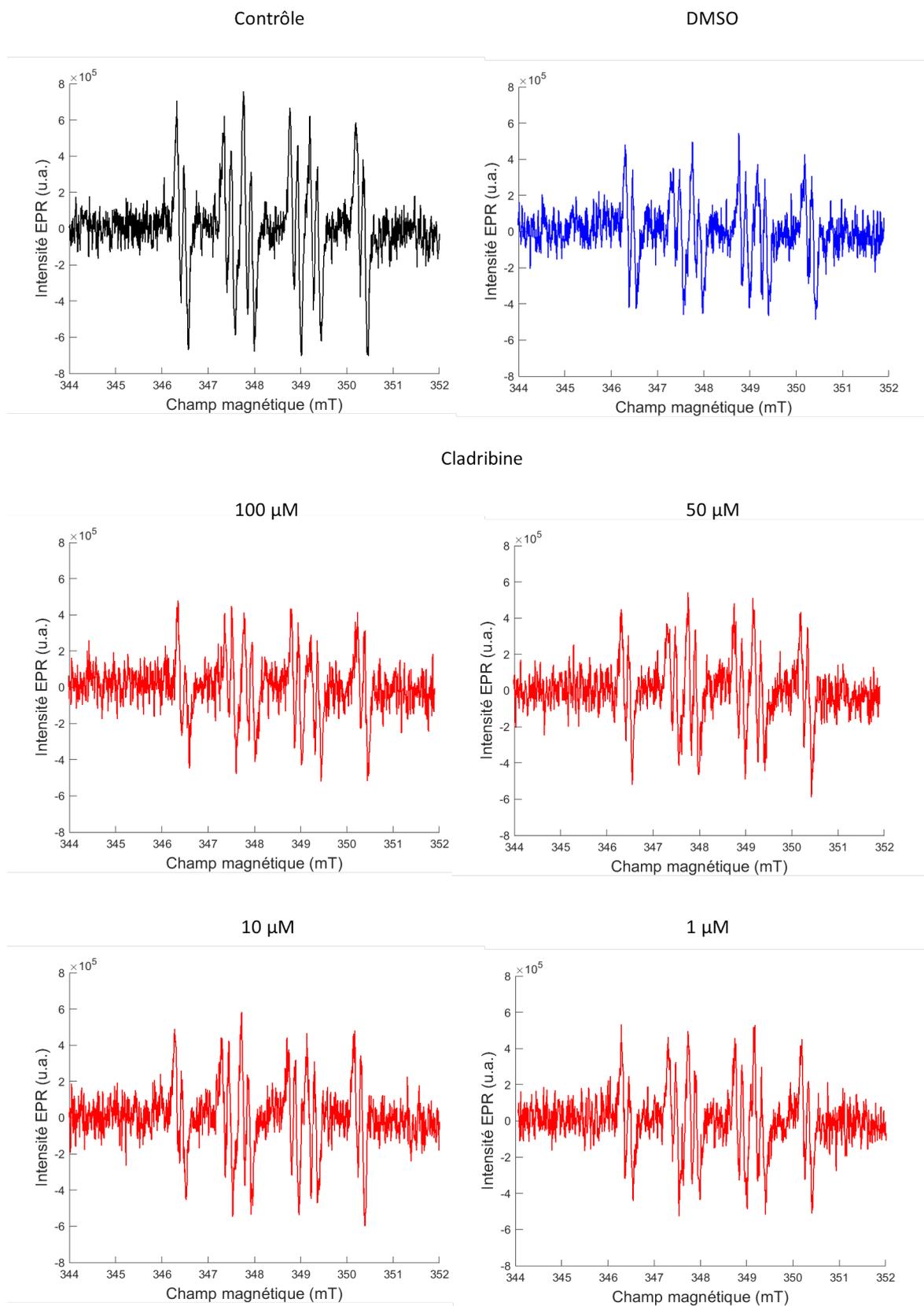


FIGURE 5.22 – Action de piégeage de la cladribine sur l’anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

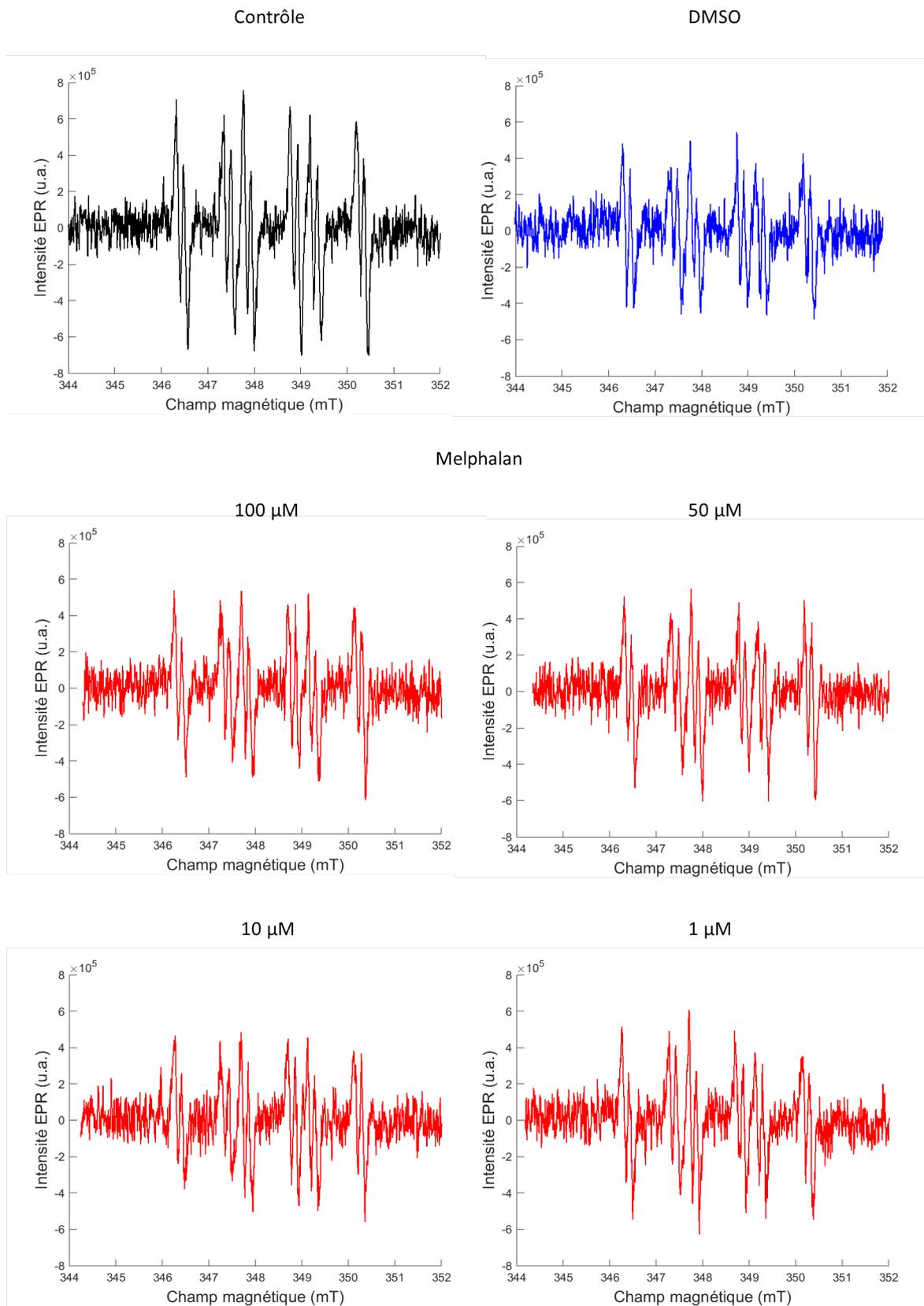


FIGURE 5.23 – Action de piégeage du melphalan sur l’anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

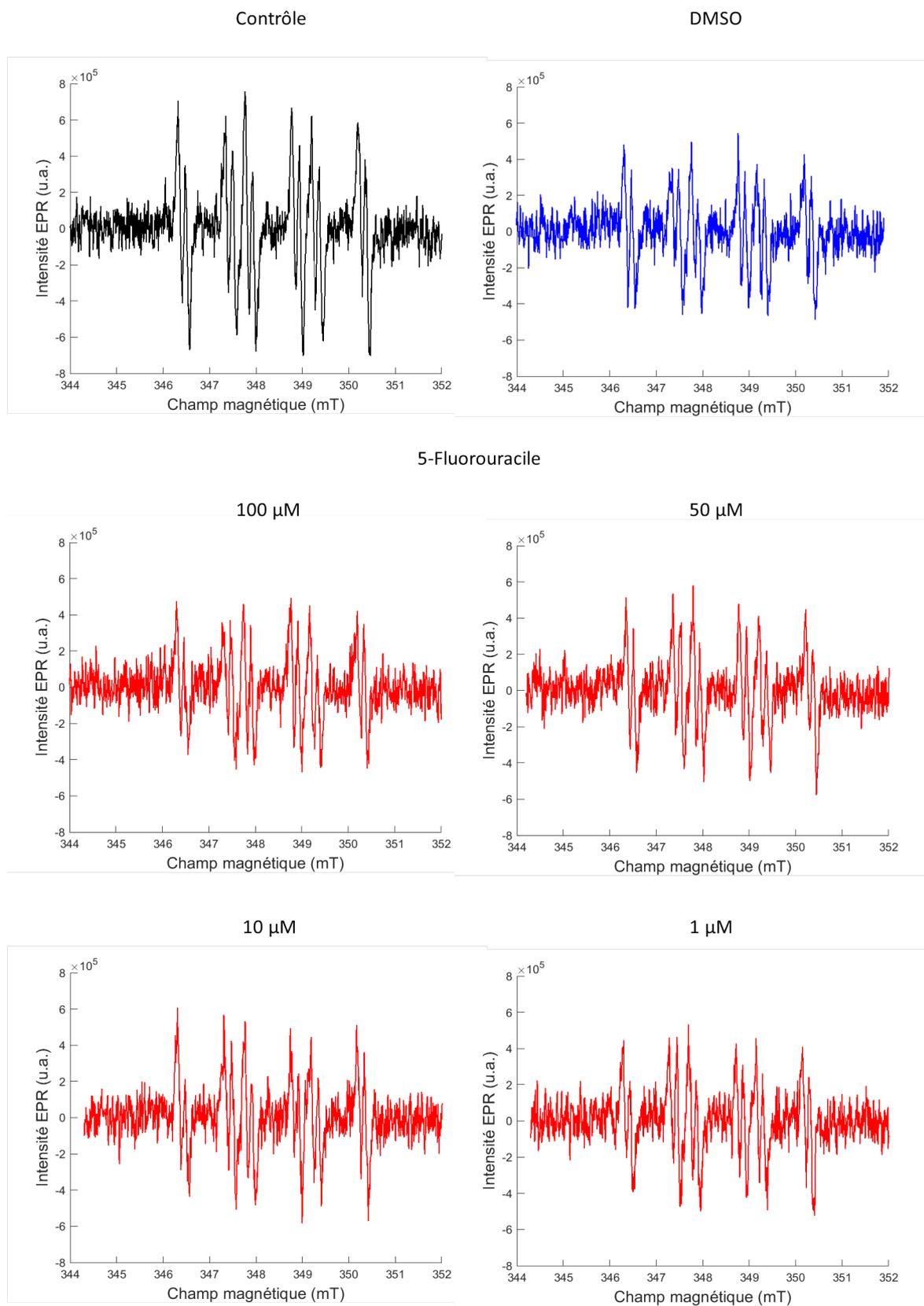


FIGURE 5.24 – Action de piégeage du 5-fluorouracile sur l'anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

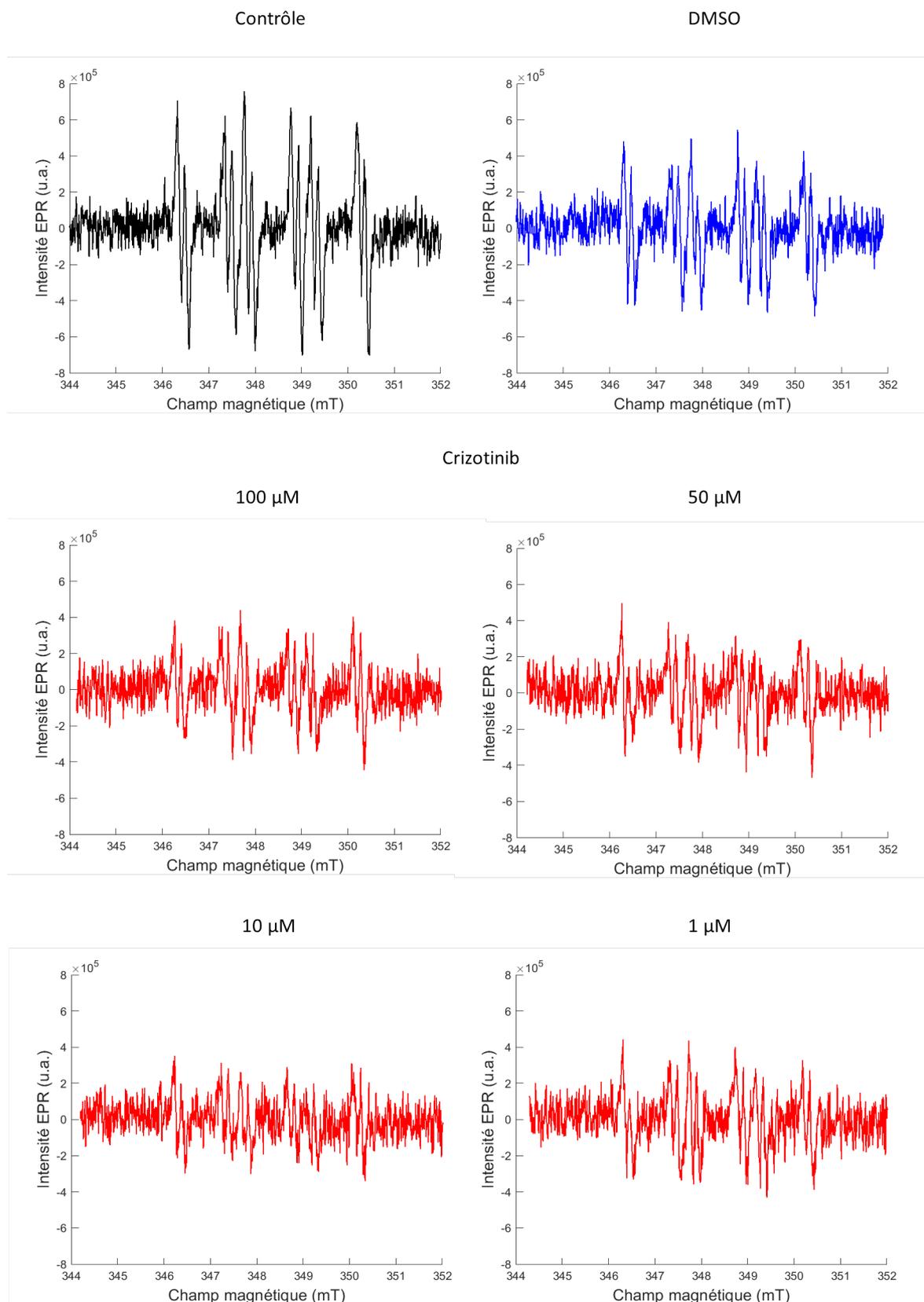


FIGURE 5.25 – Action de piégeage du crizotinib sur l’anion superoxyde, produit par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase.

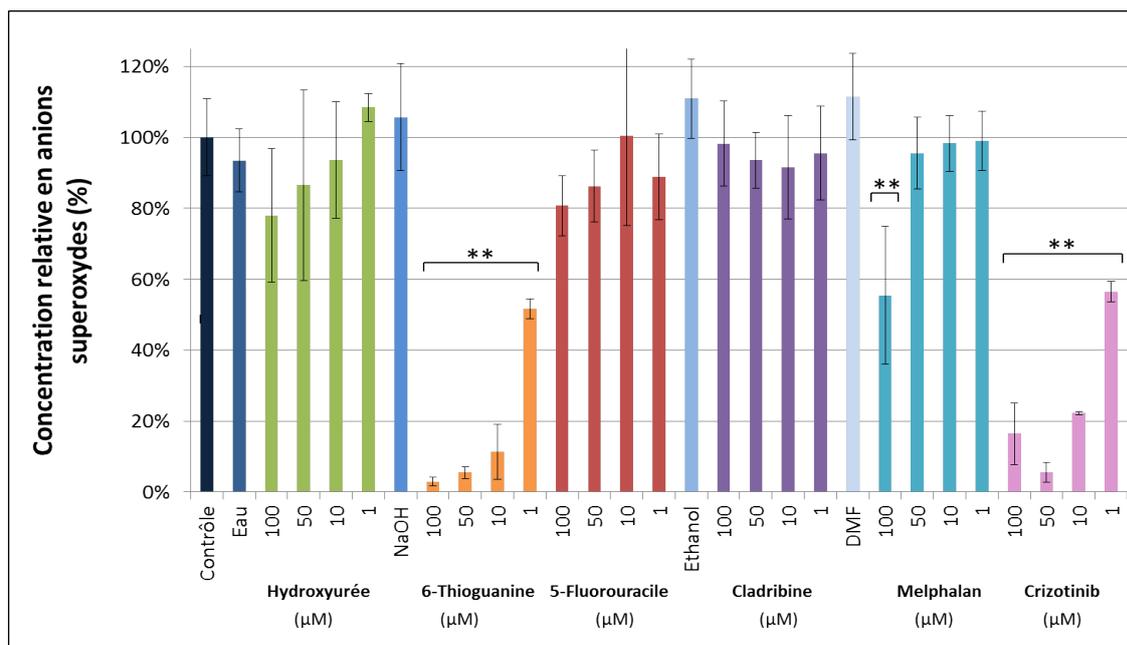


FIGURE 5.26 – Action de piégeage de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l’anion superoxyde, produit par la décomposition du  $\text{K}_2\text{O}_2$ . L’anion superoxyde réagit avec une sonde chimiluminescente le L-012. Le pourcentage de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  (sauf pour la cladribine  $N=2$ ) et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs :  $**P<0,01$  ou  $*P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau, NaOH, éthanol ou DMF).

Les résultats obtenus sont majoritairement en accord avec les valeurs de potentiel d’oxydo-réduction obtenus par voltammétrie. En effet, le melphalan, la cladribine et le 5-fluorouracile sont caractérisés par des potentiels supérieurs à celui du couple  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$  +0,89 V (pH 7) [352]. Par conséquent, les molécules ne peuvent pas céder un électron à l’anion superoxyde et le transformer en peroxyde d’hydrogène. Par contre, le crizotinib, la 6-thioguanine et l’hydroxyurée, en raison de leur potentiel redox, peuvent réduire l’anion superoxyde. De façon surprenante, l’hydroxyurée, qui est caractérisée par un potentiel d’oxydation proche de celui de la 6-thioguanine et inférieur à celui du crizotinib, voit son action réductrice très fortement réduite par rapport à celle des deux autres molécules. Comme c’est le cas pour les radicaux, la faible action de piégeage de l’hydroxyurée peut s’expliquer par la faible stabilité de son état radicalaire. La 6-thioguanine et le crizotinib peuvent quant à eux se stabiliser, une fois oxydés, grâce à la présence d’un ou de plusieurs cycles permettant l’entrée en résonance de l’électron non apparié.

#### 5.9.4 Etude de l’action de piégeage de ROS - Oxygène singulet

L’oxygène singulet fait partie des espèces réactives de l’oxygène produites par les mécanismes inflammatoires. Il est donc intéressant d’étudier la capacité d’interaction entre cette espèce et les molécules d’intérêt. Le piégeage de l’oxygène singulet par les molécules anticancéreuses a été évalué grâce à la spectroscopie d’absorption et le système rose Bengale-ADPA (voir section 2.1.4).

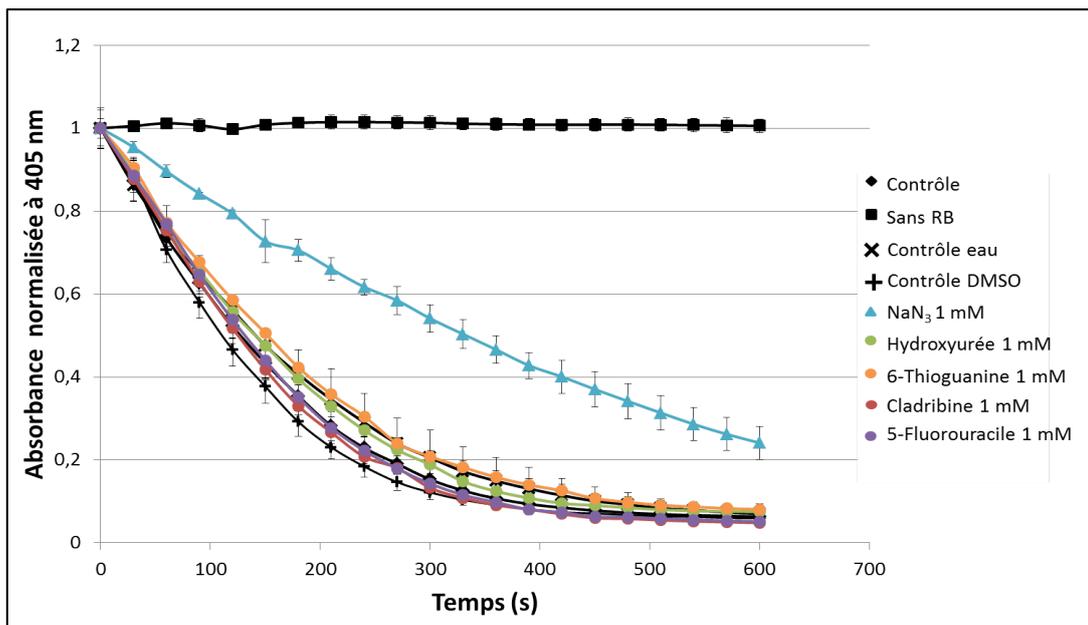


FIGURE 5.27 – Action de piégeage de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, de la cladribine et du 5-fluorouracile sur l’oxygène singulet, produit par l’irradiation du rose Bengale (RB). L’oxygène singulet réagit avec l’ADPA et provoque la diminution de l’absorbance de la molécule à 405 nm. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=1$  et  $n=3$ ).

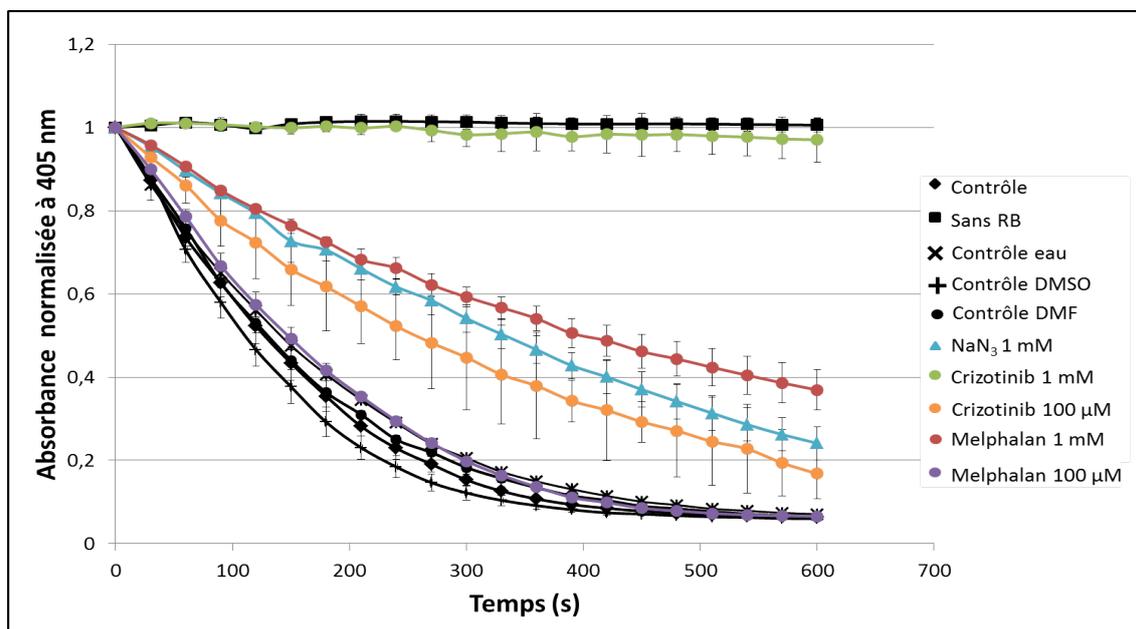


FIGURE 5.28 – Action de piégeage du crizotinib et du melphalan sur l’oxygène singulet, produit par l’irradiation du rose Bengale (RB). L’oxygène singulet réagit avec l’ADPA et provoque la diminution de l’absorbance de la molécule à 405 nm. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=2$  et  $n=3$ ).

En l’absence de piégeur, l’oxygène singulet provoque la dégradation de l’ADPA et donc la diminution de l’absorbance de la solution à 405 nm. Sans rose Bengale, il n’y a pas de production d’oxygène singulet et donc pas de décroissance de l’absorbance. Les trois solvants (eau, DMSO et DMF) n’impactent pas l’oxydation de l’ADPA. Les quatre molécules,

la 6-thioguanine, la cladribine, le 5-fluorouracile et l'hydroxyurée ne laissent pas apparaître d'action de piégeage significative supplémentaire par rapport à leurs solvants respectifs (figure 5.27). La 6-thioguanine est connue pour être photosensible aux UVA et produire l'oxygène singulet [579]. Dans notre étude, l'utilisation d'un filtre permet d'empêcher l'irradiation du milieu réactionnel et donc de la 6-thioguanine par des longueurs d'onde inférieures à 450 nm. Par conséquent, la 6-thioguanine ne peut produire l'oxygène singulet. L'étude de Zou et al. [579] a également montré que la molécule peut être oxydée par l'oxygène singulet et donner le guanine-6-sulfonate grâce à une suite de réactions. Ils ont également déterminé la constante de vitesse de réaction de l'oxygène singulet par la 6-thioguanine :  $4,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Au cours de notre étude, la molécule ne montre pas d'action de piégeage significative alors qu'elle devrait être compétitive par rapport à l'ADPA qui présente une constante de vitesse d'interaction avec l'oxygène singulet inférieure ( $8,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [174]). Actuellement, aucune explication n'a été trouvée.

Le crizotinib est la molécule la plus efficace en ce qui concerne le piégeage de l'oxygène singulet (figure 5.28). Une concentration de 1mM inhibe totalement l'oxydation de l'ADPA par l'oxygène singulet et sa dégradation en endoperoxyde. A même concentration, cette action est largement supérieure à celle de l'azide de sodium  $\text{NaN}_3$ , piègeur connu [245]. Par conséquent, la constante de vitesse d'interaction entre le crizotinib et l'oxygène singulet doit être supérieure à celle du  $\text{NaN}_3$  ( $5,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [247]). L'action du crizotinib diminue considérablement à  $100 \mu\text{M}$  mais reste néanmoins supérieure à celle du solvant DMSO. En effet, à cette concentration, après une durée de dix minutes, la molécule réduit la décroissance de l'absorbance de l'ADPA de 13%.

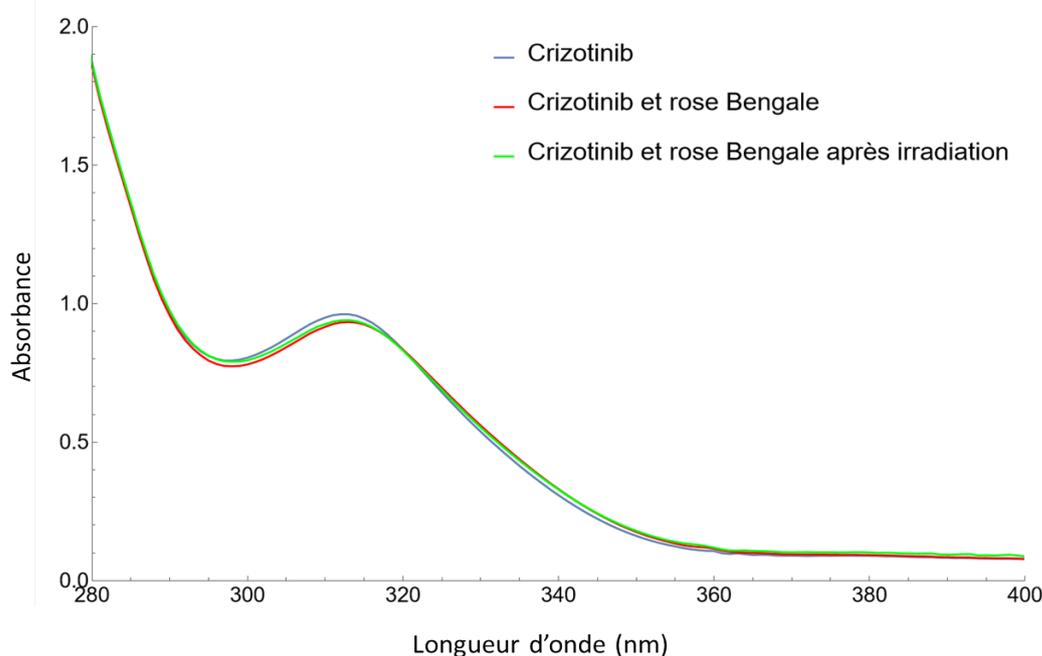


FIGURE 5.29 – Spectres d'absorption du crizotinib 1 mM dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe bleue), en présence de rose Bengale  $10 \mu\text{M}$  (courbe rouge), et après 10 minutes d'irradiation (courbe verte).

Le spectre d'absorption du crizotinib, préparé dans du tampon phosphate, est caractérisé par deux pics à 262 nm et à 312 nm. La figure 5.29 montre le pic à 312 nm, celui à 262 nm étant couvert par le pic d'absorption du solvant (DMSO) [580]. L'ajout du rose Bengale ne

modifie pas le spectre d'absorption de la molécule. Ensuite, l'irradiation de la solution pendant dix minutes n'induit aucune décroissance de l'absorbance de la solution, ce qui indique que l'interaction du crizotinib avec l'oxygène singulet ne modifie pas sa structure. Ce résultat montre que le crizotinib agit comme piègeur physique de l'oxygène singulet. L'interaction entre les deux molécules se produit via un transfert d'énergie entre l'état excité de l'oxygène singulet et la molécule de crizotinib, permettant à l'oxygène singulet de retourner à l'état fondamental triplet. Le crizotinib se retrouve alors dans un état excité, sans modification de sa nature chimique, et peut revenir à son état fondamental en libérant son excès d'énergie dans la solution sous forme de chaleur.

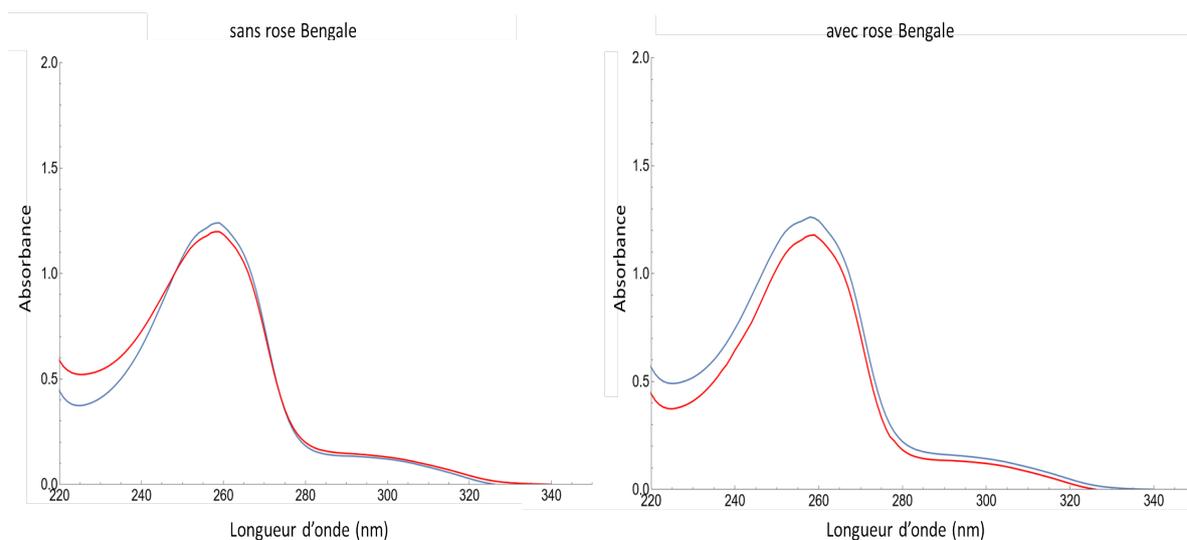


FIGURE 5.30 – Spectres d'absorption du melphalan dans du tampon phosphate pH 7,4 en présence ou non de rose Bengale  $10 \mu\text{M}$  (courbes bleues), et après 10 minutes d'irradiation (courbes rouges).

Le melphalan agit également comme piègeur de l'oxygène singulet. Après dix minutes, une concentration de 1 mM diminue d'environ 35% la décroissance de l'absorbance de la solution d'ADPA à 405 nm. Cependant,  $100 \mu\text{M}$  de la molécule ne montrent plus d'action significative. A 1mM, le melphalan est un piègeur plus efficace que le piègeur  $\text{NaN}_3$  à la même concentration. Par conséquent, la constante de vitesse de piégeage de l'oxygène singulet par le melphalan doit être supérieure à  $5,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [247]

Le spectre d'absorption du melphalan, préparé dans du tampon phosphate, est caractérisé par un pic d'absorption à 258 nm (figure 5.30) [581]. Après une irradiation de la solution de dix minutes, une légère diminution de l'amplitude de 4% peut être observée. L'ajout du rose Bengale ne modifie pas le maximum d'absorption de la solution. Par contre, l'irradiation de la solution provoque une faible décroissance de l'absorbance de l'ordre de 7%. Celle-ci ne paraît pas significative, par rapport au contrôle sans rose Bengale. Par conséquent, tout comme le crizotinib, il semble que le melphalan soit un piègeur physique de l'oxygène singulet, sa structure n'étant pas modifiée suite à son interaction avec l'espèce réactive de l'oxygène.

### 5.9.5 Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux

Lors du processus inflammatoire, l' $\text{HOCl}$  est une des espèces oxydantes les plus puissantes qui soient formées. Il est produit par le cycle de chloration de la myéloperoxydase. Si les molécules sont capables de piéger l' $\text{HOCl}$ , elles peuvent réduire l'activité oxydante de l'enzyme

(voir section 1.2.2.1). Afin de poursuivre l'étude du piégeage de ROS par les anticancéreux, leur faculté à agir sur l'acide hypochloreux a été étudiée grâce à la spectroscopie de fluorescence et, plus particulièrement, grâce à l'utilisation de la sonde APF (voir section 2.1.5).

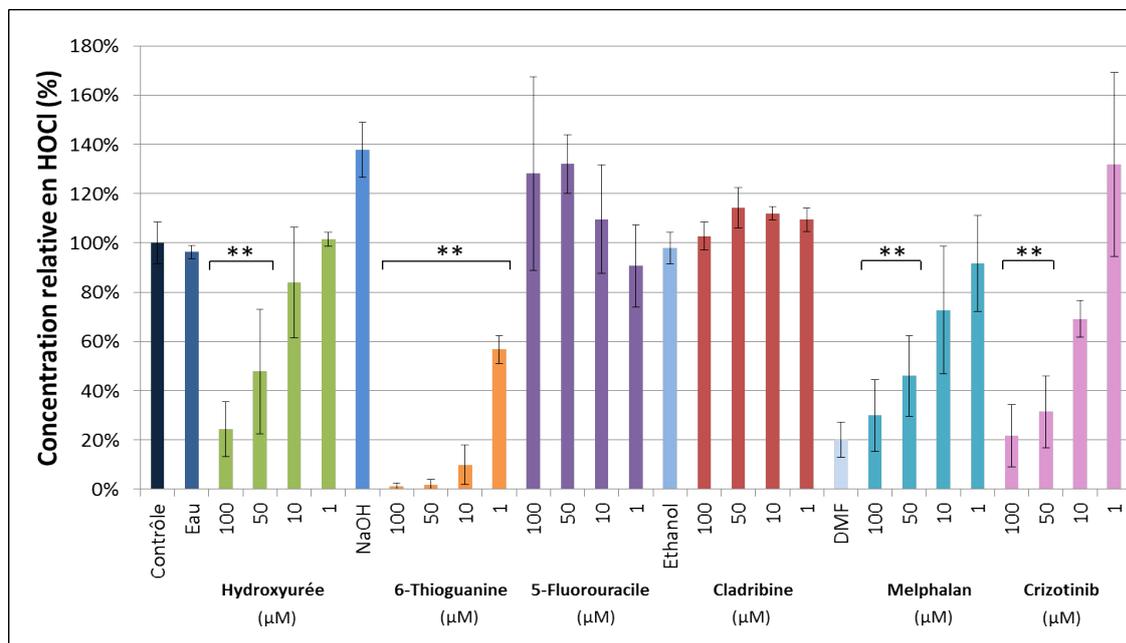


FIGURE 5.31 – Action de piégeage de l'hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l'acide hypochloreux, produit par le NaOCl. Le pourcentage de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=4$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs :  $**P<0,01$  ou  $*P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau, NaOH, éthanol ou DMF).

L'action des différents solvants varie fortement (figure 5.31). Le NaOH (20 mM) provoque une augmentation du signal de fluorescence de l'APF d'environ 40% par rapport au contrôle sans solvant. Cette augmentation doit être liée à la légère hausse du pH de la solution suite à l'ajout du NaOH. Un effet similaire a été observé avec une sonde semblable à l'APF, le FBS [320]. L'eau et l'éthanol quant à eux ne modifient pas significativement l'intensité du signal. En revanche, le DMF le réduit de l'ordre de 80%. Il a été montré que le DMF, tout comme le DMSO, agit comme piègeur du HOCl [582]. Malheureusement, le melphalan et le crizotinib ne sont solubles que dans le DMSO et le DMF. Le DMSO piège entièrement l'HOCl et interagit également avec la sonde fluorescente APF. Le DMF est un piègeur légèrement moins efficace et il ne piège pas le HOCl à pH plus acide (5,5). Il a donc malgré tout été utilisé, lorsqu'il n'y avait pas d'alternatives.

L'hydroxyurée, la 6-thioguanine, le melphalan et le crizotinib agissent comme piègeurs de l'acide hypochloreux (figure 5.31), la 6-thioguanine étant la molécule la plus efficace. En effet, elle réduit presque entièrement la concentration en HOCl par rapport à son contrôle solvant (NaOH) aux deux plus hautes concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$ . Dix  $\mu\text{M}$  de 6-thioguanine piègent encore 90% du HOCl et la plus faible concentration conserve tout de même une action significative de 44%.

L'hydroxyurée piège efficacement l'acide hypochloreux aux deux plus hautes concentrations testées, 50 et 100  $\mu\text{M}$ , avec une réduction de la concentration en HOCl de 53% et 76% respectivement. Bien que le DMF réduise fortement par lui-même la concentration en HOCl,

le melphalan et le crizotinib montrent une action de piégeage supplémentaire significative, aux deux plus fortes concentrations. En ce qui concerne le melphalan, on obtient une réduction de 74% à 100  $\mu\text{M}$  et 49% à 50  $\mu\text{M}$ . Le crizotinib réduit quant à lui la concentration en HOCl de 78% à 100  $\mu\text{M}$  et 69% à 50  $\mu\text{M}$ .

### 5.9.6 Bilan de l'action réductrice et antioxydante des molécules anticancéreuses

Le crizotinib et la 6-thioguanine présentent l'action antioxydante la plus complète. En effet, les deux molécules sont capables de réduire l'espèce radicalaire ABTS<sup>+</sup>. Elles agissent également en tant que piègeurs de deux types de ROS : l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux. Par conséquent, à une éventuelle interaction directe avec les PMNs et la MPO, s'ajoute une capacité de réduction de leur pouvoir oxydant en piégeant les différents ROS qu'ils peuvent produire. L'anion superoxyde est l'espèce précurseur d'autres ROS. En piégeant l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, les deux composés peuvent diminuer l'impact de la flambée respiratoire et notamment réduire la production de peroxyde d'hydrogène, le substrat naturel de la MPO. Le crizotinib et la 6-thioguanine peuvent également réduire la capacité oxydante d'une deuxième manière, en piégeant efficacement l'acide hypochloreux. Enfin, le crizotinib possède une action supplémentaire. En effet, il semble piéger efficacement l'oxygène singulet contrairement à la 6-thioguanine.

Deux autres molécules, l'hydroxyurée et le melphalan, peuvent également être considérées comme des piègeurs efficaces de l'acide hypochloreux et ont par conséquent la capacité de réduire l'action oxydante du cycle de chloration de la MPO. L'hydroxyurée est aussi capable de piéger des radicaux, avec une efficacité semblable à celle de la 6-thioguanine. Pour finir, le melphalan présente également une action de piégeage de l'oxygène singulet tout aussi forte que l'azide de sodium, piègeur connu du ROS, mais de façon moins efficace que le crizotinib.

## 5.10 Etude de l'action des anticancéreux sur l'activité oxydante des PMNs

### 5.10.1 Inhibition de la production d'anions superoxydes

Une des activités importantes des PMNs, au niveau du site inflammatoire, est la production de l'anion superoxyde, précurseur d'un ensemble de ROS, grâce au phénomène de flambée respiratoire (voir section 1.1.2). Celle-ci nécessite l'intervention d'un complexe enzymatique, la NADPH oxydase. Réduire la production d'anions superoxydes, en les piégeant et/ou en inhibant leur formation en agissant directement sur les PMNs et notamment sur la NADPH oxydase, est un moyen de diminuer l'activité oxydante de la MPO via l'inhibition de son substrat, le peroxyde d'hydrogène.

Au cours d'une première expérience (figure 5.32), les PMNs ont été incubés avec les molécules anticancéreuses pendant dix minutes puis activés avec du PMA, toujours en présence des molécules d'intérêt. La production de ROS a ensuite été évaluée par chimiluminescence avec la sonde L-012 (voir section 2.2.3). On remarque que c'est le crizotinib qui diminue le plus la libération d'anions superoxydes. La concentration de ROS est quasi nulle aux deux plus fortes concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$ . Une inhibition de 90% est conservée à 10  $\mu\text{M}$  et la molécule réduit toujours la quantité de ROS de plus de 60% à la plus faible concentration, 1  $\mu\text{M}$ , proche de la concentration plasmatique. La seconde molécule qui présente une action réductrice non négligeable, mais néanmoins moindre, est la 6-thioguanine. Elle réduit

la concentration en anions superoxydes d'environ 50% à 10  $\mu\text{M}$  et jusqu'à 70% à 100  $\mu\text{M}$ . L'hydroxyurée ne montre une action qu'à la plus forte concentration (25% à 100  $\mu\text{M}$ ).

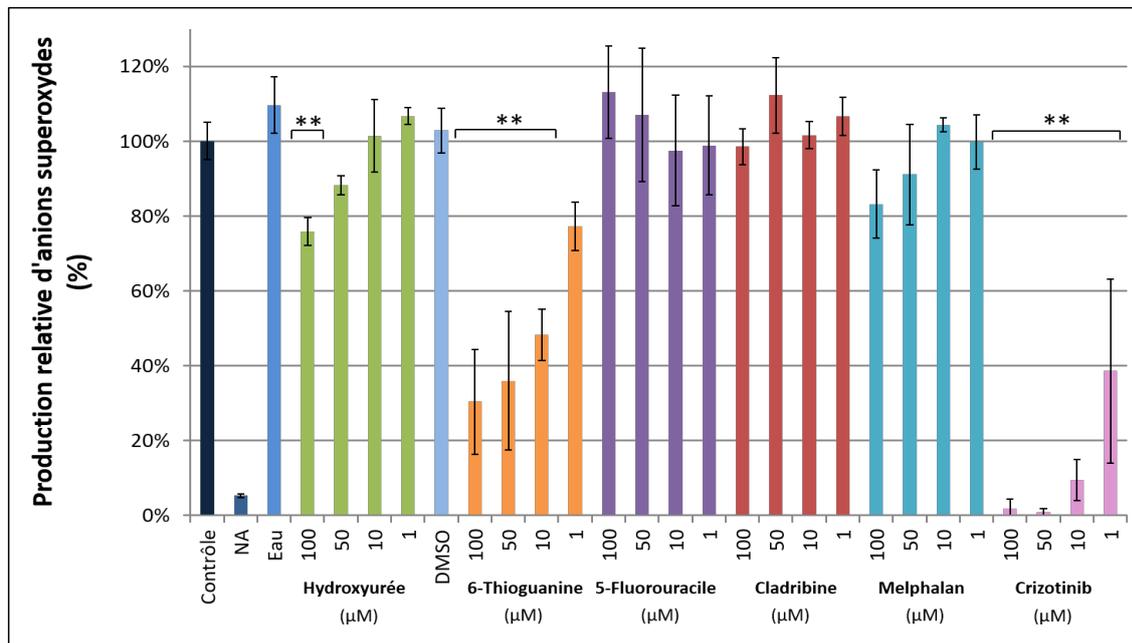


FIGURE 5.32 – Action de l'hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  (sauf cladribine  $N=2$ ) et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P<0,01$  ou \* $P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau, DMSO).

Le 5-fluorouracile, la cladribine et le melphalan ne laissent apparaître aucune action. Ces trois molécules sont incapables de piéger l'anion superoxyde (figure 5.26). On peut également conclure qu'elles ne sont pas en mesure d'inhiber le processus de production des ROS après un temps d'incubation de dix minutes. S'agissant de molécules anticancéreuses, dont la propriété est d'interagir avec l'ADN cellulaire, elles peuvent très probablement pénétrer les PMNs. Cependant, le temps d'incubation de dix minutes est peut-être trop court pour leur permettre de traverser la membrane plasmique ou alors les molécules n'impactent pas le complexe NADPH oxydase.

L'action de l'hydroxyurée à haute concentration peut être liée à la capacité de piégeage de l'anion superoxyde observée à cette concentration (figure 5.26). En ce qui concerne le crizotinib et la 6-thioguanine, ces deux composés sont des piégeurs efficaces de l'anion superoxyde. Par conséquent, la réduction de la concentration en ROS observée provient partiellement de cet effet de piégeage. Cependant, il est aussi possible que les deux molécules agissent également sur le mécanisme de production de l'anion superoxyde et donc que l'effet inhibiteur observé soit dû à l'association des deux phénomènes.

Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme d'action des trois molécules ayant montré une action lors de la première expérience, une seconde série de mesures a été réalisée (figure 5.33). Cette fois-ci, les PMNs ont été incubés pendant dix minutes avec les molécules anticancéreuses. Avant l'activation avec le PMA, les solutions ont été centrifugées afin de ne conserver que les cellules et d'éliminer le surnageant contenant les molécules d'intérêt n'ayant

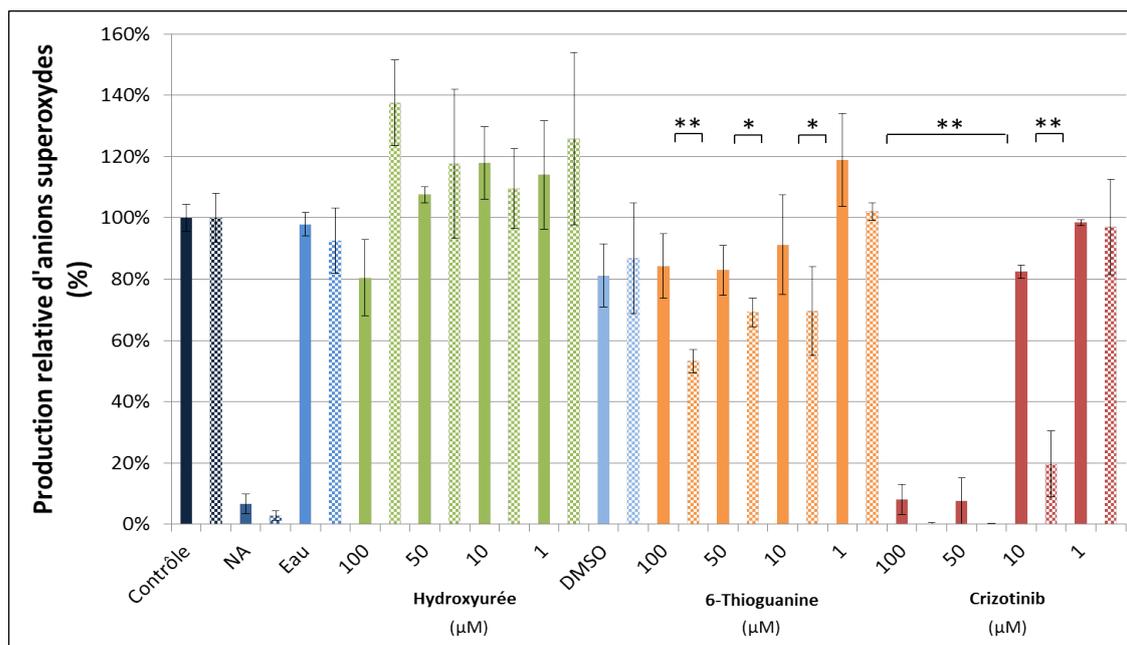


FIGURE 5.33 – Action de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine et du crizotinib sur la production d’anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Les molécules ont été éliminées du milieu avant la mesure, après 10 minutes d’incubation (couleurs pleines) ou après 1 heure d’incubation (couleurs quadrillées). Le pourcentage d’inhibition de la production d’anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau, DMSO).

pas pénétré la membrane, voire potentiellement atteint le cytoplasme, ou du moins qui n’ont pas interagi avec la membrane. L’influence du temps d’incubation a également été évaluée. En effet, les cellules ont été incubées en présence des molécules pendant respectivement dix minutes et une heure.

Lorsque les molécules sont éliminées, après une incubation de dix minutes, du milieu réactionnel avant l’activation des PMNs (figure 5.33 couleurs pleines), la 6-thioguanine et l’hydroxyurée perdent entièrement leur action inhibitrice de la production de ROS. Aucune diminution significative de la concentration en anions superoxydes n’est observée. Ce résultat montre donc, qu’après un temps d’incubation court, les deux molécules ne sont pas capables d’interagir et d’interférer avec le mécanisme de production de ROS par les cellules. Cela ne signifie pas que les deux composés ne peuvent pas pénétrer la membrane plasmique, voire même atteindre le cytoplasme des cellules. Cependant, elles ne perturbent pas l’action du complexe NADPH oxydase. L’effet observé lors de la première expérience (figure 5.32) est donc dû entièrement à leur capacité de piégeage de l’anion superoxyde.

Le crizotinib, quant à lui, conserve une inhibition très importante aux deux plus fortes concentrations de 50 et 100  $\mu$ M. La concentration en ROS est diminuée de 92% par rapport au contrôle DMSO. Par contre, l’action du crizotinib chute fortement pour atteindre 18%, à la concentration de 10  $\mu$ M. Lorsque le temps d’incubation précédant la phase de centrifugation passe à une heure, l’action du crizotinib augmente. En effet, aux deux plus fortes concentrations, aucune ROS n’est détectée par luminescence dans la solution. A 10  $\mu$ M, la production de ROS tombe à 20% par rapport au contrôle solvant. En plus de sa capacité de piégeage de

l'anion superoxyde, le crizotinib agit clairement comme inhibiteur efficace de la production de ROS par les PMNs activés avec du PMA. Une interaction avec le complexe NADPH oxydase est envisageable. Le crizotinib est capable de traverser la membrane plasmique et d'atteindre le cytoplasme des cellules où il joue le rôle d'inhibiteur de la tyrosine kinase. Une interaction avec les sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase peut donc être envisagée. La molécule peut potentiellement s'y lier, empêcher leur migration vers la membrane plasmique ou encore empêcher la liaison aux sous-unités membranaires de la fraction cytosolique. Une étude plus approfondie du mécanisme d'interaction est nécessaire pour le démontrer.

Cependant, il faut garder à l'esprit qu'une des propriétés des molécules anticancéreuses est leur capacité à provoquer la mort des cellules au sein desquelles elles pénètrent via différents mécanismes. Il faut donc considérer que l'inhibition de la production d'anions superoxydes peut aussi simplement être due à l'apoptose des PMNs. En effet, le crizotinib a déjà montré qu'il possède une action cytotoxique vis-à-vis des PMNs [557].

Dans le cas de l'hydroxyurée, l'augmentation du temps d'interaction entre la molécule et les cellules (figure 5.33 couleurs quadrillées) ne permet pas d'accroître son impact sur la production d'anions superoxydes. Ce résultat est donc en accord avec la première hypothèse établie : l'hydroxyurée n'agit pas sur le complexe NADPH oxydase et ne peut pas inhiber la production de ROS par des PMNs activés. En ce qui concerne la 6-thioguanine, l'action inhibitrice de la molécule augmente avec le temps d'incubation. A 100  $\mu\text{M}$ , la production de ROS chute à 53% mais augmente aux alentours de 70% aux deux concentrations inférieures de 10 et 50  $\mu\text{M}$ . Cela démontre que la molécule est capable de perturber le mécanisme de production de l'anion superoxyde, mais ce processus est relativement lent, en tout cas plus que pour le crizotinib. Ce phénomène peut être lié à la capacité d'insertion de la 6-thioguanine au sein des PMNs qui peut éventuellement être plus lente que pour le crizotinib. Une autre hypothèse envisageable est que la molécule doit être métabolisée au sein de la cellule pour être active. Par exemple, au sein de lymphocytes, la transformation de la molécule en ses dérivés nucléotides est nécessaire pour induire la mort de cellules (voir section 5.4.2). Il semble donc que sur des temps courts, la 6-thioguanine agit principalement comme piègeur de l'anion superoxyde alors qu'elle peut impacter la production du ROS elle-même lorsque la durée d'interaction est suffisamment importante. Cependant, comme pour le crizotinib, des études complémentaires sont nécessaires pour identifier le mécanisme d'action. Il faut également envisager l'induction d'une mortalité potentielle des PMNs, liée éventuellement à la métabolisation de la molécule.

### 5.10.2 Viabilité cellulaire

La 6-thioguanine et le crizotinib sont les seules molécules ayant un impact important sur la production d'anions superoxydes par les PMNs activés. Il est important de vérifier si l'action inhibitrice observée est indépendante d'une potentielle induction de la mortalité cellulaire. Pour cela, des PMNs ont été incubés pendant respectivement dix minutes et une heure avec deux concentrations (100  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$ ) des deux molécules utilisées lors des différents tests (5.34). La mortalité cellulaire a été évaluée grâce au test au bleu trypan (voir section 2.2.2).

La 6-thioguanine (100  $\mu\text{M}$ ) n'induit pas d'augmentation significative de la mortalité des PMNs par rapport au contrôle solvant, que ce soit après une incubation de dix minutes ou d'une heure. Par conséquent, on peut conclure que l'impact sur la production d'anions superoxydes par les PMNs n'est pas lié à la mort des cellules. La molécule peut donc interagir avec le processus de production de ROS, lorsque le temps d'interaction avec les cellules est suffisamment important. Une étude plus approfondie de ce mécanisme d'action représente une perspective intéressante.

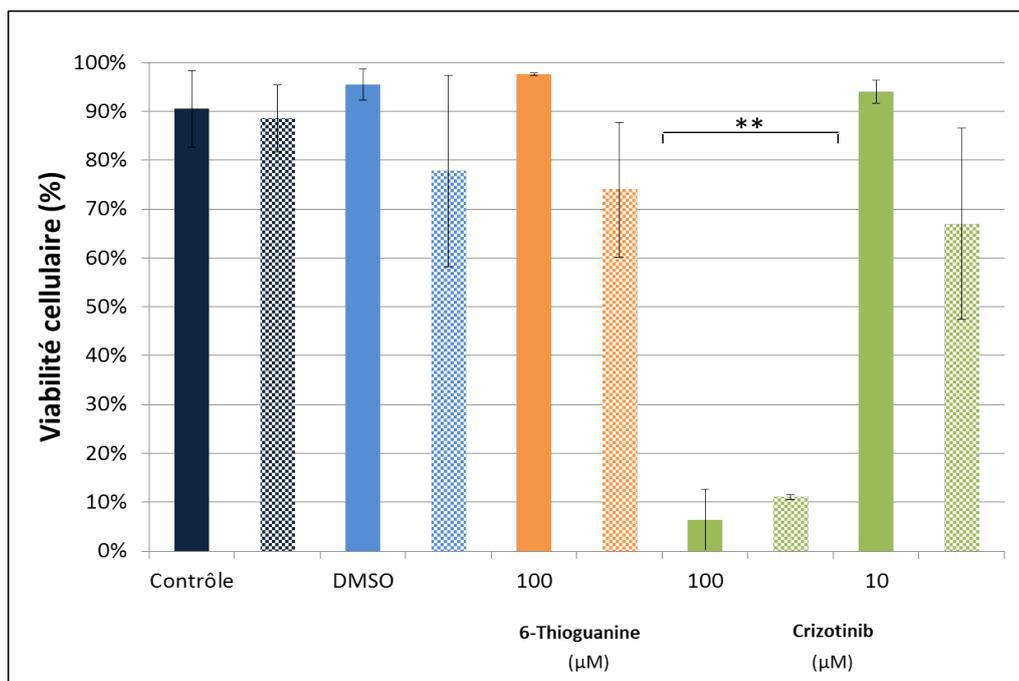


FIGURE 5.34 – Evaluation de la viabilité cellulaire de PMNs incubés en présence de 6-thioguanine et de crizotinib pendant dix minutes (couleur pleine) et une heure (couleur quadrillée). Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

Par contre, dans le cas du crizotinib, la molécule à 100  $\mu\text{M}$  provoque la mort d'environ 90% des cellules avec lesquelles elle est mise en contact, et ce, déjà après dix minutes. Une concentration dix fois plus faible ne montre quant à elle aucun effet significatif après une incubation de dix minutes. Au bout d'une heure, le crizotinib 10  $\mu\text{M}$  induit une augmentation de la mortalité d'environ 10% par rapport au DMSO. Mais cet accroissement n'est pas significatif.

La capacité du crizotinib à tuer les PMNs explique partiellement le résultat observé dans la section précédente (voir section 5.10). En effet, la mort des cellules provoque l'inhibition de la flambée respiratoire et donc de la production de ROS. Par contre, lorsque la concentration en molécules n'est pas assez importante pour être cytotoxique, c'est-à-dire de l'ordre de 10  $\mu\text{M}$ , la molécule peut tout de même impacter la production de ROS via un autre mécanisme, notamment en interagissant avec le complexe NADPH oxydase. Tout comme pour la 6-thioguanine, une étude plus approfondie reste nécessaire pour le confirmer.

### 5.10.3 Inhibition de la dégranulation

Un des rôles importants des PMNs, en plus de la production de ROS, est d'apporter sur le site inflammatoire différentes enzymes dont la myéloperoxydase. Un des moyens de moduler l'activité oxydante des PMNs est de réduire, voire d'inhiber, le processus de dégranulation, c'est-à-dire la libération de MPO dans le milieu extracellulaire. L'effet inhibiteur des molécules d'intérêt sur la dégranulation a été évalué grâce à un test ELISA (voir section 2.2.4)

Globalement, les molécules anticancéreuses testées ne provoquent aucune réduction importante de la quantité de MPO libérée (figure 5.35). Au contraire, la plus haute concentration en crizotinib, 100  $\mu\text{M}$ , provoque une augmentation significative de la libération de MPO par les cellules. Un accroissement de 45% de la concentration en enzyme est observée. Ce phénomène

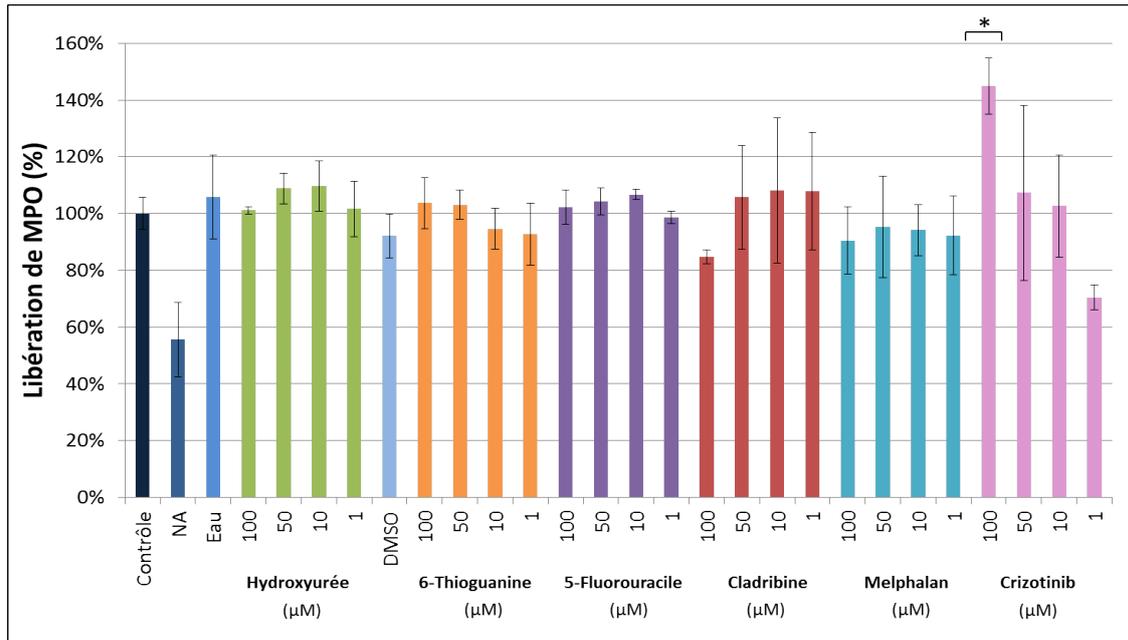


FIGURE 5.35 – Action de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur la libération de myéloperoxydase par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). La MPO libérée est détectée par un test ELISA. Le pourcentage de libération de MPO a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau, DMSO).

peut s’expliquer par le fort taux de mortalité des PMNs induit par la molécule à cette concentration. La dégradation des cellules provoque la libération, dans le milieu extracellulaire, de leur contenu cytoplasmique comprenant le contenu des différents granules cytosoliques.

#### 5.10.4 Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés

L’activation des PMNs par le couple cytochalasine B/fMLP provoque la libération d’une grande quantité de MPO par rapport aux cellules non activées (voir section 2.2.5). L’enzyme libérée est active et cette activité oxydante peut être mesurée via le test SIEFED (figure 5.36).

La cladribine et le 5-fluorouracile ne montrent pas d’action inhibitrice lors du test SIEFED. Cela ne prouve pas l’incapacité des deux molécules à interagir avec la MPO. En effet, les deux composés peuvent potentiellement s’insérer dans le site actif de l’enzyme et éventuellement y échanger des électrons avec les intermédiaires redox de l’enzyme. Cependant, le SIEFED montre que la cladribine et le 5-fluorouracile ne sont pas capables de former un complexe fort avec le site actif. S’il existe des liaisons entre les molécules et des acides aminés, elles ne sont pas assez fortes pour résister à l’étape de lavage. L’hydroxyurée ne montre une action d’inhibition significative de 27% qu’à la plus forte concentration de 100  $\mu$ M. Une quantité importante de molécules en solution est nécessaire pour permettre une liaison avec l’enzyme.

La 6-thioguanine inhibe 98% de l’activité peroxydasique à 100  $\mu$ M. La molécule conserve une inhibition de 84% à 50  $\mu$ M. Celle-ci baisse à 42 et 38% pour les concentrations de 10 et 1  $\mu$ M respectivement. Le melphalan présente une action plus faible mais tout de même significative. La molécule réduit l’activité de la MPO de 74% à 100  $\mu$ M. L’inhibition chute jusqu’à 18%

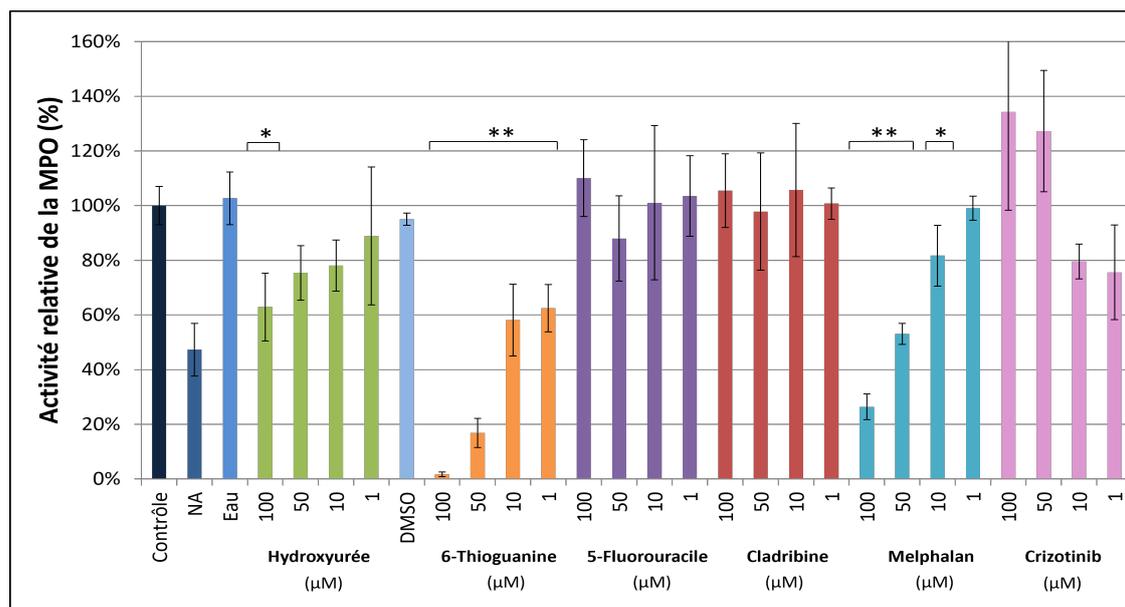


FIGURE 5.36 – Action de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l’activité de la myéloperoxydase libérée par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). L’activité de la MPO libérée a été évaluée par un test SIEFED. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau, DMSO).

à 10  $\mu\text{M}$ . Ces résultats indiquent clairement la capacité de la 6-thioguanine à interagir avec la MPO, à des concentrations plasmatiques (1-100  $\mu\text{M}$ ). La molécule semble pouvoir s’insérer au sein du site actif de l’enzyme et y former des liaisons capables de résister à l’étape de lavage. Quant au melphalan, pour être efficace, il nécessite l’utilisation de concentrations supérieures à celles détectées dans le sang de patient. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour comprendre entièrement le mécanisme d’interaction entre les deux molécules et la MPO.

Pour ce qui est du crizotinib, à hautes concentrations, l’activité oxydante de l’enzyme semble plus importante. Cette augmentation est clairement liée à celle de la libération de l’enzyme par les PMNs, induite par l’effet cytotoxique de la molécule. Cependant, l’augmentation de l’activité est légèrement plus faible et surtout plus variable que celle observée à la figure 5.35. Cet effet peut être dû à une possible action inhibitrice de la molécule. En effet, bien que le crizotinib augmente la libération de l’enzyme, les molécules restant en solution peuvent éventuellement interagir avec l’enzyme, pénétrer dans son site actif et former un complexe résistant au SIEFED. La capacité inhibitrice du crizotinib reste donc une option et doit être investiguée.

### 5.10.5 Bilan de l’action des molécules anticancéreuses sur les PMNs

A haute concentration, le crizotinib provoque la mort des PMNs. Cela induit une inhibition de la production de ROS par les cellules, via le blocage de la production d’anions superoxydes. Cependant, cette apoptose s’accompagne de la libération du contenu des granules cytosoliques dans le milieu extracellulaire. Différentes enzymes (dont la myéloperoxydase) sont libérées et peuvent déclencher leur activité oxydante. Néanmoins, cette dernière sera réduite car elle nécessite la présence de peroxyde d’hydrogène, dont la source, à savoir la production d’anions

superoxydes, est inhibée. A plus basse concentration, proche de celle détectée dans le sang de patient traité avec la molécule, celle-ci est capable de réduire la production d'anions superoxydes en interagissant avec le complexe NADPH oxydase.

Aucune des six molécules anticancéreuses testées n'inhibe le phénomène de dégranulation des PMNs activés. Cependant, deux composés, la 6-thioguanine et le melphalan, sont capables d'interagir avec l'enzyme elle-même. Ils semblent pouvoir s'insérer dans le site actif de l'enzyme pour y former des liaisons capables de résister à l'étape de lavage, caractéristique de l'expérience de SIEFED. Des mesures plus approfondies sont nécessaires pour comprendre plus exactement le mécanisme d'inhibition.

Pour terminer, la 6-thioguanine est capable de réduire la quantité d'anions superoxydes produits par des PMNs activés. Son mode d'action est principalement basé sur sa capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène. Si l'exposition des cellules à la 6-thioguanine est suffisamment longue, la molécule semble pouvoir impacter le mécanisme d'action en interagissant potentiellement avec le complexe NADPH oxydase. Dans ce cas aussi, des études complémentaires permettront d'obtenir des informations plus précises.

## 5.11 Etude de l'action des anticancéreux sur l'activité oxydante de la myéloperoxydase

Les premiers résultats obtenus grâce à l'étude de l'impact des molécules anticancéreuses sur le mécanisme de dégranulation des PMNs ont montré que certains composés peuvent interagir avec la MPO et inhiber son activité oxydante. Afin d'approfondir la compréhension de ce mécanisme d'inhibition, des études en fluorescence réalisées sur l'enzyme isolée ont été associées à la modélisation moléculaire (voir annexe E).

### 5.11.1 Modélisation moléculaire - Docking

Le *docking* de l'hydroxyurée dans le site actif de la MPO grâce au programme GOLD fournit une solution. Malgré la petite taille de la molécule d'hydroxyurée, le complexe avec l'enzyme ne la positionne pas au-dessus de l'hème (figure 5.37). Elle est décalée vers le canal d'accès au site actif et est placée entre les deux bras isopropyles de l'hème. Dans cette position, aucune interaction avec l'histidine 95 et le noyau de fer n'est possible. Cependant, trois ponts hydrogène peuvent se former. Un premier relie le groupement OH de la molécule au bras isopropyle attaché au cycle pyrrole C de l'hème. Ensuite, deux liaisons hydrogène sont possibles avec la sérine 149 et avec l'acide glutamique 102. La solution fournie par la modélisation montre que l'interaction entre l'hydroxyurée et la MPO est faible. En effet, l'interaction avec des acides aminés à la périphérie du site actif est moins probable en raison de leur plus grande mobilité. De plus, n'étant pas au-dessus de l'hème ou dans le canal d'accès, l'hydroxyurée a une plus faible capacité de blocage de l'accès au site actif pour d'autres substrats.

Le *docking* de la 6-thioguanine dans le site actif propose une solution unique (figure 5.38). La molécule est placée à l'entrée de la cavité, partiellement au-dessus de l'hème et parallèlement au plan de celui-ci. Le cycle à six carbones est positionné au-dessus du cycle pyrrole D de la porphyrine. Les deux cycles de la molécule peuvent former une interaction  $\pi$ - $\pi$  avec ce cycle pyrrole. Ce positionnement permet également la formation de trois ponts hydrogène. Une première liaison est possible avec l'arginine 239. La fonction  $\text{NH}_2$  est orientée vers le centre du site actif, ce qui permet un pont hydrogène avec l'histidine 95 et avec le noyau de fer au centre de l'hème.

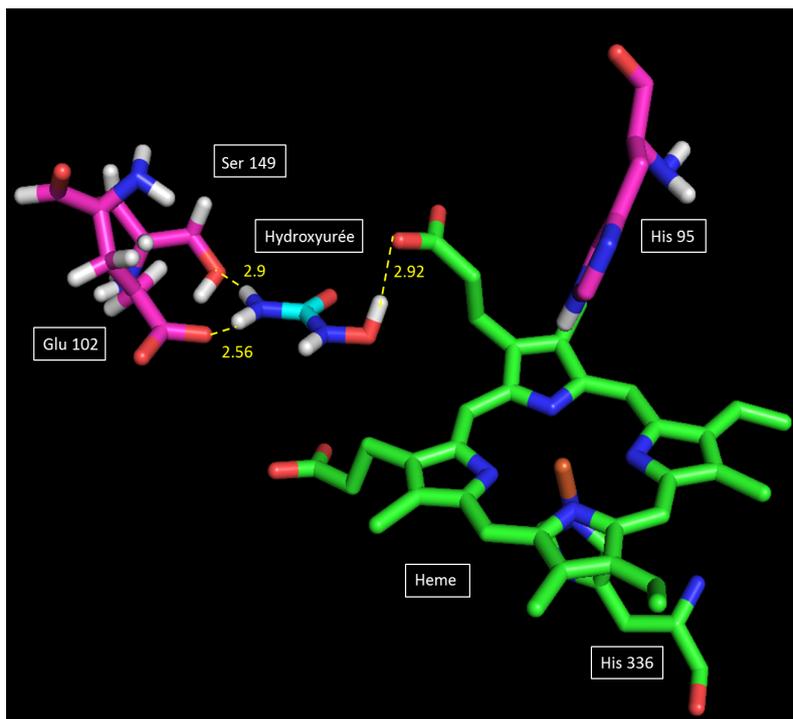


FIGURE 5.37 – Solution du complexe MPO-hydroxyurée obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström.

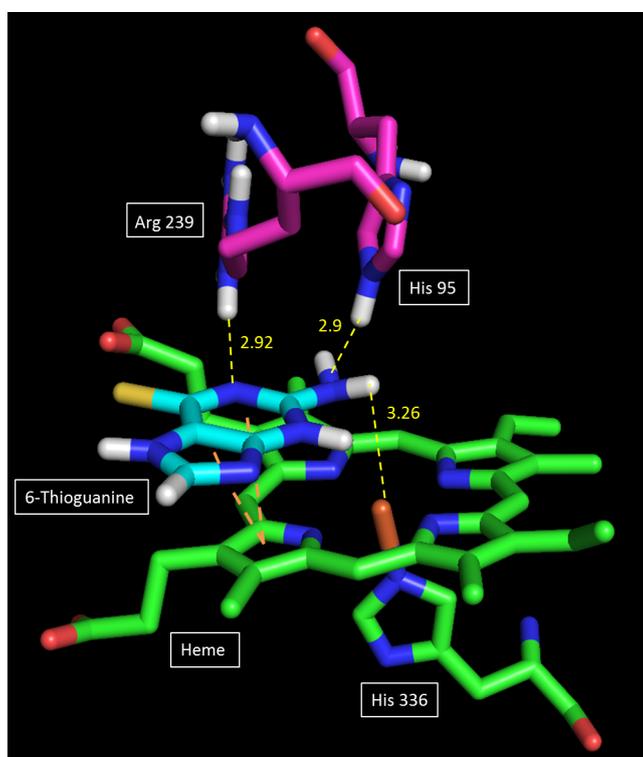


FIGURE 5.38 – Solution du complexe MPO-6-thioguanine obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

Pour l'étude de l'interaction du 5-fluorouracile avec la MPO, le programme GOLD propose deux solutions principales (figure 5.39). La plus fréquemment obtenue (54% d'occurrence) et donc la plus probable est représentée à la figure 5.39 A. Le 5-fluorouracile est positionné au-dessus du cycle pyrrole D de l'hème et le plan de la molécule est légèrement incliné par rapport au plan de l'hème. Un empilement  $\pi$ - $\pi$  est tout de même possible entre le cycle de la molécule et celui de l'hème. Ensuite, le doublet de l'atome d'azote de la molécule peut former un pont hydrogène avec l'histidine 95. Les deux atomes d'oxygène peuvent former chacun une liaison hydrogène, une avec l'arginine 239 et l'autre avec la glutamine 91.

La seconde solution, moins fréquemment obtenue (35% d'occurrence) et donc moins probable, est illustrée sur la figure 5.39 B. La molécule est placée un peu plus profondément dans la cavité, au-dessus de la porphyrine. Elle est inclinée par rapport au plan de l'hème. Dans cette disposition, aucune interaction  $\pi$ - $\pi$  entre la molécule et un cycle pyrrole de l'hème n'est possible. Par contre, un atome d'azote peut former un pont hydrogène avec l'atome d'azote du cycle pyrrole A. Un second pont hydrogène est possible entre un atome d'oxygène du 5-fluorouracile et de l'arginine 239.

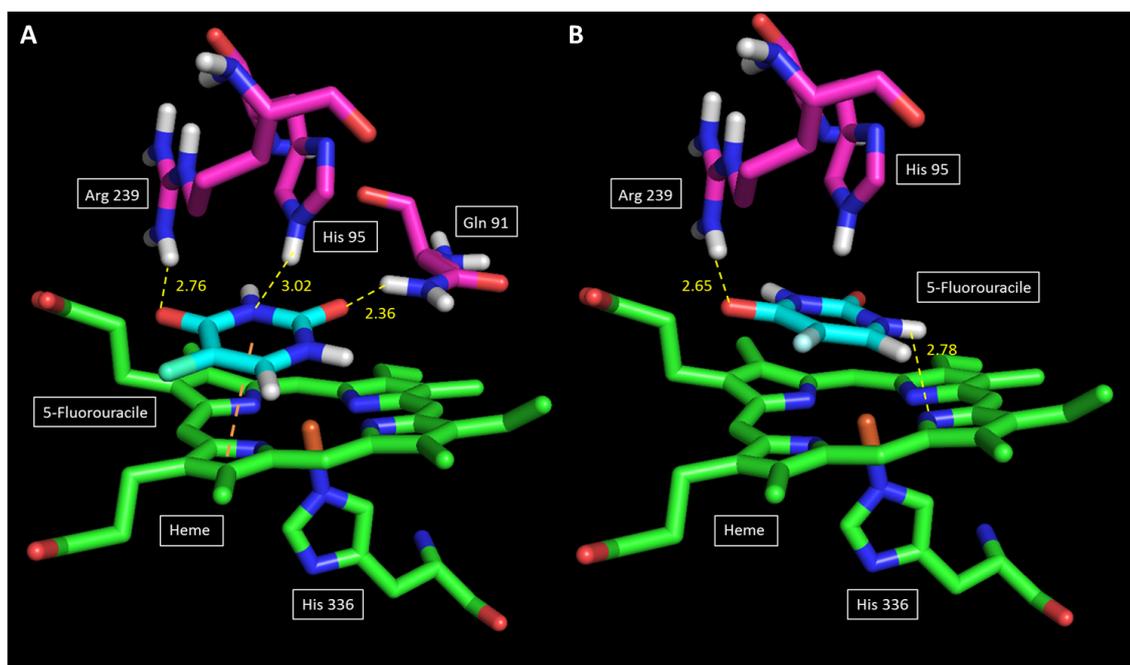


FIGURE 5.39 – Solutions du complexe MPO-5-fluorouracile obtenues par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

L'étude de l'interaction de la cladribine avec la MPO fournit un complexe représenté à la figure 5.40. Les deux cycles accolés de la molécule sont placés au-dessus du cycle pyrrole D, ce qui permet deux interactions  $\pi$ - $\pi$ . Le plan formé par les deux cycles est incliné par rapport à celui de l'hème, vers le centre de la porphyrine. Cette inclinaison permet une interaction entre un atome d'azote de la cladribine et le noyau de fer. Un second atome d'azote interagit également via un pont hydrogène de l'arginine 239. L'orientation de l'atome de chlore ne permet pas d'interaction avec l'enzyme. Le reste de la molécule est positionné entre les deux bras isopropyles de l'hème, qui peuvent alors former deux ponts hydrogène avec des atomes d'oxygène de la molécule. Le positionnement du complexe permet également un pont hydrogène avec l'acide glutamique 102 et une liaison hydrogène avec la thréonine 100.

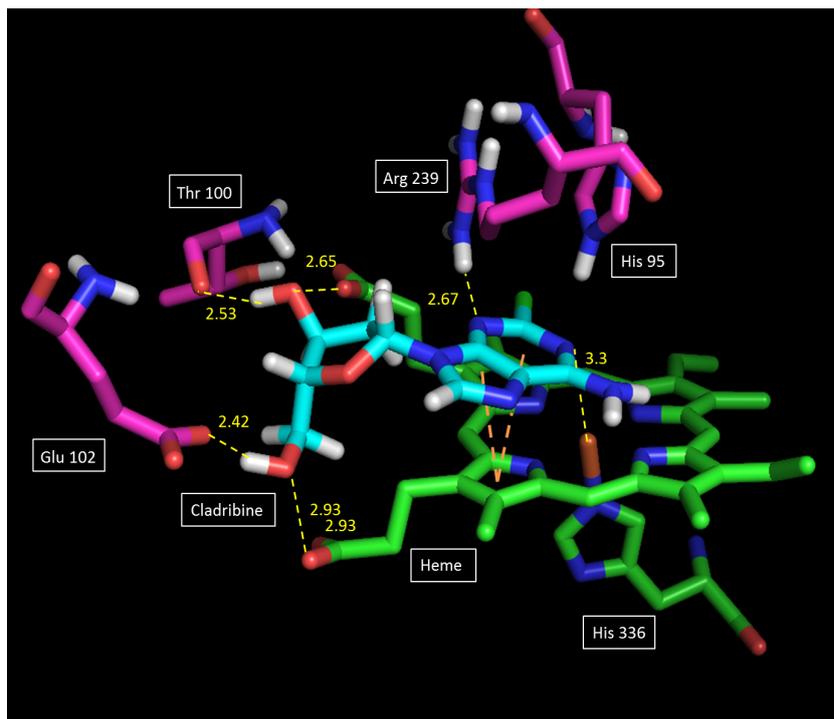


FIGURE 5.40 – Solution du complexe MPO-cladribine obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

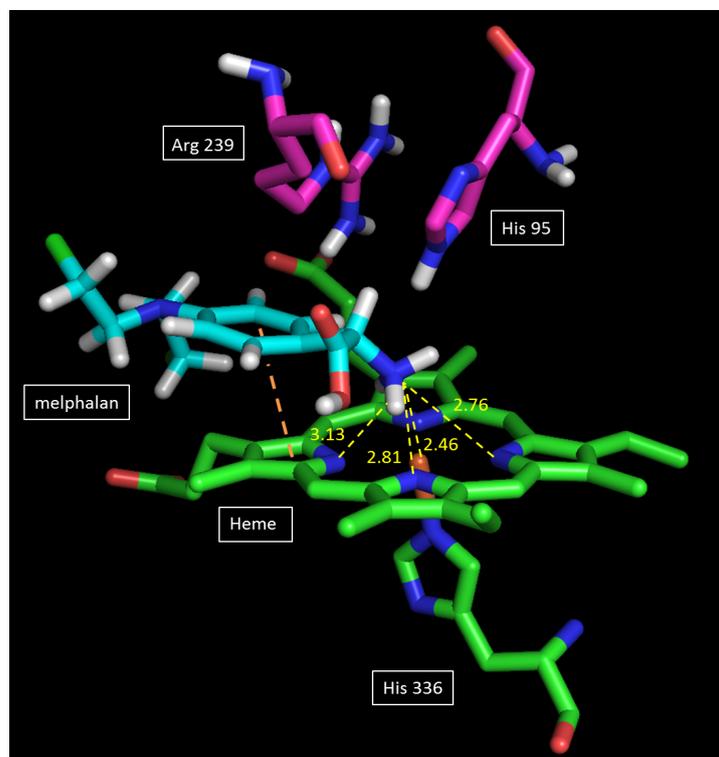


FIGURE 5.41 – Solution du complexe MPO-melphalan obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

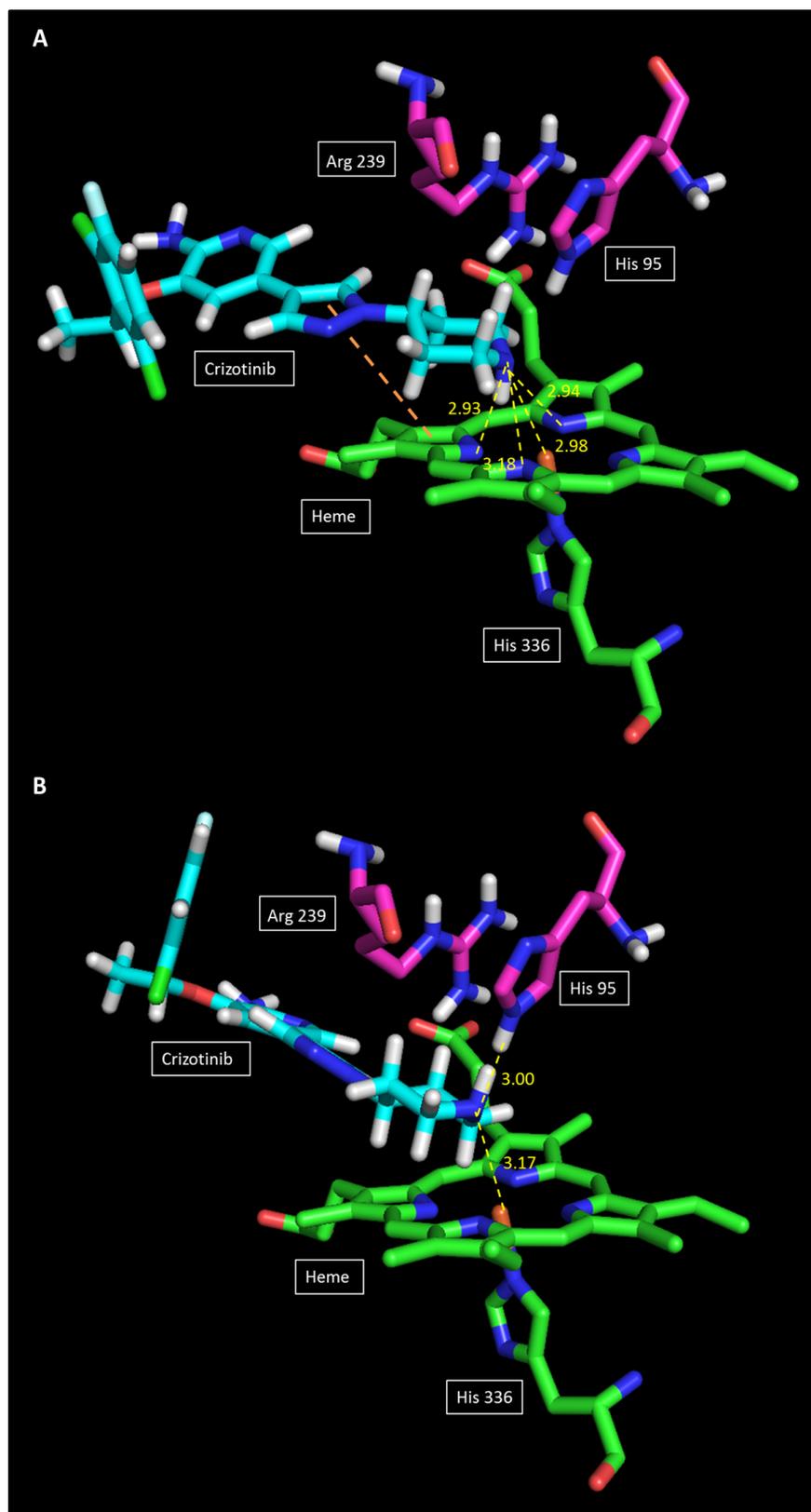


FIGURE 5.42 – Solutions du complexe MPO-crizotinib obtenues par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

Pour le melphalan, le programme GOLD fournit une solution unique, illustrée à la figure

5.41. Le cycle de la molécule est positionné partiellement au-dessus du cycle pyrrole D de la porphyrine de la MPO, ce qui permet un empilement  $\pi$ - $\pi$ . Le groupement amine du melphalan peut interagir avec trois atomes d'azote de la porphyrine via des ponts hydrogène. Une interaction avec le noyau de fer pourrait être possible.

Le *docking* a également permis d'étudier l'interaction et les modes de liaison du crizotinib avec la MPO. Le programme GOLD fournit plusieurs structures de complexes possibles. Les deux les plus fréquemment obtenues sont représentées à la figure 5.42, la structure A (41% d'occurrence) dominant la structure B (21% d'occurrence). Quel que soit le complexe fourni par la modélisation, le cycle pyridine est orienté au-dessus de l'hème. Les différences entre les structures viennent de l'orientation et de l'avancement de la molécule dans le site actif, ce qui modifie les interactions possibles entre le cycle pyridine et les différentes structures situées au centre du site actif. Dans la structure la plus fréquente, et donc la plus probable, on retrouve une interaction  $\pi$ - $\pi$  entre le cycle pyrrole D et le cycle pyrazole du crizotinib. L'atome d'azote du cycle pyridine peut quant à lui former des ponts hydrogène avec les atomes d'azote des cycles pyrroles de l'hème.

Dans le second complexe (figure 5.42 B), la molécule de crizotinib est avancée un peu plus profondément au-dessus de l'hème, permettant la formation d'un pont hydrogène entre l'atome d'azote du cycle pyridine et l'histidine 95. Il pourrait également y avoir une interaction avec le noyau de fer au centre de l'hème. Le décalage de la molécule et l'inclinaison du cycle pyrazole ne permettent pas d'interaction  $\pi$ - $\pi$ .

### 5.11.2 Interaction avec le cycle de peroxydase

La capacité des molécules anticancéreuses à interagir avec le cycle de peroxydase de la MPO a été étudiée (voir section 2.3.2). Les résultats présentés à la figure 5.43 montrent que le 5-fluorouracile, la cladribine et le melphalan ne sont pas capables de réduire l'activité peroxydasique de la MPO, quelle que soit la concentration utilisée. Les résultats du *docking* tendaient vers une possibilité d'insertion des molécules dans le site actif de l'enzyme. Lorsqu'une molécule peut accéder au site actif, elle est potentiellement capable d'interagir via deux mécanismes : l'action anticatalytique par la formation d'un complexe et/ou l'action en tant que substrat réducteur avec les intermédiaires redox de l'enzyme (composés I et II). La cladribine et le 5-fluorouracile sont caractérisés par des potentiels redox élevés à pH 7,4 (1,26 V pour le 5-fluorouracile et 1,3 V pour la cladribine). Ils sont très proches du potentiel redox du couple composé II/composé I (1,35 V) mais néanmoins inférieurs. Par conséquent, ils doivent pouvoir céder un électron au composé I pour le réduire en composé II. Cependant, la différence de potentiel entre les deux espèces étant relativement faible, cette réaction doit être peu efficace. Les potentiels des deux molécules anticancéreuses sont supérieurs à celui du couple enzyme native/composé II (0,97 V). Elles ne peuvent donc pas agir comme substrat réducteur avec le composé II. En résumé, en se basant uniquement sur les valeurs de potentiel, la cladribine et le 5-fluorouracile pourraient permettre le passage du composé I vers le composé II et bloquer l'enzyme dans cet état intermédiaire, moins réactif. Elles devraient donc théoriquement être des inhibiteurs de la MPO. Or, les résultats expérimentaux montrent que ce n'est pas le cas. En effet, il faut garder à l'esprit que les molécules d'intérêt ne sont pas les seuls substrats présents dans le milieu réactionnel à pouvoir interagir avec le cycle de peroxydase. En effet, le nitrite peut interagir avec le composé I et la sonde fluorescente Amplex Red avec le composé II. Le nitrite est caractérisé par un potentiel inférieur à celui de la cladribine et du 5-fluorouracile (1,04 V [583]). Par conséquent, le composé I réagira préférentiellement avec le nitrite pour donner le composé II. Or, les deux molécules anticancéreuses ne pourront pas empêcher l'oxydation de l'Amplex Red par le composé II, ni inhiber

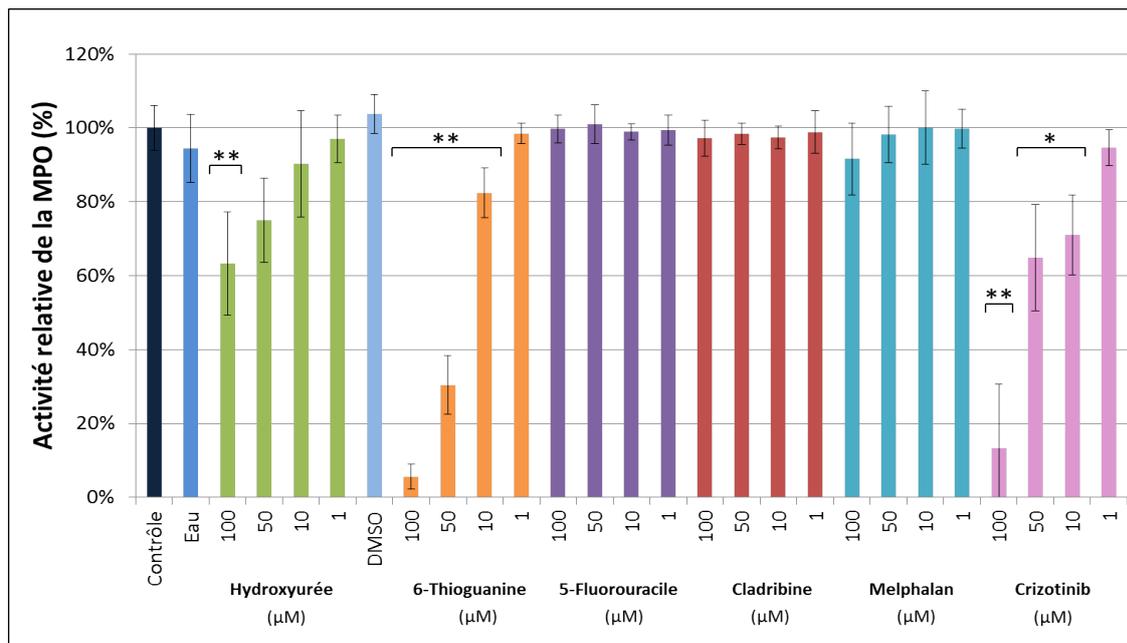


FIGURE 5.43 – Action de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l’activité peroxydasique de la MPO. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau, DMSO).

son signal de fluorescence. *In vivo*, la cladribine et le 5-fluorouracile seront en compétition avec un grand nombre de substrats (ions halogénures, anions superoxydes,...) et ne pourront empêcher leur oxydation par le cycle. Pour conclure l’interprétation des résultats pour ces deux molécules, l’absence d’inhibition est également en défaveur de leur liaison au sein du site actif et d’un effet anticatalytique, malgré les hypothèses établies grâce au *docking*. Dans le cas de la cladribine, son encombrement stérique pourrait impacter sa capacité réelle d’insertion dans le site actif.

Pour ce qui est du melphalan, son potentiel redox (913 mV) lui permet une réduction aussi bien du composé I que du composé II. Cependant, la valeur élevée du potentiel, proche de celle du couple enzyme native/composé II (0,97 V), montre que la molécule ne sera pas un réducteur efficace du composé II. Cela suppose que le melphalan ne pourra pas être un agent compétiteur efficace contre la sonde Amplex Red. Cette hypothèse se confirme par l’absence d’inhibition de l’activité peroxydasique de la MPO, observée pour cette analyse de fluorescence classique, quelle que soit la concentration en melphalan utilisée. Ces résultats montrent également que la molécule n’est pas capable de se lier efficacement au site actif de l’enzyme afin d’empêcher la pénétration d’autres substrats ( $H_2O_2$ , nitrite, Amplex Red) et l’initiation du cycle de peroxydase. Ce résultat est surprenant compte tenu de l’inhibition observée par SIEFED sur la MPO libérée pas des PMNs activés (figure 5.36), qui suggère que la molécule non seulement peut pénétrer le site actif mais également y former un complexe. Il semblerait que lorsque le melphalan se trouve en présence de l’enzyme isolée, il ne diminue pas son action oxydante. Cela pourrait être dû à la différence de temps d’incubation de la MPO en présence de la molécule test, entre le SIEFED et l’analyse classique. En effet, lors du SIEFED, l’enzyme reste en présence du melphalan pendant deux heures avant le déclenchement du cycle de l’enzyme et la mesure. Par contre, dans le cas de l’analyse classique, le temps d’incubation

est beaucoup plus court, environ dix minutes (voir annexe E). Ce temps n'est peut-être pas suffisant pour permettre l'insertion et la liaison de la molécule dans le site actif. Il faut aussi garder à l'esprit que l'étude de l'action inhibitrice d'une molécule sur la MPO dégranulée peut également être perturbée par la présence d'autres molécules ou enzymes issues également de la dégranulation. La réalisation d'une analyse SIEFED sur l'enzyme purifiée permettra d'obtenir des informations supplémentaires. Si ce SIEFED confirme l'action inhibitrice du melphalan, cela montrera l'importance du temps d'incubation dans le mécanisme d'action de la molécule. Par contre, si aucune inhibition n'est observée, cela indiquera l'implication d'un autre composé, également libéré par la dégranulation, dans le processus d'inhibition du melphalan. Cependant, ce composé et son intervention seront difficilement identifiables.

L'hydroxyurée induit une légère inhibition de l'activité oxydante de l'enzyme. Seule la plus haute concentration provoque une diminution de 37% de cette activité. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par modélisation. En effet, le complexe proposé place la molécule d'hydroxyurée loin de l'hème. Aucune interaction n'est alors possible avec des éléments placés profondément dans la cavité du site actif. La formation réelle d'un complexe entre la molécule anticancéreuse et la MPO est donc peu probable. L'hydroxyurée ne présente par conséquent pas d'action anticatalytique et ne peut inhiber le déclenchement du cycle de peroxydase de l'enzyme. L'éloignement entre la molécule et le site actif peut également expliquer l'absence probante d'action en tant que substrat réducteur. L'hydroxyurée est caractérisée par un potentiel d'oxydoréduction (435 mV) largement inférieur à celui des composés I et II. La molécule devrait donc pouvoir réduire efficacement les deux intermédiaires et rentrer en compétition avec le nitrite et l'Amplex Red. Or, aucune diminution du signal de fluorescence de l'Amplex Red n'est observée, excepté à haute concentration. Ces résultats montrent qu'un élément empêche le transfert d'électrons entre l'hydroxyurée et le site actif, probablement la distance trop importante entre les deux éléments. Seule une grande quantité de molécules d'hydroxyurée en solution permet une légère interaction avec l'enzyme. Ce résultat semble en contradiction avec ceux obtenus par l'étude de Maiocchi et al. [442]. En effet, ils ont observé que l'hydroxyurée pouvait accélérer le déroulement du cycle de peroxydase en jouant le rôle de substrat réducteur pour le composé II. Les résultats recueillis jusqu'à présent dans ce travail ne permettent pas de comprendre cette différence. Les mesures réalisées sur le cycle de chloration et avec le SIEFED permettront ou non de confirmer l'absence d'interaction entre l'hydroxyurée et la MPO.

La 6-thioguanine et le crizotinib présentent les actions inhibitrices les plus importantes. La 6-thioguanine inhibe à 94% et 70% l'action de peroxydase pour les concentrations de 100  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$ , respectivement. L'inhibition chute à 18% pour la concentration de 10  $\mu\text{M}$ . Le crizotinib induit quant à lui une inhibition de 87% à 100  $\mu\text{M}$ . Celle-ci est réduite à 35% et 29% pour les concentrations de 50 et 10  $\mu\text{M}$ , respectivement. Sur base de ces seuls résultats, le mode d'action des deux anticancéreux en tant qu'inhibiteur du cycle de peroxydase de la MPO ne peut être déterminé précisément. En effet, les molécules peuvent agir comme substrat réducteur pour les composés I et II du cycle et/ou agir comme ligand et se fixer dans le site actif. Une des seules conclusions apparaissant à ce stade est que la structure des molécules leur permet de s'insérer dans le canal d'accès au site actif de l'enzyme et de se positionner près de l'hème, condition indispensable pour agir comme inhibiteur. Cependant, en comparant les potentiels redox des molécules aux potentiels des différents états redox de la MPO, une première piste d'explication se dessine pour comprendre le mécanisme d'action.

La 6-thioguanine et le crizotinib sont caractérisés par des potentiels redox de 493 mV et 825 mV respectivement, tous deux inférieurs à celui du couple composé II/composé I (1,35 V). Ils peuvent donc entrer en compétition avec le nitrite et réduire le composé I en composé II. Les potentiels des deux molécules sont également inférieurs à celui du couple

enzyme native/composé II (0,97 V). Elles peuvent donc réduire le composé II, permettre le retour vers la forme native de l'enzyme et par conséquent empêcher l'oxydation de la sonde fluorescente. Le mécanisme d'inhibition des deux anticancéreux peut donc être dû à leur propriété de substrat réducteur envers les deux composés de la MPO. Sur base des potentiels redox, celui de la 6-thioguanine étant largement inférieur à celui du crizotinib, cette dernière molécule apparaît comme un substrat réducteur moins efficace vis-à-vis du composé II et comme un élément compétiteur moins efficace vis-à-vis de l'Amplex Red. Cela peut donc expliquer l'action plus faible observée pour le crizotinib (figure 5.43).

A l'action réductrice de la 6-thioguanine et du crizotinib peut s'ajouter une action anti-catalytique, via la formation d'un complexe avec la MPO. En effet, le *docking* propose des interactions entre les deux molécules et différents éléments importants du site actif, comme l'histidine distale par rapport à l'hème. Celle-ci est le lieu de liaison du peroxyde d'hydrogène, phase essentielle pour le déclenchement des cycles oxydants de l'enzyme. Une étude SIEFED sur l'enzyme isolée pourra confirmer cette hypothèse. Les premiers résultats obtenus grâce au SIEFED réalisé sur le contenu de dégranulation de PMNs activés (5.35) sont en faveur d'une liaison entre la MPO et la 6-thioguanine.

### 5.11.3 Interaction avec le cycle de chloration

Le cycle de chloration est une spécificité de la MPO qui permet de produire l'acide hypochloreux par la réduction du composé I via son interaction avec les ions chlorure abondants dans le plasma (110-141 mM [54]) (voir section 1.2.2.1). Réduire voire inhiber le cycle de chloration de l'enzyme représente une des pistes importantes pour moduler son activité oxydante. Le pH du milieu influence fortement la prédominance du cycle de chloration sur le cycle de peroxydase. L'affinité du composé I avec les ions chlorure augmente lorsque le pH diminue [54]. Le milieu extracellulaire est caractérisé par un pH neutre avec une valeur comprise entre 7 et 7,5. Par contre, le phagolysosome des PMNs est caractérisé par une acidification du milieu pouvant atteindre un pH de 4,7-6 [54, 76, 77]. De façon similaire, des lésions inflammatoires comme des lésions athérosclérotiques [101] sont caractérisées par un pH acide.

Une analyse de fluorescence à l'aide de la sonde APF, capable de piéger l'acide hypochloreux, a été réalisée afin d'évaluer l'action inhibitrice des molécules d'intérêt (voir section 2.3.3).

#### 5.11.3.1 Milieu acide - pH 5,5

La 6-thioguanine et le crizotinib, sont capables de réduire l'activité de chloration de la MPO de façon dose-dépendante (figure 5.44).

A pH acide, la 6-thioguanine inhibe totalement la formation du HOCl par la MPO, à ses deux plus fortes concentrations testées de 50 et 100  $\mu\text{M}$ . L'inhibition diminue légèrement à 10  $\mu\text{M}$  mais reste tout de même de 88% par rapport au contrôle solvant. La 6-thioguanine est un piègeur efficace du HOCl (figure 5.31). Par conséquent, l'inhibition observée peut être une combinaison de son action de piégeage et de substrat pour l'enzyme. En effet, la molécule peut interagir avec le composé I en entrant en compétition avec les ions chlorure. Elle pourrait également empêcher le déclenchement du cycle de chloration en bloquant l'insertion du peroxyde d'hydrogène via la formation d'un complexe avec le site actif. En comparant les concentrations testées par rapport aux concentrations plasmatiques de l'ordre de 95  $\mu\text{M}$  (voir section 5.4.2), l'administration de 6-thioguanine pourrait avoir une action inhibitrice importante sur l'activité de chloration de l'enzyme.

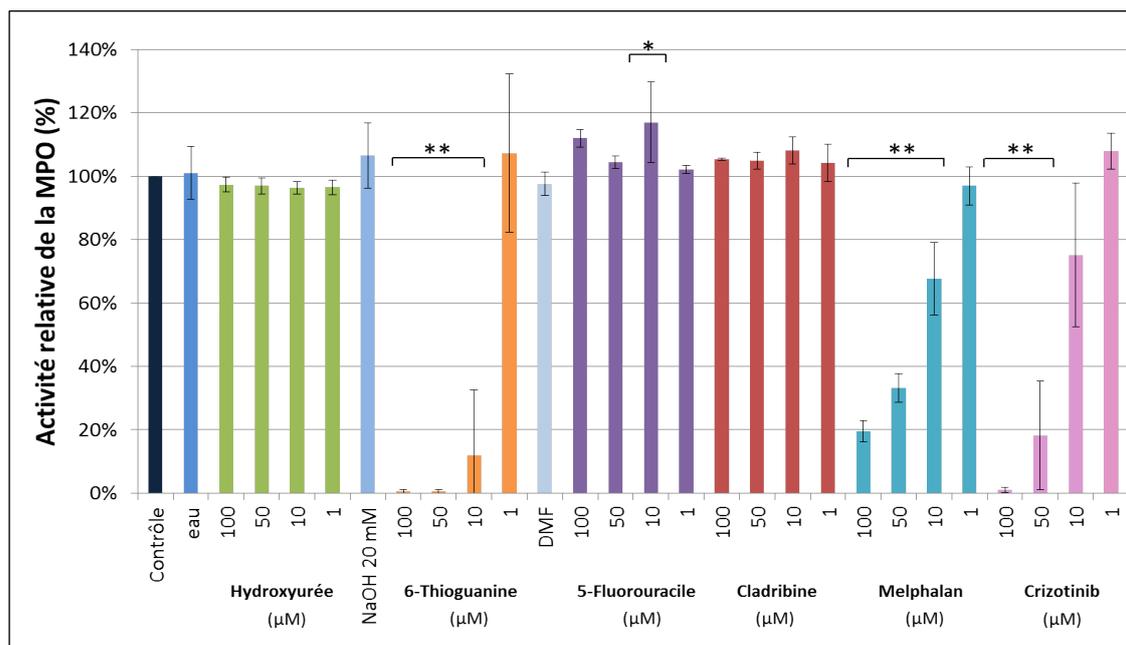


FIGURE 5.44 – Action de l’hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l’activité de chloration de la MPO à pH 5,5. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 (sauf hydroxyurée, 5-fluorouracile et cladribine : N=2) et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau, NaOH (20 mM), DMF).

Tout comme la 6-thioguanine, le crizotinib inhibe complètement le cycle de chloration à 100  $\mu$ M. Cependant, la molécule présente une action plus faible aux deux concentrations intermédiaires de 10 et 50  $\mu$ M, avec une inhibition de 25% et 82% respectivement. L’action du crizotinib peut également être une association entre sa capacité à piéger le HOCl (figure 5.31) et à interagir avec l’enzyme, via la réduction du composé I ou une liaison à l’enzyme. La concentration plasmatique d’équilibre est d’environ 1,5  $\mu$ M (voir section 5.8.2). A cette concentration physiologique, le crizotinib possède une action non significative.

Une troisième molécule possède également un pouvoir inhibiteur sur le cycle de chloration de la MPO. De même que la 6-thioguanine et le crizotinib, le melphalan présente une action dose-dépendante, allant de 32% à 80 % pour les concentrations de 10  $\mu$ M à 100  $\mu$ M. A la concentration physiologique, autour de 1  $\mu$ M (voir section 5.7.2), la molécule n’agit plus significativement. Pour comprendre le mécanisme d’action du melphalan, il faut se rappeler que celui-ci agit comme piégeur de HOCl (figure 5.31). Le melphalan pourrait également entrer en compétition avec les ions chlorure pour interagir avec le composé I et dévier l’enzyme vers son cycle de peroxydase. En effet, à pH basique, le potentiel redox de la molécule montre sa capacité à réduire le composé I. Les potentiels des composés de l’enzyme ne sont pas connus à pH acide mais une telle interaction reste plausible.

L’absence d’action inhibitrice pour la cladribine, le 5-fluorouracile et l’hydroxyurée est en accord avec celle observée sur le cycle de peroxydase.

### 5.11.3.2 Milieu extracellulaire - pH 7,4

La basification du pH modifie l’interaction des ions chlorure avec le site actif de la MPO. La capacité des molécules à inhiber le cycle de chloration varie également selon le pH [54, 584].

En effet, leur oxydation étant favorisée lorsque le milieu se basifie [567, 569, 572, 295], leur interaction avec l'enzyme comme substrat compétitif des ions  $\text{Cl}^-$  augmente. Il est donc important d'évaluer l'action des molécules sur le cycle de chloration à pH plus basique, 7,4, se rapprochant du milieu extracellulaire, là où la MPO peut être libérée (figure 5.45).

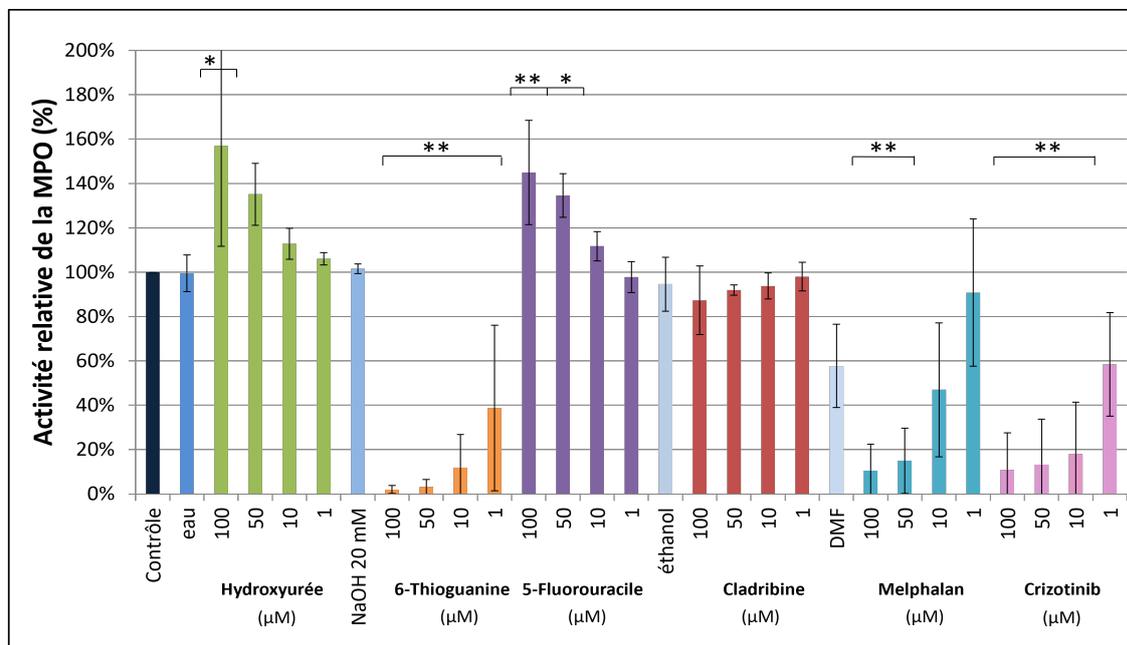


FIGURE 5.45 – Action de l'hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l'activité de chloration de la MPO à pH 7,4. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  (sauf hydroxyurée, 5-fluorouracile et cladribine :  $N=2$ ) et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (eau, NaOH (20 mM), éthanol, DMF).

Comme attendu, l'action inhibitrice de la 6-thioguanine augmente dans un milieu de pH 7,4. Aux concentrations de  $1 \mu\text{M}$  et  $10 \mu\text{M}$ , l'inhibition de l'activité de chloration de la MPO atteint 61% et 89% respectivement. Par conséquent, la molécule peut être considérée comme un inhibiteur du cycle de chloration, même à concentration physiologique. Comme pour la mesure réalisée à pH acide, il est difficile d'établir le mécanisme d'action exact de la molécule. En effet, celle-ci peut clairement impacter l'activité de l'enzyme (figure 5.43) mais elle peut également agir comme piègeur très efficace du HOCl (figure 5.31). On peut donc supposer que le mécanisme est en réalité une combinaison de ces deux modes d'action.

Pour le melphalan et le crizotinib, il est moins aisé de conclure à une augmentation de leur action en relation avec l'augmentation du pH du milieu. En effet, leur solvant, le DMF, réduit fortement l'oxydation de la sonde fluorescente, l'APF, à pH 7,4. Une diminution du signal de 43% est observée par rapport au contrôle. Cet effet a déjà été observé et discuté dans le chapitre 4 consacré le propofol. Cependant, on peut conclure que les deux composés continuent d'inhiber le cycle de chloration de la MPO, partiellement via le piégeage du HOCl mais également en interagissant potentiellement avec le composé I et en empêchant l'oxydation des ions chlorure. En effet, tout comme la 6-thioguanine, les deux molécules sont caractérisées par un potentiel redox inférieur à celui du couple HOCl/ $\text{Cl}^-$  (1,08 V à pH 7 [52]).

Quel que soit le pH, la cladribine n'influence pas l'activité de chloration. Cependant, l'hydroxyurée et le 5-fluorouracile augmentent de façon significative le signal de fluorescence

de l'APF. Cette augmentation est-elle due à une stimulation de la production de HOCl par la MPO? Ce résultat est surprenant, en particulier pour l'hydroxyurée qui a montré une capacité à piéger les molécules de HOCl à pH 7,4 (figure 5.31). La concentration plasmatique de l'hydroxyurée peut atteindre 100  $\mu\text{M}$  et pourrait potentiellement avoir un effet stimulateur de l'action de chloration de la MPO dans le milieu extracellulaire. Pour le 5-fluorouracile, l'augmentation du signal de fluorescence de l'APF a déjà été observé lors de l'étude de l'action de piégeage de la molécule sur le HOCl (figure 5.31). Par conséquent, cette augmentation n'est pas liée à l'enzyme. La cladribine et le 5-fluorouracile sont caractérisés par des potentiels redox supérieurs à celui du couple HOCl/Cl<sup>-</sup> (1,08 V à pH 7 [52]). Par conséquent, le composé I de la MPO interagira préférentiellement avec les ions chlorure. Les deux molécules anticancéreuses ne peuvent pas être compétitives par rapport aux ions chlorures et empêcher la formation du HOCl.

#### 5.11.4 SIEFED

Afin de compléter l'étude de l'interaction entre les anticancéreux et la MPO, il est important d'investiguer leur capacité à s'insérer dans le site actif de l'enzyme et surtout à s'y lier. Les molécules d'intérêt peuvent-elles former un complexe avec l'enzyme en constituant des liaisons avec différents éléments (acides aminés, hème, noyau de fer) du site actif? Peuvent-elles de ce fait bloquer l'accès au site, jouant ainsi le rôle d'élément anticatalytique? Peuvent-elles s'approcher suffisamment de l'hème pour permettre les échanges d'électrons et agir comme substrat réducteur dans les cycles de peroxydase et de chloration? En association avec le *docking*, le SIEFED permet d'obtenir des réponses et des précisions sur le mode d'action des molécules. Il permet d'évaluer la capacité de liaison des molécules d'intérêt au site actif de la MPO, grâce à une étape de lavage (voir section 2.3.4). En effet, seuls les composés capables de se lier dans la cavité (aux acides aminés, au noyau de fer ou à la structure hémique) peuvent empêcher l'accès des substrats au site actif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nitrite et Amplex Red) et inhiber par conséquent l'oxydation de la sonde fluorescente Amplex Red.

La figure 5.46 montre l'impact des molécules anticancéreuses sur l'activité oxydante de la MPO. Le crizotinib est la seule à présenter une action inhibitrice significative aux quatre concentrations testées. L'inhibition de l'activité de peroxydase de l'enzyme varie de 54% à 1  $\mu\text{M}$  à 84% à 100  $\mu\text{M}$ . Le SIEFED montre clairement que le crizotinib est capable de s'insérer dans le site actif de l'enzyme et d'y former des liaisons résistantes à l'étape de lavage. La présence de la molécule dans le site peut empêcher, ou du moins ralentir, l'insertion d'autres substrats comme le peroxyde d'hydrogène et peut donc inhiber le déclenchement des cycles oxydants de l'enzyme en empêchant la formation du composé I. Ce résultat est en accord avec les solutions fournies par le programme de *docking*. En effet, les complexes proposés permettent la formation de ponts hydrogène avec différents éléments importants du site actif, comme l'histidine distale 95 ou la porphyrine.

L'inhibition plus importante observée en SIEFED par rapport à l'analyse classique (figure 5.43) montre que le principal mécanisme d'inhibition du crizotinib envers la MPO est dû à son action anticatalytique. En effet, lors de l'analyse classique, le mécanisme mis en avant est l'inhibition stochiométrique en tant que substrat réducteur dans le cycle de peroxydase. Les résultats obtenus en analyse classique, associés à la voltammétrie, montrent clairement la capacité de la molécule à agir comme substrat réducteur. L'augmentation du temps d'incubation caractéristique du SIEFED par rapport à l'analyse de fluorescence classique permet l'interaction et l'établissement de liaisons entre le crizotinib et la MPO, augmentant de ce fait son action inhibitrice.

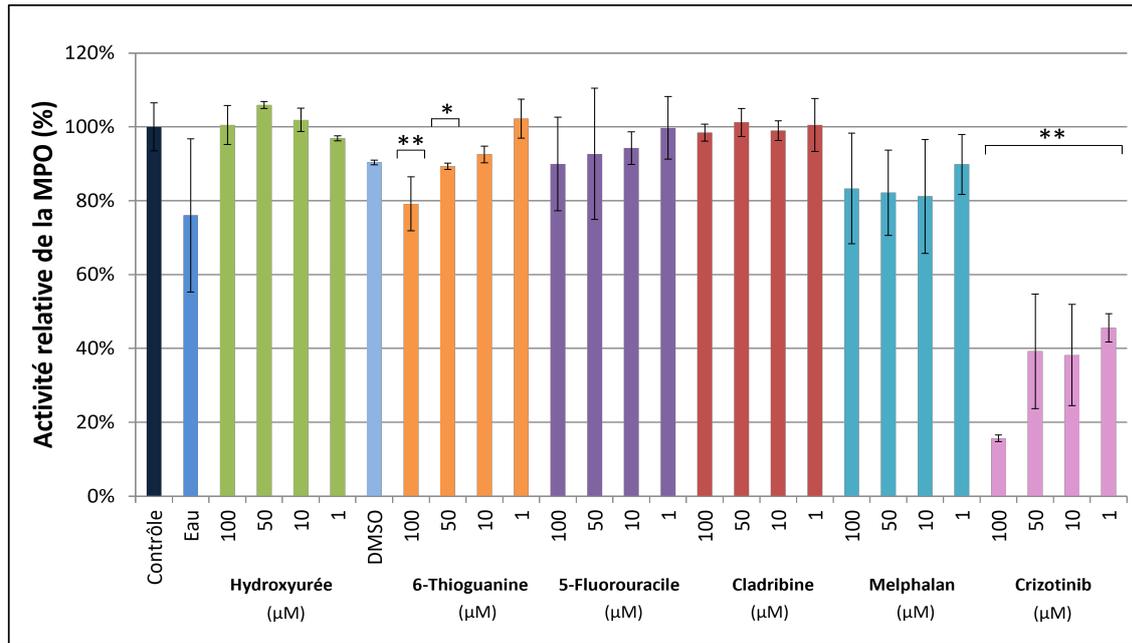


FIGURE 5.46 – Action de l'hydroxyurée, de la 6-thioguanine, du 5-fluorouracile, de la cladribine, du melphalan et du crizotinib sur l'activité oxydante de la MPO, mesurée par SIEFED. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (eau, DMSO).

Un test ELISA a également été réalisé (figure 5.47). Il montre que le crizotinib n'empêche pas la liaison de la MPO aux anticorps se trouvant dans le fond des puits de la plaque utilisée pour le SIEFED. Par conséquent, l'inhibition du signal de fluorescence de la sonde Amplex Red observée est due uniquement à la diminution de l'activité oxydante de l'enzyme.

Le melphalan ne montre aucune inhibition de l'activité peroxydasique de la MPO via le SIEFED (figure 5.46). La molécule n'est donc pas capable de se lier efficacement au site actif de l'enzyme, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus sur la MPO dégranulée par des PMNs activés (figure 5.35). Cela indique que l'implication d'un autre composé également libéré lors de la dégranulation est nécessaire pour permettre au melphalan de réduire l'activité de l'enzyme.

La 6-thioguanine perd presque entièrement son action inhibitrice en SIEFED. Seule une inhibition de 21% est conservée à la plus forte concentration de 100  $\mu$ M et de 11% à 50  $\mu$ M. Cela révèle que la molécule n'est pas capable de se lier (ou du moins pas efficacement) au site actif de l'enzyme. L'étape de lavage élimine presque entièrement les molécules de la solution. Sur base de ce résultat, on peut conclure que le mode d'action de la 6-thioguanine est celui de substrat réducteur avec les composés redox (composés I et II) des cycles de l'enzyme.

Tout comme pour le melphalan, l'absence d'inhibition observée en SIEFED pour la 6-thioguanine est surprenante. En effet, le SIEFED réalisé sur la MPO dégranulée montre une inhibition de l'activité de la MPO. Une autre molécule interviendrait-elle également comme pour le melphalan ? Une seconde hypothèse peut cependant être émise. En effet, lors de l'activation des PMNs, la dégranulation s'accompagne aussi de l'activation de la flambée respiratoire [585] et donc de la production d'anions superoxydes, qui donnent du peroxyde d'hydrogène. Par conséquent, la MPO libérée par les cellules est activée et déclenche son

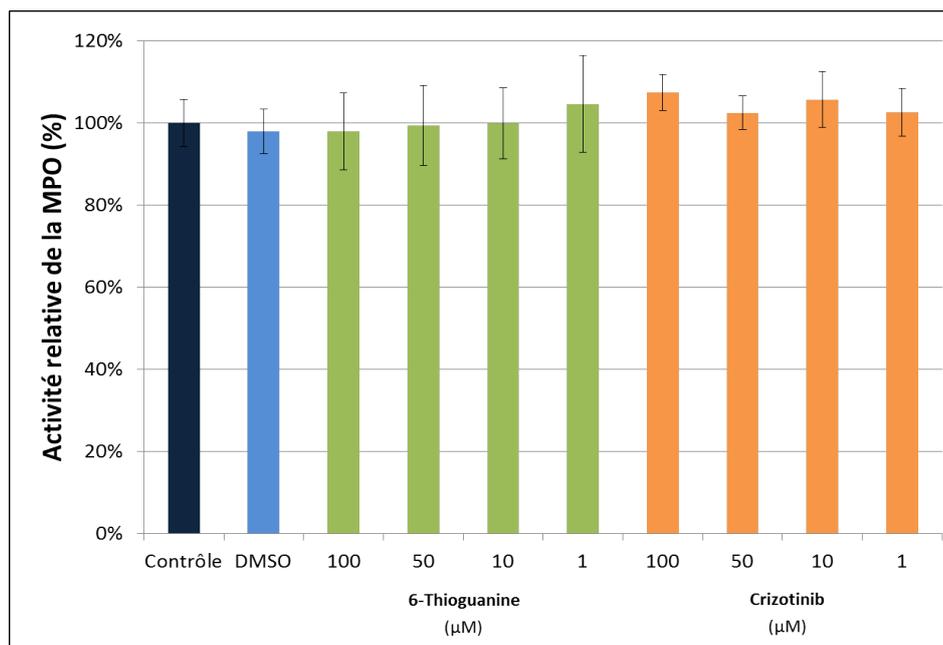


FIGURE 5.47 – Action de la 6-thioguanine et du crizotinib sur l’activité peroxydasique de la MPO, mesurée par ELISA. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=1 et n=6).

cycle de peroxydase. La 6-thioguanine, qui est en solution, peut dès lors être oxydée. L’état radicalaire de la molécule pourrait dans ce cas interagir avec l’enzyme et se lier, comme cela se produit avec les thioxanthines [163, 164]. Cette hypothèse doit être vérifiée.

Enfin, l’hydroxyurée perd aussi totalement son action inhibitrice en SIEFED. Par conséquent, tout comme la 6-thioguanine, la faible action observée en analyse classique (figure 5.43) provient uniquement de sa capacité à réduire les composés redox de l’enzyme.

### 5.11.5 Etude complémentaire de l’action inhibitrice de la 6-thioguanine

Les résultats obtenus laissent apparaître que la 6-thioguanine est capable d’agir comme inhibiteur efficace des actions de chloration et de peroxydase de la MPO. Initialement, le choix d’étudier l’action de la 6-thioguanine était partiellement motivé par la similarité entre la structure de la molécule et celle d’inhibiteurs connus de la MPO, les thioxanthines [163, 164]. En effet, les deux molécules sont composées d’un cycle aromatique sur lequel est attaché un atome de soufre. Ce dernier est essentiel au mécanisme d’inhibition irréversible des thioxanthines sur la MPO. Ces molécules agissent comme substrat réducteur avec le composé I de l’enzyme. Ensuite, étant passées à l’état radicalaire (principalement localisé sur le soufre [163]), les molécules forment une liaison covalente avec le groupement méthyle du cycle pyrrole D de la porphyrine (figure 5.48). Cette liaison modifie la configuration du site actif de l’enzyme et bloque de ce fait son activité de façon irréversible.

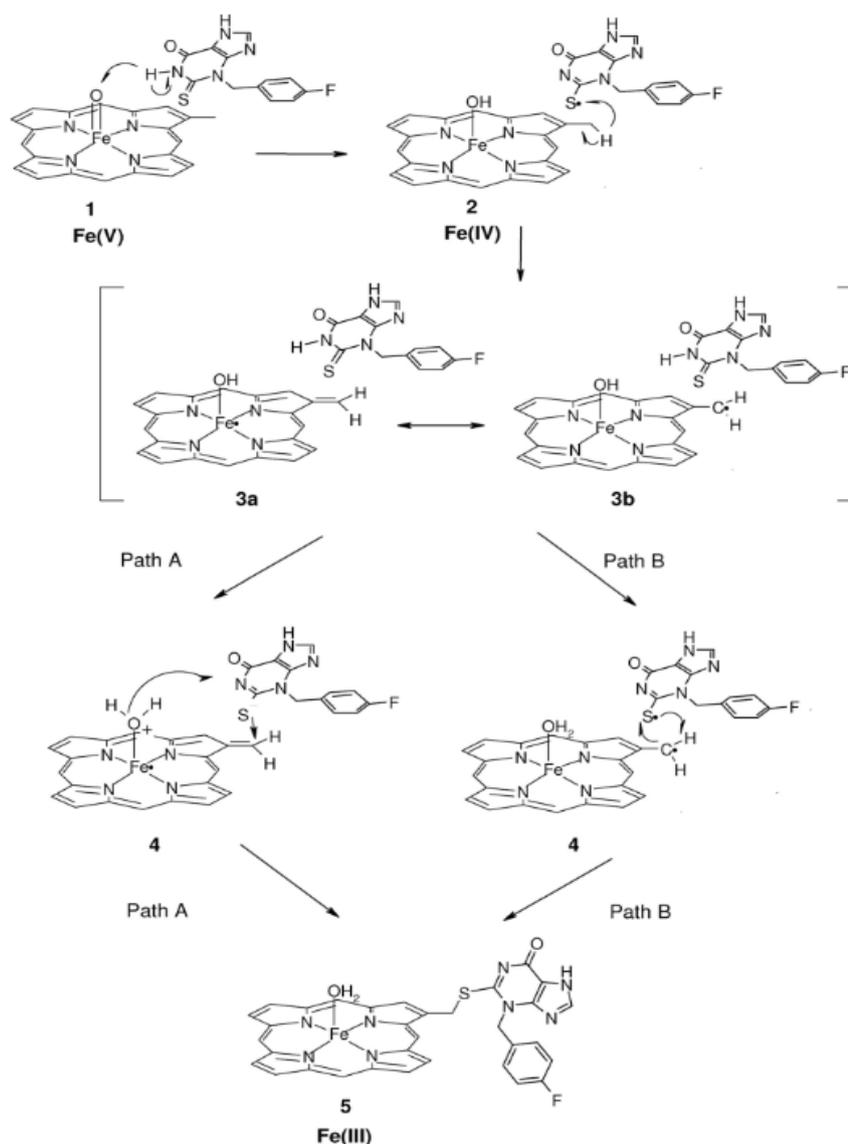


FIGURE 5.48 – Proposition de mécanismes d'interaction entre une thioxantine (3-[(4-fluorophenyl)méthyl]-2-thioxo-7H-purin-6-one) et le site actif de la MPO. Schéma original de Tidén et al.[163].

Le potentiel d'oxydoréduction estimé de la 6-thioguanine indique que la molécule est capable de réduire les composés I et II de la MPO. La voltammétrie, l'analyse de fluorescence classique et le *docking* indiquent clairement que la molécule est capable de s'insérer dans la cavité du site actif et d'y céder un électron. En passant à l'état radicalaire, elle pourrait alors interagir de façon similaire aux thioxanthines à l'aide de son atome de soufre. Par conséquent, il se pourrait que sa forte capacité inhibitrice observée, que ce soit sur le cycle de peroxydase ou celui de chloration, soit en rapport avec sa liaison irréversible au site actif, à la suite de son oxydation par le composé I. Cette hypothèse doit être creusée.

Le SIEFED montre l'incapacité de la molécule à se lier au site, ou du moins, à former des liaisons suffisamment fortes pour résister à l'étape de lavage, ce qui serait le cas pour une liaison covalente. Cependant, il faut se souvenir que cette étape de lavage est réalisée avant le déclenchement du cycle de peroxydase de la MPO et donc avant que la 6-thioguanine puisse

être oxydée par le composé I et passer à l'état radicalaire. Par conséquent, étant dans sa forme native, elle n'a pas la possibilité de former une liaison covalente avec la porphyrine et les seules interactions possibles (ponts hydrogène, empilement  $\pi$ - $\pi$ ) ne résistent pas à l'étape de lavage. Il est donc nécessaire de déclencher le cycle de peroxydase de l'enzyme avant cette étape afin de permettre le passage de la 6-thioguanine à son état radicalaire. Pour cela, un SIEFED modifié a été réalisé (voir annexe D). Dans ce cas, une première activation du cycle de peroxydase est déclenchée en ajoutant du peroxyde d'hydrogène suite à la première phase d'incubation de 2h. Après une seconde incubation de trente minutes, les puits sont lavés afin de supprimer les molécules d'intérêt non fixées à la MPO. Ensuite, le cycle de l'enzyme est activé une nouvelle fois, en présence de la sonde fluorescente Amplex Red.

La figure 5.49 compare les résultats de l'étude sur la capacité de liaison de la 6-thioguanine au site actif de l'enzyme obtenus par SIEFED classique (couleur pleine) et par SIEFED modifié (couleur quadrillée). Suite à la première activation du cycle de peroxydase de la MPO, via l'ajout de peroxyde d'hydrogène avant l'étape de lavage, l'activité finale de l'enzyme a diminué par rapport au contrôle réalisé en SIEFED classique. En effet, une chute de 57% est observée. Celle-ci peut s'expliquer par l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène. Lors de l'incubation de trente minutes entre le premier ajout d' $H_2O_2$  et le lavage, l' $H_2O_2$ , qui présente un excès supérieur à 1000 par rapport à l'enzyme, peut commencer à l'inhiber en permettant le passage du composé II en composé III (voir section 1.2.2.2). Ce dernier peut conduire à la destruction de l'hème et par conséquent à l'inactivation de la protéine [62]. Le contrôle solvant montre que le DMSO n'induit pas d'augmentation de l'inhibition par rapport au contrôle.

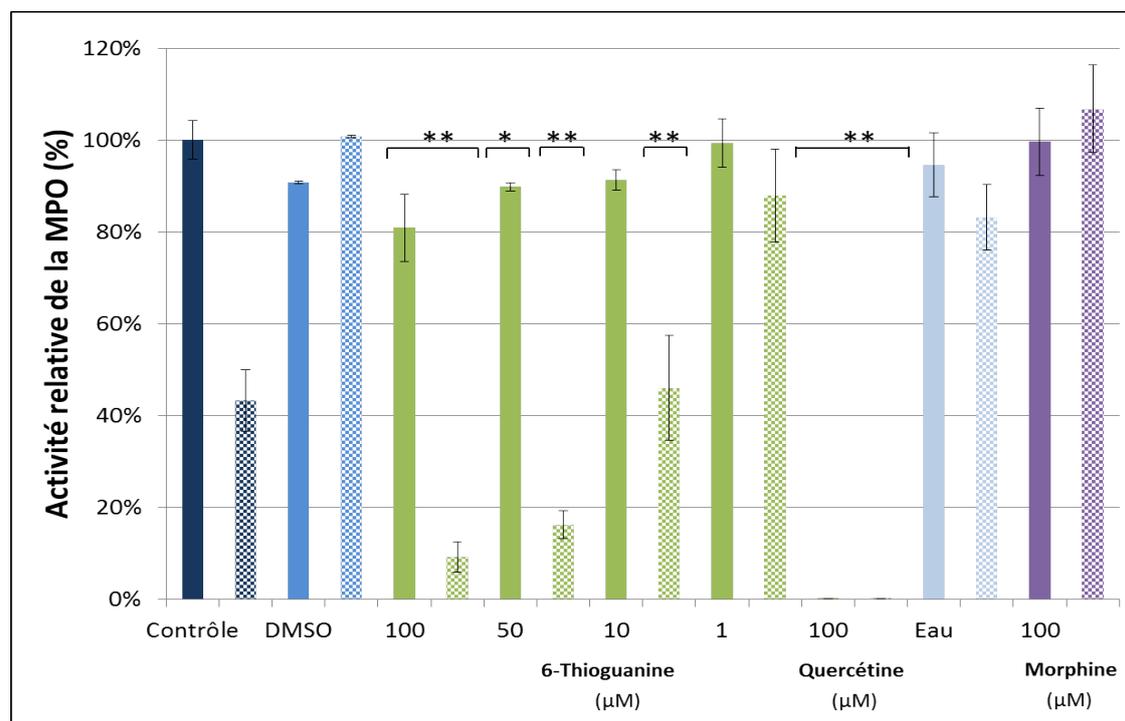


FIGURE 5.49 – Action de la 6-thioguanine, de la quercétine (100  $\mu$ M) et de la morphine (100  $\mu$ M) sur l'activité oxydante de la MPO, mesurée par SIEFED classique (couleur pleine) et par SIEFED modifié avec une première activation du cycle de peroxydase avant le lavage (couleur quadrillée). Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO, eau).

Dans le cas du SIEFED classique, seules les plus fortes concentrations (100  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$ ) en 6-thioguanine induisent une inhibition de l'activité de la MPO suite à une liaison au site actif de l'enzyme. Dans le cas du SIEFED modifié, une augmentation nette de l'inhibition est observée. L'activité oxydante de la MPO est inhibée à 91% à 100  $\mu\text{M}$ . Une inhibition de 84% est conservée à 50  $\mu\text{M}$  et chute à 54% et à 12% aux concentrations de 10 et 1  $\mu\text{M}$ , respectivement.

Deux molécules de référence ont également été testées grâce au SIEFED modifié, afin de s'assurer que les résultats obtenus pour la 6-thioguanine ne soient pas dus à divers artéfacts ou à l'inactivation de l'enzyme par le peroxyde d'hydrogène. La première molécule testée est la quercétine. Ce polyphénol est un inhibiteur connu de la MPO [150]. Différentes études ont rapporté sa capacité à se lier au site actif de l'enzyme [151] et à montrer une action inhibitrice à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  en SIEFED classique [261]. Avec le SIEFED modifié, la molécule conserve une inhibition similaire à celle observée en SIEFED classique. La seconde molécule testée est la morphine. Dans la section 3.7.4 de ce travail, les résultats ont indiqué que la molécule est incapable de se lier efficacement, à 100  $\mu\text{M}$ , au site actif de l'enzyme. En SIEFED modifié, aucun accroissement de son activité inhibitrice n'est observée. Cela démontre que malgré son oxydation lors de la première phase d'activation, sa capacité de liaison n'a pas augmenté et que la molécule est toujours éliminée lors du lavage.

Ces résultats laissent apparaître que la première activation de l'action oxydante de la MPO avant le lavage, et par conséquent l'oxydation de la 6-thioguanine, augmente sa capacité à se lier de façon efficace à l'enzyme. En effet, dans cette situation, les liaisons formées peuvent résister à l'étape de lavage. Par conséquent, la présence de la molécule au sein du site actif permet d'inhiber l'oxydation de la sonde fluorescente, l'Amplex Red. La formation d'une liaison covalente entre la 6-thioguanine et l'hème du site actif ne peut être confirmée sur base de ces seules constatations, mais on peut conclure que l'oxydation de la molécule augmente son interaction et sa liaison avec l'enzyme. Par conséquent, ces résultats plaident en faveur d'une potentielle action inhibitrice irréversible de la 6-thioguanine.

Afin d'obtenir d'autres éléments étayant notre hypothèse, une étude de l'interaction entre la 6-thioguanine et la MPO a été réalisée en spectroscopie d'absorption UV-visible (figure 5.50). Le spectre d'absorption de l'enzyme native présente un maximum à 429 nm (pic de Soret) ainsi qu'une bande Q à 570 nm (voir annexe E).

Après l'ajout de 6-thioguanine, l'interaction de la molécule avec l'enzyme induit un décalage spectral de 4 nm de la bande de Soret avec une diminution de l'amplitude du pic. L'amplitude de la bande à 570 nm diminue par rapport à l'enzyme native et une nette augmentation du pic à 626 nm est observée. L'interaction de la 6-thioguanine ne provoque pas de *redshift* important de la bande de Soret. Cela montre que la molécule n'interagit pas comme ligand fort avec le noyau de fer au centre de la porphyrine. En effet, des ligands forts comme les cyanides induisent des décalages plus importants de l'ordre de 20 nm [586]. La complexation entre ces molécules et l'enzyme provoque le passage de son noyau de fer de l'état *high spin* à un état *low spin*. Ce qui n'est pas le cas avec la 6-thioguanine. Cela a été confirmé grâce à la spectroscopie RPE basse température (figure 5.51). En effet, l'ajout de 6-thioguanine ne provoque aucun changement du spectre caractéristique *high spin* de la MPO native (voir annexes E et F). Aucun pic associé à un état *low spin* n'est observé.

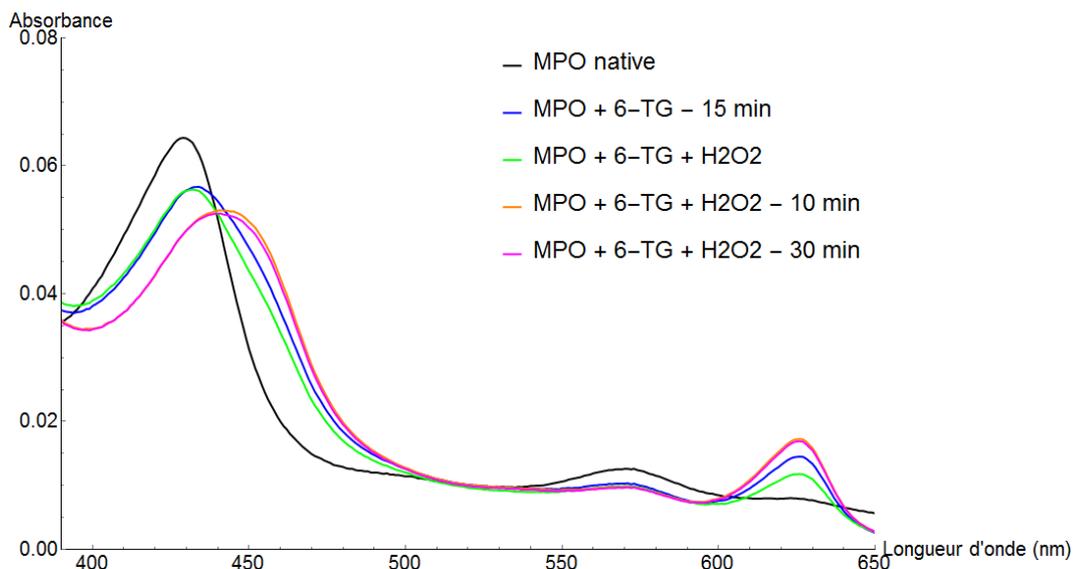


FIGURE 5.50 – Spectres d’absorption UV-visible de la MPO ( $0,56 \mu\text{M}$ ) en absence et en présence de 6-thioguanine en excès 40x ( $22,5 \mu\text{M}$ ). La 6-thioguanine est ajoutée à la solution de MPO. Après une incubation de 15 minutes, du peroxyde d’hydrogène est ajouté ( $28 \mu\text{M}$ ) pour déclencher le cycle de peroxydase.

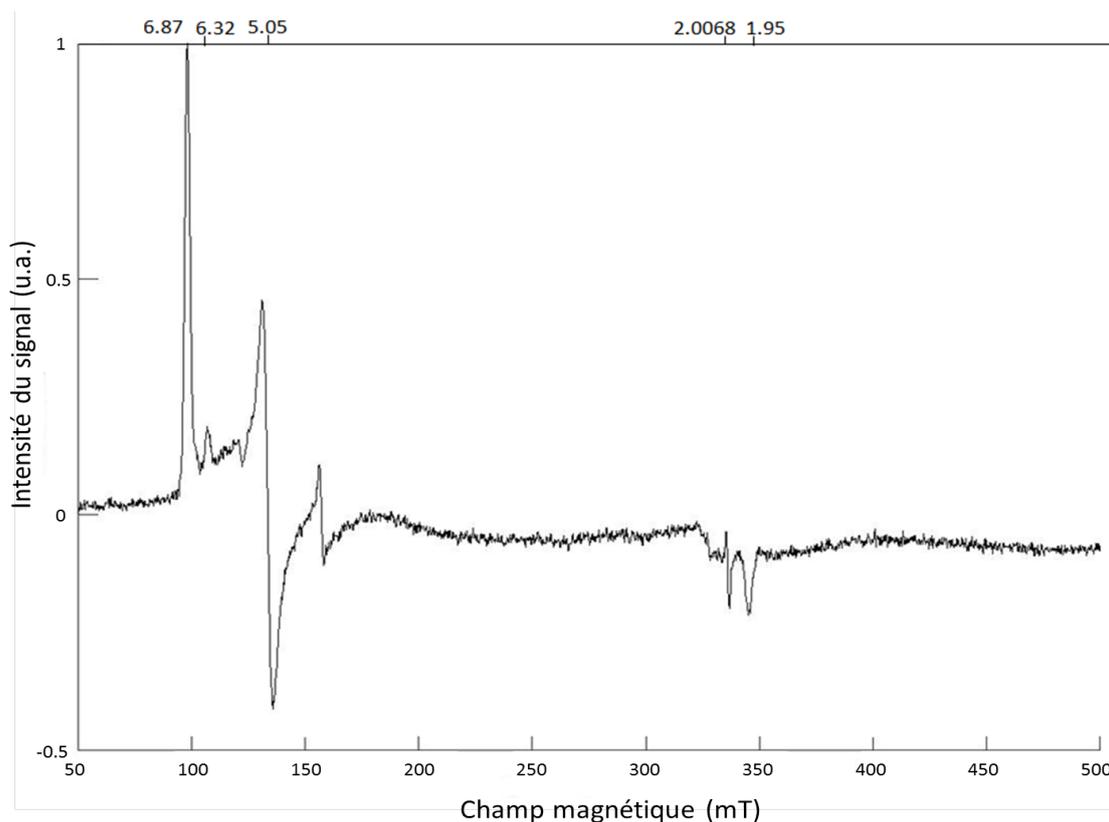


FIGURE 5.51 – Spectre RPE de la MPO native ( $60 \mu\text{M}$ ) en présence de 6-thioguanine en excès 10x ( $600 \mu\text{M}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10 K. Le spectre de l’enzyme native présente un signal *high spin* ( $g_z=6,87$ ,  $g_y=5,05$  et  $g_x=1,95$ ).

Par contre, l'induction d'un léger décalage du pic de Soret a déjà été observé en spectroscopie d'absorption suite à l'interaction d'un ligand faible ou intermédiaire, comme l'acide salicylhydroxamique [587] ou l'oxyde nitrique [588]. En effet, ces molécules peuvent se positionner dans le site actif de la MPO afin de former un complexe réversible avec le noyau de fer Fe(III) hexacoordonné. Les résultats obtenus pour la 6-thioguanine grâce à la spectroscopie sont en accord avec ceux acquis grâce au *docking* et au SIEFED. La molécule peut s'insérer dans le site actif, se positionner au-dessus de l'hème et former un complexe avec le fer Fe(III). Ce complexe est réversible et la molécule de 6-thioguanine peut être éliminée du site actif, comme observé avec le lavage du SIEFED.

Ensuite, après une incubation de 15 minutes, du peroxyde d'hydrogène est ajouté au mélange réactionnel MPO-6-thioguanine afin de déclencher le cycle de peroxydase et l'oxydation de la molécule anticancéreuse. Après l'ajout du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le spectre d'absorption se modifie pour donner un spectre stable avec un pic de Soret positionné à 441 nm. Ce spectre est obtenu après une incubation de 10 minutes et reste stable dans le temps. Il ne correspond à aucun composé connu de l'enzyme (composé I 430 nm, composé II 456 nm et composé III 450 nm). Tout comme pour les thioxanthines, la liaison de la 6-thioguanine provoque la formation d'un nouveau composé. En effet, en fonction de la structure des molécules de thioxanthine, le décalage bathochrome du pic de Soret varie mais l'augmentation du pic entre 620 à 630 nm apparaît toujours [163].

Le décalage du pic de Soret vers les plus grandes longueurs d'onde peut se comprendre. En effet, la MPO est caractérisée par un maximum du pic de Soret présentant une valeur plus élevée que celui d'autres peroxydases (peroxydase de raifort : 402 nm [440], lactoperoxydase : 412 nm [589], éosinophile peroxydase : 415 nm [590]). Dans le site actif de la MPO, la contrainte sur l'hème imposée par les liaisons entre la porphyrine et le reste de l'enzyme est plus importante que dans les autres peroxydases. Dans le cas de la MPO, la porphyrine est liée via trois liaisons covalentes : deux liaisons ester, communes pour toutes les peroxydases, et une liaison sulfonium, unique pour la MPO (voir section 1.2.1). Cette liaison supplémentaire augmente la contrainte sur la porphyrine, provoquant sa courbure [375]. Une liaison covalente supplémentaire sur l'hème, via la 6-thioguanine ou une thioxanthine, peut impacter la courbure de l'hème et donc la position du pic de Soret.

Parallèlement à l'étude de la modification du spectre d'absorption de la MPO, l'évolution du spectre de la 6-thioguanine, présentant un maximum d'absorption à 341 nm, a été investiguée (figure 5.52). Après l'ajout du peroxyde d'hydrogène à la solution MPO-6-thioguanine, l'amplitude du pic décroît au cours du temps. Cette diminution montre la transformation de la molécule. Kraske et al. [559], parallèlement à l'étude voltammétrique de la 6-thioguanine, ont étudié l'impact de l'oxydation de la molécule sur son spectre d'absorption. Ils ont montré que lorsque la molécule est oxydée via son atome de soufre, l'amplitude de son spectre d'absorption diminue. L'effet comparable observé à la figure 5.52 montre l'oxydation de la 6-thioguanine par le cycle de peroxydase de la MPO.

Les résultats présentés ici suggèrent la capacité de la 6-thioguanine à se lier de façon covalente à l'enzyme mais ne le prouvent pas. Pour obtenir la confirmation de la modification de la structure hémique de la MPO, une étude de l'hème après interaction avec la 6-thioguanine par chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse a été envisagée en collaboration avec le laboratoire du GIGA Proteomics de l'Université de Liège. Malheureusement, le temps imparti pour la finalisation de ce manuscrit n'a pas permis de pouvoir inclure les résultats.

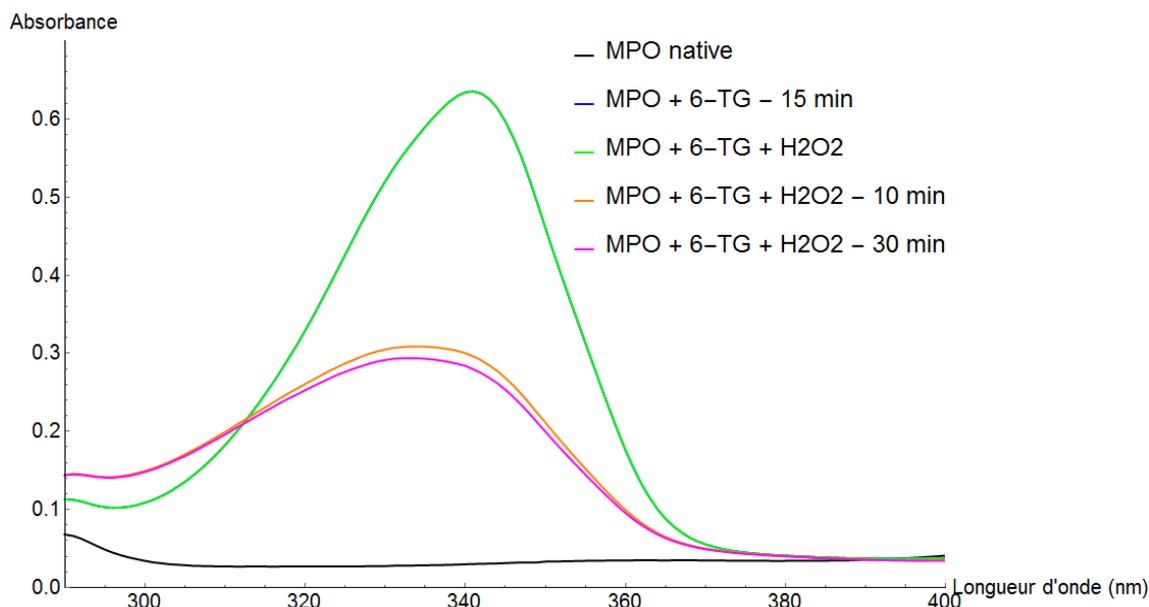


FIGURE 5.52 – Spectres d’absorption UV-visible de la 6-thioguanine ( $22,5 \mu\text{M}$ ) en présence de MPO ( $0,56 \mu\text{M}$ ). La 6-thioguanine est ajoutée à la solution de MPO. Après une incubation de 15 minutes, du peroxyde d’hydrogène est ajouté ( $28 \mu\text{M}$ ) pour déclencher le cycle de peroxydase.

### 5.11.6 Bilan de l’action des molécules anticancéreuses sur la myéloperoxydase

Les six molécules anticancéreuses étudiées présentent des actions inhibitrices variées sur l’activité oxydante de la myéloperoxydase. La cladribine et le 5-fluorouracile ne sont pas des inhibiteurs de l’enzyme, que ce soit par rapport à son cycle de peroxydase ou de chloration. Les deux molécules n’agissent ni en tant que substrat réducteur pour les composés redox de l’enzyme, ni en tant qu’agent anticatalytique bloquant le site actif de l’enzyme. Les deux molécules sont caractérisées par des potentiels redox élevés à pH 7,4. Elles peuvent donc théoriquement réduire le composé I mais pas le composé II. Par conséquent, *in vivo*, elles ne pourront pas inhiber l’oxydation de substrats pour le cycle de peroxydase. En ce qui concerne la chloration, les deux molécules ne peuvent pas entrer en compétition avec les ions chlorure et donc empêcher leur oxydation par le composé I. L’analyse SIEFED montre également l’incapacité des deux composés à former des liaisons au sein du site actif de l’enzyme. L’ensemble de ces résultats met en doute la capacité de la cladribine et du 5-fluorouracile à s’insérer dans la cavité du site actif de la MPO.

En ce qui concerne le melphalan, le potentiel d’oxydoréduction de la molécule peut lui permettre de réduire aussi bien le composé I que le composé II. Cependant, aucune inhibition du cycle de peroxydase n’est observée avec l’analyse classique. Par contre, le melphalan peut réduire l’impact oxydant du cycle de chloration de la MPO. L’ensemble de ces résultats, associés à ceux du SIEFED montrant que la molécule n’est pas capable de former avec l’enzyme un complexe résistant à l’étape de lavage, suggèrent que la molécule est capable de réduire le composé I. De ce fait, elle peut entrer en compétition avec les ions chlorure et inhiber la formation de HOCl. Cette action s’ajoute à la capacité de la molécule à piéger le ROS. Par contre, la valeur élevée du potentiel redox du melphalan n’en fait pas un substrat efficace pour le composé II. C’est pourquoi la molécule ne peut empêcher l’oxydation de la sonde Amplex Red lors de l’analyse classique.

L'hydroxyurée est un faible inhibiteur de l'activité oxydante de la MPO. Seules de fortes concentrations (100  $\mu\text{M}$ ) sont capables de limiter légèrement cette activité. Ce résultat est en accord avec celui acquis par modélisation de l'insertion de la molécule dans le site actif. En effet, une seule solution plaçant la molécule dans le canal d'accès au site, loin de l'hème est obtenue. Cela explique qu'elle ne peut empêcher l'insertion et la liaison du peroxyde d'hydrogène et ainsi inhiber le déclenchement des cycles de chloration et de peroxydase. Enfin, la molécule ne se trouve pas suffisamment près de l'hème pour céder des électrons aux composés I et II et empêcher la formation de HOCl ou de divers radicaux.

Le crizotinib quant à lui est un inhibiteur efficace aussi bien de l'activité de peroxydase que de chloration de la MPO. Il empêche notamment la formation de HOCl, aussi bien à pH acide que basique. Le SIEFED, associé au *docking*, montre également que la molécule est capable de se lier au site actif de l'enzyme. L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'une action principale d'inhibition anticatalytique. En effet, grâce à son insertion dans la cavité du site actif de la MPO et à la formation d'un complexe, le crizotinib peut empêcher, ou en tout cas ralentir, l'insertion d'autres substrats comme le peroxyde d'hydrogène et donc inhiber le déclenchement des cycles de l'enzyme en limitant la formation du composé I. Si la présence et l'encombrement stérique de la molécule dans la cavité n'inhibent pas totalement l'activité de la MPO, un second mécanisme de réduction des composés redox de l'enzyme peut venir s'ajouter. En effet, sur base du potentiel redox obtenu dans ce travail, la molécule peut réduire les composés I et II. Néanmoins, ce potentiel étant seulement légèrement inférieur à celui du composé II, le crizotinib peut être capable de ralentir le retour du composé II vers l'enzyme native et donc le déroulement du cycle entier. Cette hypothèse est à vérifier par une étude de la cinétique de réaction entre le crizotinib et la MPO.

Enfin, la 6-thioguanine est également un inhibiteur intéressant de la myéloperoxydase. En effet, la molécule peut, comme le crizotinib, inhiber efficacement le cycle de chloration et celui de peroxydase. Cependant, contrairement au crizotinib, elle ne peut se lier au site actif de l'enzyme et former un complexe capable de résister à l'étape de lavage du SIEFED. Par conséquent, une première conclusion va dans le sens d'une action inhibitrice en tant que substrat réducteur dans les cycles redox de l'enzyme. La 6-thioguanine peut s'insérer dans la cavité hémique et s'approcher suffisamment près de l'hème pour permettre l'échange d'électrons avec les composés I et II. Cependant, la similitude entre la structure de la 6-thioguanine et celle des thioxanthines (principalement la présence dans les deux types de composés d'un atome de soufre) laissent supposer que la 6-thioguanine puisse, comme les thioxanthines, agir comme inhibiteur irréversible de l'enzyme. En effet, suite à son oxydation, l'état radicalaire de la 6-thioguanine pourrait former une liaison covalente avec la structure porphyrrique de l'hème. Une telle modification permanente de la structure du site actif de l'enzyme provoquerait une inhibition de son activité. Des analyses complémentaires (spectroscopie d'absorption et SIEFED modifié) renforcent cette hypothèse. L'oxydation de la 6-thioguanine augmente son action inhibitrice envers la MPO. De plus, l'interaction entre l'enzyme, la 6-thioguanine et le peroxyde d'hydrogène provoque la modification permanente du spectre d'absorption de l'enzyme, qui n'est caractéristique d'aucun de ses intermédiaires connus. Cette modification, semblable à celle induite par les thioxanthines, peut être associée à une liaison covalente entre la 6-thioguanine et l'hème. Cependant, ces résultats ne sont que des preuves indirectes. En effet, seule la détermination de la structure du potentiel complexe irréversible entre la MPO et la 6-thioguanine grâce à la co-cristallisation permettrait de prouver la liaison réelle entre l'anticancéreux et l'enzyme. Le temps nécessaire ainsi que le coût de l'enzyme ont constitué des freins qui n'ont pas permis sa réalisation dans le cadre de ce travail.

## 5.12 Conclusion

Le développement de tumeurs cancéreuses est étroitement lié au phénomène inflammatoire. Le stress oxydant induit par un état inflammatoire perdurant dans le temps augmente le risque d'apparition de mutations cellulaires. D'autre part, le micro-environnement des cellules cancéreuses, ainsi que la libération par celles-ci de médiateurs chimiques, sont propices au recrutement de cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophages, PMNs), dont la stimulation provoque des conditions favorables à la migration des cellules cancéreuses dans le reste de l'organisme et au développement de métastases. Cependant, dans certaines conditions, l'inflammation peut également représenter un mécanisme de défense contre l'invasion des tissus par les cellules cancéreuses. C'est pourquoi deux stratégies antagonistes coexistent dans le traitement du cancer, la stimulation du système immunitaire, notamment via l'immunothérapie, et l'inhibition du système immunitaire.

Le traitement des pathologies inflammatoires chroniques représente une première stratégie préventive contre le développement de cancers. D'autre part, des études s'intéressent à l'effet synergique qu'offre la prise d'anti-inflammatoires parallèlement à un traitement de chimiothérapie. De nombreuses molécules, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les polyphénols,..., montrent aussi différentes propriétés antitumorales. Il serait également intéressant d'inverser le raisonnement et d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de molécules anticancéreuses. Dans le cadre de cette étude, six d'entre elles ont été choisies : l'hydroxyurée, la 6-thioguanine, le melphalan, le crizotinib, la cladribine et le 5-fluorouracile. Elles ont été analysées pour leur action possiblement antioxydante et immunomodulatrice sur les PMNs et la myéloperoxydase.

La 6-thioguanine et le crizotinib ont montré une capacité significative de piégeage de radicaux. Ces molécules présentent toutes les deux une capacité antioxydante importante grâce, notamment, à leur habileté à piéger l'anion superoxyde ainsi que l'acide hypochloreux. Le crizotinib capture également de façon très efficace l'oxygène singulet, ce qui n'est pas le cas de la 6-thioguanine.

Grâce à sa capacité à piéger l'anion superoxyde, la 6-thioguanine peut, à des concentrations comparables à celles physiologiques, mesurées dans le sang de patient, diminuer de façon significative l'impact oxydant de la flambée respiratoire de PMNs activés. En effet, en réduisant cette espèce réactive de l'oxygène, la molécule peut empêcher la formation d'autres ROS telles que le peroxyde d'hydrogène. La 6-thioguanine peut inhiber directement la formation de l'anion superoxyde par les cellules lorsque le temps d'incubation est suffisamment long. Cette inhibition, n'étant pas associée à l'induction de la mort cellulaire, elle doit être liée à une interaction avec le complexe NADPH oxydase. La molécule intervient-elle au niveau des sous-unités cytosoliques ou membranaires ? Empêche-t-elle le processus de migration des sous-unités, la formation du complexe, ou alors agit-elle au niveau de l'échange d'électrons nécessaire à la réduction de l'oxygène en anion superoxyde ? Enfin, l'entrée de la 6-thioguanine dans les cellules induit sa métabolisation et donc la production de ses formes nucléotides. Celles-ci sont-elles reliées au mécanisme d'inhibition ? Des études complémentaires seront nécessaires pour obtenir des éléments de réponse.

La 6-thioguanine ne perturbe pas la dégranulation de la myéloperoxydase par les PMNs. Cependant, aux concentrations plasmatiques, elle représente un inhibiteur très efficace de l'activité oxydante de l'enzyme, aussi bien du cycle de chloration que de peroxydase. L'ensemble des résultats obtenus vont dans le sens d'un mode d'action en tant que substrat réducteur des composés redox de l'enzyme. La molécule est capable de s'insérer dans la cavité et de s'approcher suffisamment près du site actif pour permettre l'échange d'électrons. Des premiers éléments de preuve suggèrent la capacité de liaison de la 6-thioguanine dans le site. En effet, la molécule pourrait présenter un mode d'action irréversible semblable à celui des thioxan-

thines. La présence d'un atome de soufre, lorsque la molécule est passée à l'état radicalaire (oxydée par les cycles de l'enzyme) permet la formation d'une liaison covalente avec la structure porphyrique. Cette hypothèse doit cependant toujours être confirmée. La détermination de la structure du complexe MPO-6-thioguanine par co-cristallisation semble le moyen le plus approprié pour cela.

La 6-thioguanine est utilisée comme traitement des pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin. Jusqu'à présent, on supposait que la métabolisation de la molécule était indispensable à son action immunosuppressive. En effet, les formes nucléotides de la molécule induisent l'apoptose des lymphocytes. Cependant, les résultats de cette étude indiquent que d'autres mécanismes antioxydants et immunomodulateurs sont également à considérer. La 6-thioguanine extracellulaire native peut piéger une série d'espèces oxydantes (radicaux et ROS) mais également inhiber efficacement et de façon potentiellement irréversible l'activité de la MPO.

A haute concentration, le crizotinib est cytotoxique pour les PMNs. Il inhibe de ce fait la flambée respiratoire et la production d'anions superoxydes. A des concentrations plus faibles, s'approchant de celles atteintes dans le sang de patients, le crizotinib réduit l'impact oxydant des PMNs en agissant comme piègeur de l'anion superoxyde et en empêchant la production d'autres ROS. L'induction de la mort cellulaire provoque la libération du contenu enzymatique des granules cytosoliques dans le milieu extracellulaire. Cet effet peut être considéré comme une stimulation de la dégranulation de la MPO. Par conséquent, bien que la molécule soit un inhibiteur très efficace des cycles de chloration et de peroxydase de l'enzyme en agissant principalement comme agent anticatalytique, cette inhibition sera probablement contrebalancée *in vivo* par la forte libération de l'enzyme. L'analyse SIEFED réalisée sur la MPO dégranulée par les PMNs activés confirme cette hypothèse. A une concentration physiologique, aucune inhibition significative n'est observée. Cependant, la molécule pourrait malgré tout agir comme piègeur de radicaux et de ROS.

Le melphalan agit comme piègeur de l'oxygène singulet et de l'acide hypochloreux. Cependant, il ne piège pas l'anion superoxyde et n'inhibe par sa production par des PMNs activés. De même, la molécule ne peut pas empêcher leur phénomène de dégranulation et donc la libération de MPO. Les résultats obtenus suite aux différentes analyses effectuées vont dans le sens de potentielles interactions et inhibitions du cycle de chloration de l'enzyme, à pH acide et basique. Cependant, les informations récoltées grâce au SIEFED réalisé sur la MPO dégranulée sont surprenantes car elles suggèrent une insertion et une liaison du melphalan dans le site actif de l'enzyme, en contradiction avec les autres résultats. Dans des conditions proches de l'*in vivo*, c'est-à-dire avec la présence de l'ensemble du contenu des granules cytosoliques des PMNs, il semblerait qu'un ou plusieurs autres intermédiaires puissent intervenir et permettre l'inhibition de l'activité de la MPO. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action et évaluer un réel impact positif du melphalan en tant qu'inhibiteur de la MPO.

L'hydroxyurée peut agir en tant que piègeur de radicaux libres et du HOCl. La molécule est capable de réduire légèrement l'activité de peroxydase de l'enzyme uniquement à une concentration de l'ordre de 100  $\mu\text{M}$ , concentration pouvant être atteinte dans le plasma d'un patient.

Enfin, la cladribine ainsi que le 5-fluorouracile ne modulent pas l'activité oxydante des PMNs, que ce soit en piégeant les ROS produits par ceux-ci ou en inhibant la myéloperoxydase qu'ils libèrent.





## Chapitre 6

# Statines

Les statines appartiennent à la famille des hypolipidémians. Ce sont des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), une oxydoréductase essentielle au processus de synthèse du cholestérol au niveau des hépatocytes. Les statines sont utilisées pour réduire le taux de cholestérol plasmatique, plus précisément le cholestérol LDL (Low-Density-Lipoprotein). Elles se lient au site actif de l'enzyme, modifient sa conformation et empêchent l'accès du substrat naturel (le HMG-CoA) ainsi que sa transformation en acide mévalonique, précurseur du cholestérol [591, 592]. Elles permettent, par conséquent, de réduire le risque de maladies cardio-vasculaires liées à l'accumulation de cholestérol au niveau des parois des vaisseaux (infarctus, AVC, athérosclérose, ...). Les statines font partie des médicaments hypolipidémians les plus efficaces et les plus prescrits. Ils sont notamment appréciés pour leur bonne tolérance par l'organisme. [591]

La première statine, la mévastatine ou compactine, a été isolée pour la première fois en 1973 à partir de la fermentation de champignons *Penicillium citrinum*. Elle a été étudiée comme réducteur potentiel de la cholestérolémie fin des années 70 [593]. Il a fallu attendre 1987 pour que les laboratoires Merck commercialisent une nouvelle statine, la lovastatine, extraite d'une souche de levure (*Aspergillus terreus*) [594]. La molécule avait démontré une capacité à diminuer significativement le taux de LDL plasmatique chez des animaux [595, 596] et chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie, sans induire d'effets indésirables [597, 598]. Par la suite, d'autres statines ont été découvertes et synthétisées. Il en existe neuf au total : la mévastatine, la lovastatine, la pravastatine et la simvastatine, d'origine fongique, ainsi que l'atorvastatine, la cérivastatine, la rosuvastatine, la fluvastatine et la pitavastatine, purement synthétiques. La cérivastatine a été retirée du marché en 2001, suite à l'observation de cas de rhabdomyolyse (dégradation des tissus musculaires squelettiques) et d'insuffisance rénale [599].

Les statines représentent un marché essentiel pour l'industrie pharmaceutique. En 2013, il était estimé à 40 milliards de dollars et environ 200 millions de personnes prenaient des statines quotidiennement dans le monde [600]. En 2020, on estime qu'environ un quart de la population belge de plus de 40 ans en consomme [601]. C'est pourquoi, de nouvelles recherches liées aux statines voient régulièrement le jour. En effet, la possibilité de pouvoir associer de nouvelles propriétés thérapeutiques à leur action hypolipidémiant originelle représente un intérêt majeur.

## 6.1 Structure et propriétés physico-chimiques

Dans leur structure, toutes les statines présentent une séquence analogue au HMG-CoA, le substrat de la HMG-CoA réductase. Plus précisément, cette séquence est composée de différents cycles et possède une conformation spatiale reproduisant celle du substrat. A cette séquence analogue est liée une chaîne complexe hydrophobe sur laquelle se greffent différents groupements chimiques, qui vont impacter la solubilité de la molécule. Cette chaîne permet la liaison avec le site actif de la HMG-CoA réductase. [594] Les neuf statines sont divisées en deux groupes suivant leur structure.

La pravastatine, la lovastatine, la mévastatine et la simvastatine, statines d'origine naturelle, sont reprises dans le premier (figure 6.1). Ces molécules comportent une structure bicyclique, sur laquelle sont attachées deux chaînes comportant différents substituants [592].

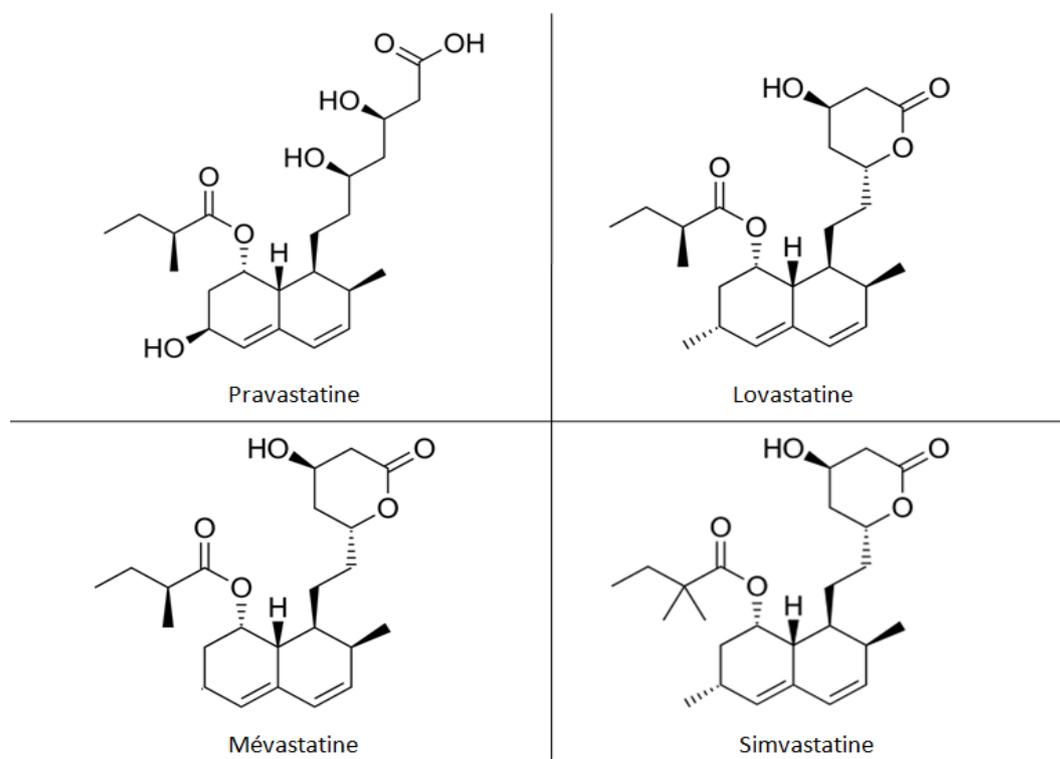


FIGURE 6.1 – Structure des statines d'origine naturelle.

L'atorvastatine, la rosuvastatine, la cérivastatine, la fluvastatine et la pitavastatine, statines de synthèse reprises dans un second groupe, ont une structure plus variable (figure 6.2). Elles contiennent un groupement fluorophényle [592].

Toutes les statines sont solubles dans des solvants organiques comme le DMSO. La pravastatine est également soluble dans l'eau. Elles ont des masses molaires comprises entre 404,5 g/mol pour la lovastatine et 558,6 g/mol pour l'atorvastatine (figure 6.3).

## 6.2 Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

Toutes les statines, à l'exception de la lovastatine et de la simvastatine, sont administrées sous leur forme active. La lovastatine et la simvastatine le sont quant à elles sous forme de pro-drogue et doivent par conséquent être hydrolysées *in vivo*. Les statines sont administrées par

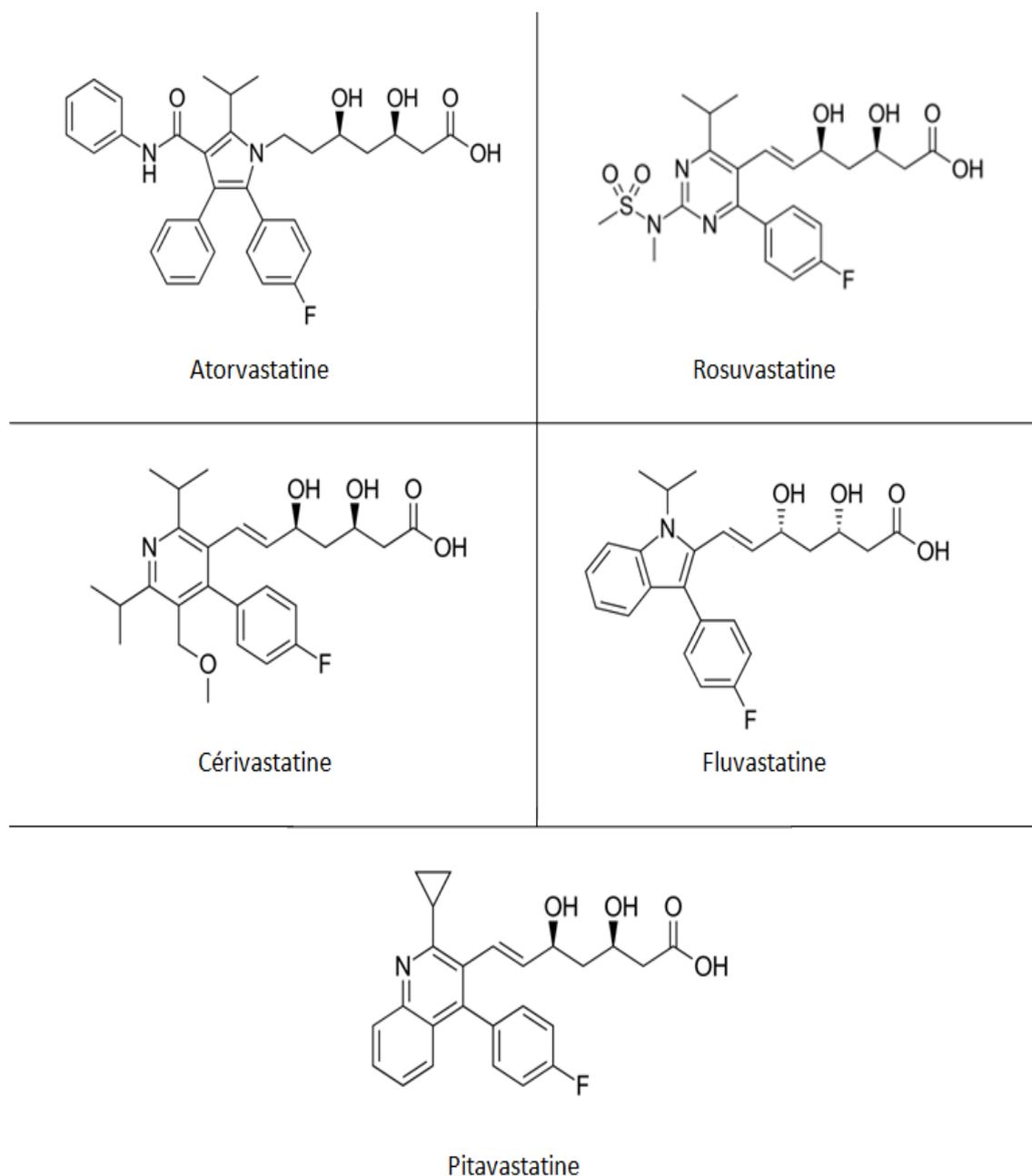


FIGURE 6.2 – Structure des statines d'origine synthétique.

voie orale et la posologie varie entre 5 et 80 mg par jour [606]. Leur absorption par l'organisme est rapide. Le délai nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale ainsi que sa valeur varient en fonction des statines et du dosage. Par exemple, pour la rosuvastatine, une dose de 80 mg induit une concentration plasmatique maximale d'environ 100 nM après 3-5 heures [607, 608]. Une dose de 40 mg de pravastatine engendre une concentration plasmatique d'environ 150 nM après une heure [609], tandis qu'une dose équivalente de simvastatine induit une concentration plasmatique dix fois plus faible après le même intervalle de temps [610]. Pour l'atorvastatine, la concentration plasmatique atteint environ 28 nM moins d'une heure après l'administration d'une dose de 40 mg [611].

	Formule moléculaire	Masse molaire (g/mol)	Biodisponibilité (%)	Demi-vie (h)	Métabolisme (CYP 450 isoformes)
Atorvastatine	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558,64	12	14	CYP 450 3A4
Rosuvastatine	$C_{22}H_{28}FN_3O_6S$	481,54	20	19	/
Cérvastatine	$C_{26}H_{34}FNO_5$	459,55	60	2,5	CYP 450 2C8
Fluvastatine	$C_{24}H_{26}FNO_4$	411,47	24	1,2	CYP 450 2C9
Pitavastatine	$C_{25}H_{24}FNO_4$	421,5	51	12	glucuronidation
Lovastatine	$C_{24}H_{36}O_5$	404,54	5	3	CYP 450 3A4
Mévastatine	$C_{23}H_{34}O_5$	408,53	?	?	?
Pravastatine	$C_{23}H_{36}O_7$	424,53	18	1,8	glucuronidation
Simvastatine	$C_{25}H_{38}O_5$	418,57	5	2	CYP 450 3A4

FIGURE 6.3 – Propriétés des statines. [594, 602, 603, 604, 605]

Les statines agissent au niveau des hépatocytes du foie. Elles entrent en compétition avec l'HMG-CoA pour interagir avec l'enzyme HMG-CoA réductase. Le groupement chimique des statines, analogue à celui du HMG-CoA, leur permet d'interagir avec le site actif de l'enzyme, de modifier sa conformation en s'y liant, et ainsi d'inhiber la transformation du HMG-CoA en acide mévalonique. En empêchant la formation de ce précurseur, les statines impactent une étape importante de la synthèse du cholestérol et diminuent ainsi drastiquement la concentration en cholestérol intracellulaire. Cette diminution induit également une série de mécanismes permettant l'augmentation de l'incorporation des LDL par les hépatocytes via l'augmentation du nombre de récepteurs au niveau membranaire. Les statines peuvent donc impacter et réduire la concentration de LDL circulant dans le sang. [591, 594]

Le foie est également le lieu du métabolisme des statines. A l'exception de la pravastatine, de la rosuvastatine et de la pitavastatine, elles sont métabolisées par différentes isoformes du cytochrome P450 (figure 6.3). L'effet de premier passage hépatique est important et limite la biodisponibilité des molécules. Les statines ont un temps de demi-vie égal ou inférieur à trois heures, à l'exception de l'atorvastatine et de la rosuvastatine, caractérisées par des temps de demi-vie respectifs de 14 et 19 heures (figure 6.3). Les statines qui ont une demi-vie d'élimination courte doivent être administrées préférentiellement le soir quand le taux de synthèse du cholestérol dans le foie est le plus élevé. Les statines sont majoritairement éliminées via la bile produite par le foie et donc par voie digestive. La rosuvastatine et la pravastatine sont également partiellement éliminées par voie rénale. [591, 594]

### 6.3 Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

En raison de leur action hypocholestérolémiante, les statines ralentissent la progression de l'athérosclérose, voire provoquent sa régression et stabilisent la plaque d'athérome [612, 613]. Mais d'autres mécanismes d'action, notamment anti-inflammatoire, sont également impliqués dans l'action des statines sur la plaque d'athérome.

Par exemple, la pravastatine réduit le taux plasmatique de la protéine C réactive (CRP), marqueur de l'inflammation libéré par les hépatocytes suite à leur stimulation par différentes cytokines pro-inflammatoires [594, 614]. La simvastatine et la fluvastatine inhibent la liaison des PMNs aux cellules endothéliales en réduisant l'expression de glycoprotéines, les sélectines, à la surface de ces cellules [594, 615]. La lovastatine et la simvastatine sont capables de réduire l'expression d'une intégrine CD11b sur la surface de nombreux leucocytes (monocytes, PMNs, macrophages,...). Cette intégrine régule leur adhésion à l'endothélium et leur migration vers les zones inflammatoires. [591, 594] Différentes statines, atorvastatine, pitavastatine, simvastatine et fluvastatine, réduisent la production de cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1, ...) essentielles dans le recrutement et l'accumulation de monocytes et PMNs dans les lésions athéroscléreuses [594].

Il a été montré que la pravastatine, l'atorvastatine, la simvastatine et la fluvastatine ont une capacité de capture des radicaux hydroxyles et peroxydes, comparable, voire supérieure à celle de l'acide urique ou du trolox [616]. L'atorvastatine réduit l'inflammation allergique des voies aériennes chez la souris [617]. Elle inhibe la production de ROS *in vitro* et *in vivo* chez le rat, en réduisant l'expression de l'ARNm des sous-unités de la NADPH-oxydase NOX1 [618]. La pravastatine est capable de protéger les érythrocytes contre le stress oxydatif, grâce à son action de piégeage de ROS [619]. Cette action fournit également une protection vasculaire *in vitro* [620].

Grâce à leur aptitude à traverser la barrière hémato-encéphalique, les statines possèdent également des propriétés neuroprotectrices, en réduisant l'activation de la microglie, les cellules immunitaires du système nerveux central [621]. En effet, les statines inhibent des médiateurs pro-inflammatoires et activent des médiateurs anti-inflammatoires, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, l'atorvastatine réduit l'invasion des tissus par les PMNs et les lymphocytes T, la production de cytokines et l'apoptose neuronale [622]. La simvastatine diminue l'infiltration des PMNs dans les tissus cérébraux à la suite d'une hémorragie induite chez le rat, notamment en accélérant l'apoptose des PMNs [623]. La lovastatine provoque également l'apoptose des PMNs dans d'autres modèles animaux comme le poisson-zèbre, en inhibant deux voies de signalisation cellulaire (ERK et AKT) [624]. Enfin, les statines restreignent la croissance cellulaire, voire entraînent l'apoptose de diverses lignées cancéreuses (cerveau [625], poumon [626], sein [627], pancréas [628]).

## 6.4 Choix des statines

Les statines ont fait l'objet de nombreuses recherches et ont démontré des propriétés antioxydantes ainsi qu'une efficacité contre l'athérosclérose. Il était par conséquent intéressant de poursuivre l'étude de leur impact sur l'inflammation en investiguant leur action potentiellement inhibitrice sur différents mécanismes des leucocytes neutrophiles (PMNs) comme la production d'anions superoxydes ou encore la libération de la myéloperoxydase. Les statines peuvent-elles également réduire, voire inhiber l'action oxydante de l'enzyme, c'est-à-dire empêcher le déroulement de ses cycles de chloration et de peroxydase ?

Parmi l'ensemble des statines existantes, six d'entre elles ont été sélectionnées sur base des résultats obtenus par modélisation moléculaire. En effet, le programme de *docking* GOLD a été utilisé afin de modéliser l'insertion des différentes molécules au sein de la cavité du site actif de la MPO et de déterminer l'établissement de liaisons entre l'enzyme et l'inhibiteur. Le nombre de solutions obtenues par l'algorithme, la structure de l'inhibiteur et celle du complexe

formé, ainsi que les liaisons potentielles avec les acides aminés ont permis de sélectionner les statines présentant un intérêt pour une étude plus approfondie.

En effet, la structure et la taille des statines, imposantes par rapport aux dimensions de la cavité du site actif de la MPO, sont des critères qui vont fortement influencer l'insertion et le positionnement des molécules dans cette cavité. En outre, l'établissement réel de liaisons entre un ligand et des acides aminés situés plus profondément dans la cavité, là où la structure de l'enzyme est plus rigide, est plus probable qu'avec des éléments de l'enzyme situés plus à l'extérieur de sa structure. Enfin, la proposition d'un grand nombre de complexes par le programme de *docking* illustre la difficulté pour l'algorithme de trouver une conformation qui satisfait ses différents critères de minimisation de l'énergie du complexe MPO-ligand et rend la formation réelle de ces différents complexes moins probable.

La synthèse des résultats obtenus pour les neuf statines est reprise ci-dessous.

### 6.4.1 Statines naturelles

#### a) Pravastatine :

Le programme GOLD fournit quatre solutions pour le complexe MPO-pravastatine, dont la solution la plus fréquente et la plus probable (38% d'occurrence) est illustrée dans la figure 6.4. La molécule vient s'insérer entre les deux chaînes secondaires d'acide propanoïque de l'hème. La structure bicyclique est positionnée au-dessus et en avant de l'hème. Le cycle présentant un groupement hydroxyle est positionné au-dessus du pyrrole D de l'hème. Dans cette configuration, une liaison hydrogène est possible entre l'histidine 95 et le groupement hydroxyle. Il existe également une possibilité de former une liaison hydrogène entre la chaîne principale de la statine et la chaîne secondaire d'acide propanoïque de l'hème ainsi qu'avec l'arginine 424 et l'acide glutamique 102.

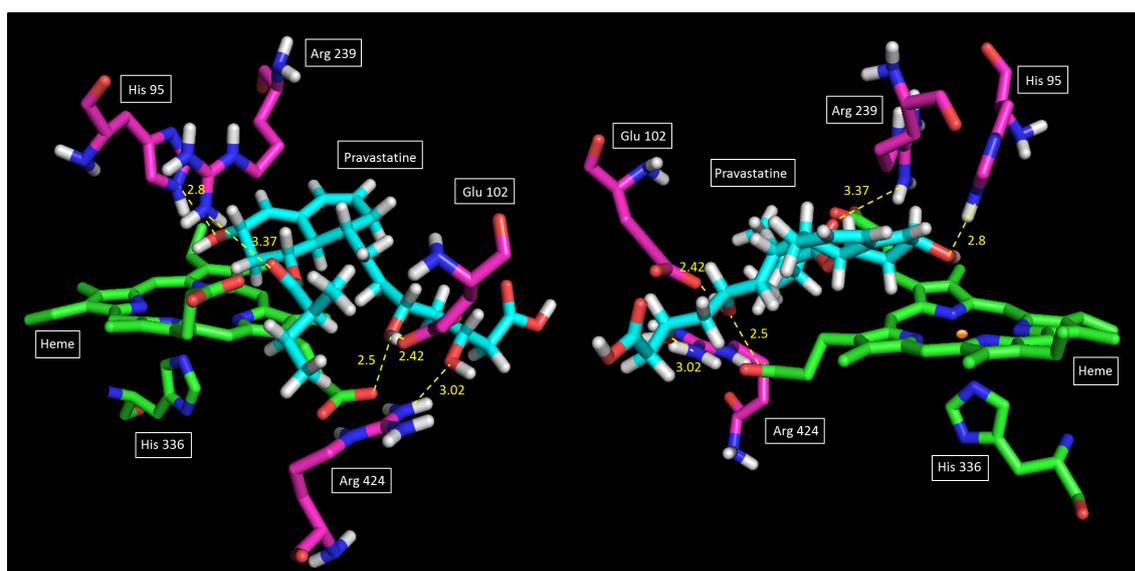


FIGURE 6.4 – Solution la plus probable du complexe MPO-pravastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

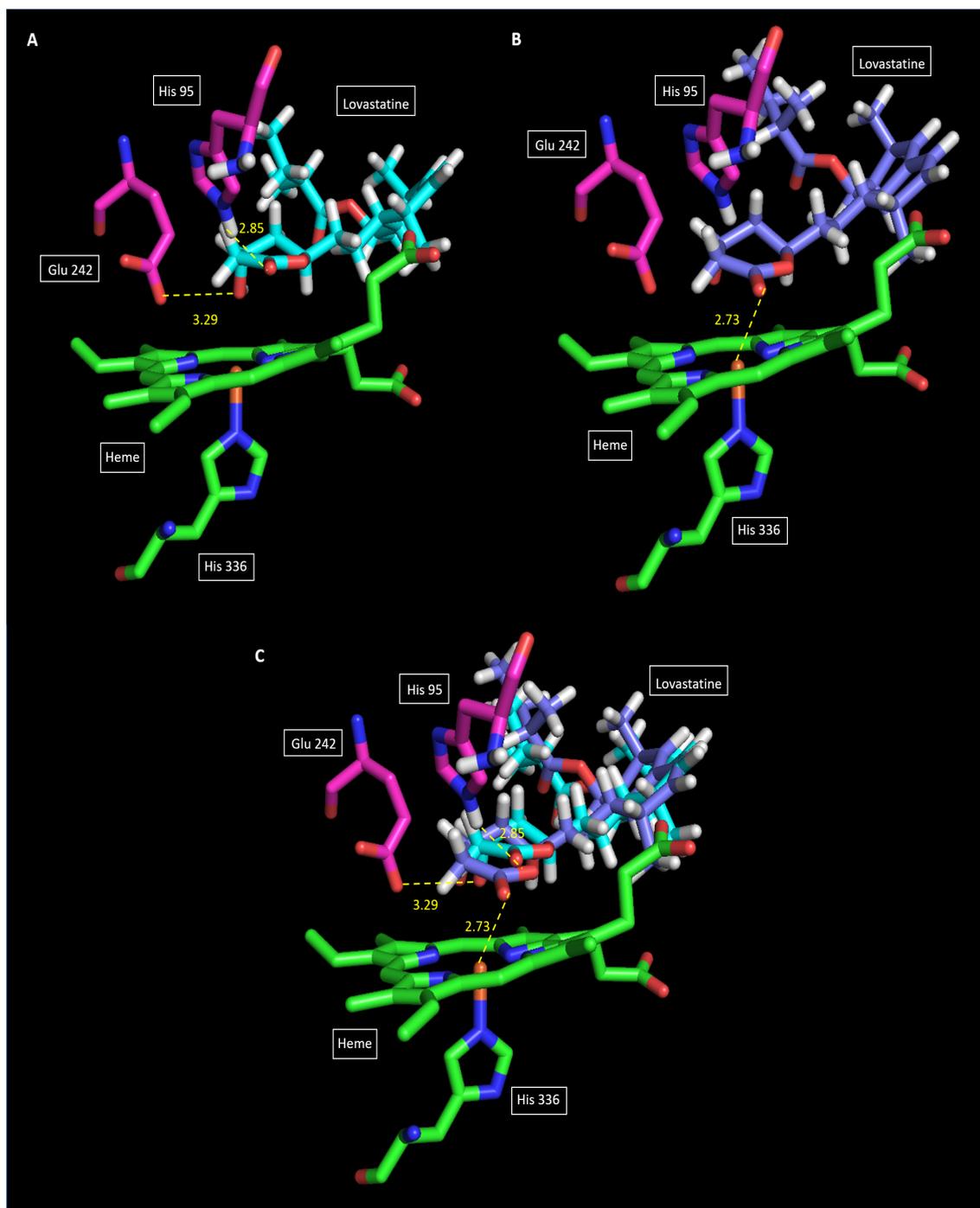


FIGURE 6.5 – Solution la plus probable du complexe MPO-lovastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

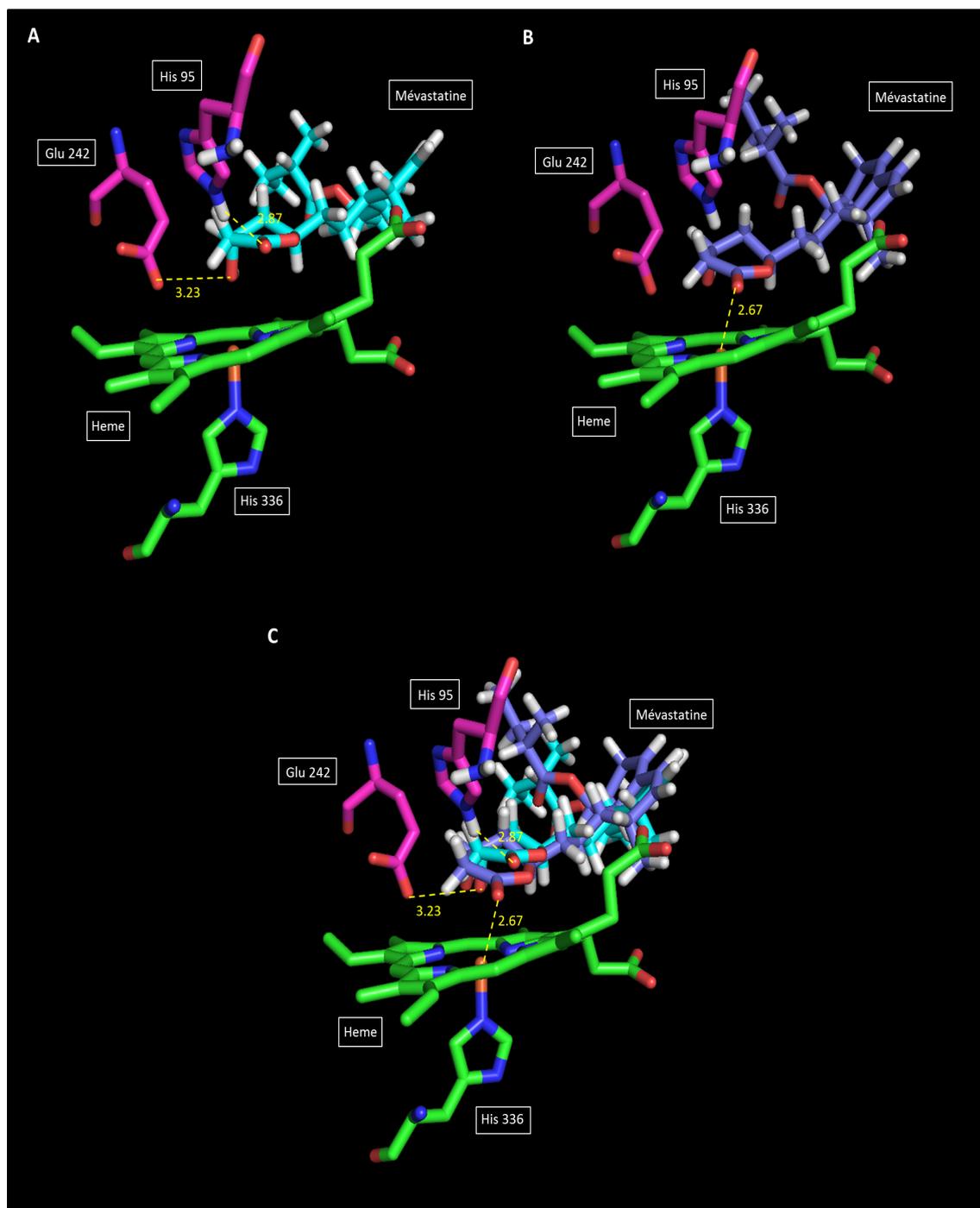


FIGURE 6.6 – Solution la plus probable du complexe MPO-lovastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

b) Lovastatine :

Le programme GOLD fournit une solution principale (80% d'occurrence) pour le complexe MPO-lovastatine, illustrée à la figure 6.5, ainsi que cinq autres complexes obtenus à une seule reprise sur l'ensemble des simulations réalisées. Leur probabilité d'existence est donc faible. Dans le complexe le plus probable, le cycle pyrane est placé au-dessus du cycle pyrrole D de l'hème. Le reste de la molécule et sa partie bicyclique notamment sont positionnées dans le canal d'entrée de la cavité hémique. Dans cette configuration, l'oxygène doublement lié au

cycle pyrane peut former un pont hydrogène soit avec l’histidine 95 située au-dessus de l’hème (figure 6.5 A), soit avec le noyau de fer au coeur de la structure porphyrique (figure 6.5 B), en fonction de l’inclinaison du cycle par rapport au plan de l’hème. Le positionnement parallèle du cycle par rapport à l’hème favorise l’interaction avec l’histidine tandis qu’une légère inclinaison vers l’hème privilégie la liaison avec le fer (figure 6.5 C). La solution permettant la liaison avec l’histidine est légèrement plus représentée dans l’ensemble. Il est également important de ne pas négliger une partie des solutions qui positionnent le cycle pyrane de façon intermédiaire entre les deux solutions décrites ci-dessus. Dans cette configuration, aucune liaison avec l’enzyme n’est observée. Une liaison d’un ligand avec l’histidine 95 ou le noyau de fer est intéressante pour son action inhibitrice. En effet, grâce à cette liaison, la molécule peut empêcher l’interaction du peroxyde d’hydrogène avec l’enzyme et bloquer le déclenchement de son cycle de peroxydase ou de chloration.

c) Mévastatine :

La mévastatine possède une structure identique à celle de la lovastatine à l’exception de l’absence d’un groupement méthyle sur le cycle naphthalène. Parmi plusieurs formes du complexe MPO-mévastatine, GOLD fournit une solution majoritaire (86% d’occurrence) identique à celle de la lovastatine. Le cycle pyrane est placé au-dessus du cycle pyrrole D de la structure hémique et le reste de la molécule est situé dans le canal d’entrée du site actif. Une liaison hydrogène est possible entre la mévastatine et l’histidine 95 (figure 6.6 A) ou le noyau de fer (figure 6.6 B) en fonction de l’inclinaison du cycle pyrane. Comme pour la lovastatine, parmi l’ensemble des solutions ayant cette configuration, une faible majorité permet la liaison avec l’histidine et de façon identique, d’autres solutions se trouvent dans une configuration intermédiaire, ne permettant pas de liaisons que ce soit avec le noyau de fer ou l’histidine 95. La similitude des solutions entre la mévastatine et la lovastatine est logique en raison de l’analogie des structures. La présence ou non du groupement méthyle différenciant les deux molécules n’a pas d’impact sur leur encombrement stérique et sur leur capacité de liaison avec l’enzyme.

d) Simvastatine :

La simvastatine possède une structure presque identique à celle de la lovastatine ou de la mévastatine. En effet, seul un second groupe méthyle est présent sur la chaîne butanoate. Cependant, des complexes MPO-statine assez différents ont été proposés par GOLD. Cinq types de complexes quasi équiprobables ont été obtenus. Il est donc difficile de privilégier une solution parmi cet ensemble. Néanmoins, dans la majorité des solutions, une similitude ressort concernant le positionnement du cycle pyrane entre les deux chaînes d’acide propanoïque de l’hème. Dans cette configuration (figure 6.7), le groupement hydroxyle situé sur le cycle est capable de former une liaison hydrogène avec une des chaînes d’acide propanoïque ainsi qu’avec l’acide glutamique 102. Aucune liaison hydrogène avec l’histidine 95 ou le noyau de fer n’est possible.

### 6.4.2 Statines synthétiques

a) Atorvastatine :

GOLD propose une solution principale (75% d’occurrence) pour le complexe MPO-atorvastatine. L’encombrement stérique de la structure composée de quatre cycles l’empêche de s’insérer entre le plan de l’hème et l’histidine 95 et d’interagir avec cette dernière et/ou le noyau de fer. La solution positionne la structure cyclique à l’entrée du site actif, devant l’hème. Elle

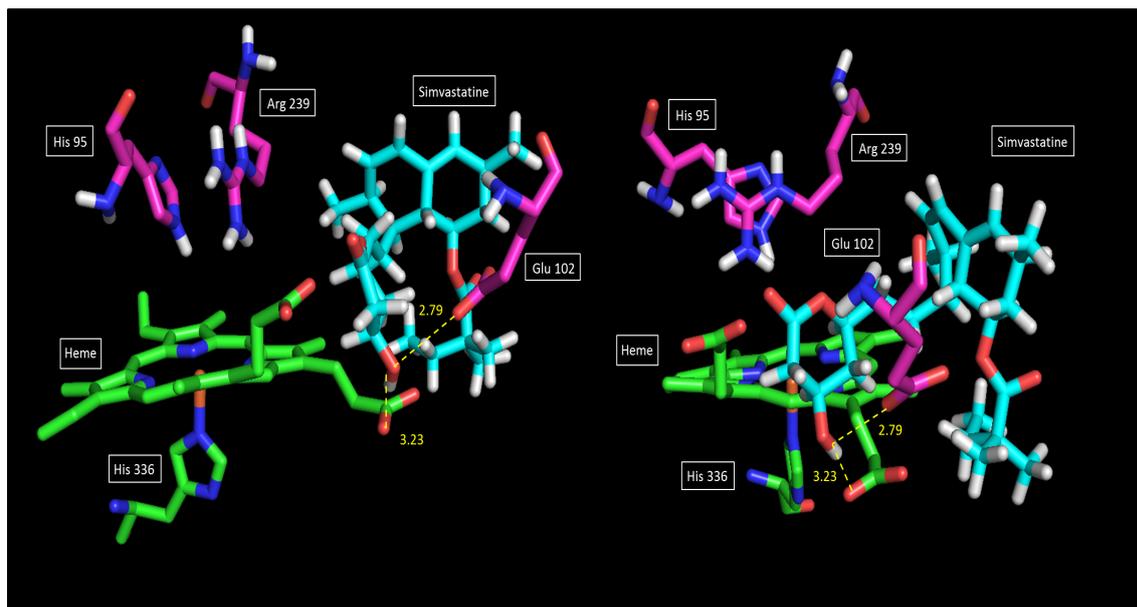


FIGURE 6.7 – Solution la plus probable du complexe MPO-simvastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

(figure 6.8) place la chaîne carbonée d'acide carboxylique de la molécule entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème. Une liaison hydrogène est possible entre une de celles-ci et le second groupement hydroxyle de la chaîne carbonée de l'atorvastatine. Les deux oxygènes de la fonction acide carboxylique peuvent former une liaison hydrogène avec la thréonine 100 et la sérine 149.

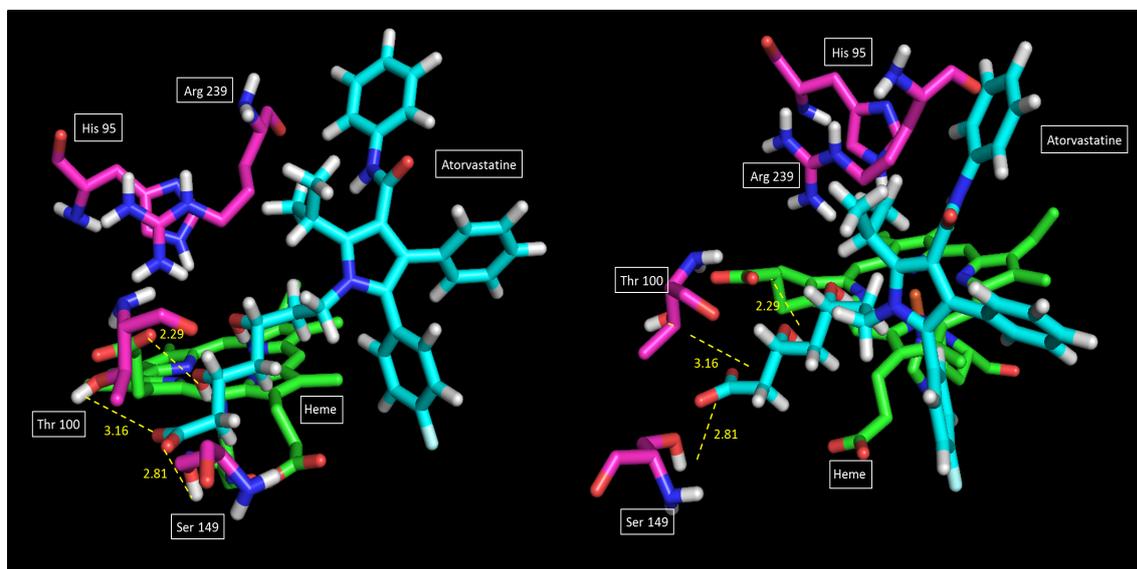


FIGURE 6.8 – Solution du complexe MPO-atorvastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

## b) Rosuvastatine :

La rosuvastatine possède une particularité structurale par rapport aux huit autres statines, la présence d'un atome de soufre. Six complexes MPO-rosuvastatine sont proposés par le programme de modélisation. Parmi ceux-ci, deux solutions plus fréquemment obtenues et donc plus probables sortent du lot. La première (42% d'occurrence) (figure 6.9) place l'atome de soufre, lié à deux atomes d'oxygène, au-dessus de l'hème, ce qui permet la formation d'un pont hydrogène entre un des atomes d'oxygène et l'histidine 95 ou l'acide glutamique 91. La chaîne carbonée du ligand est positionnée dans le canal d'entrée du site actif.

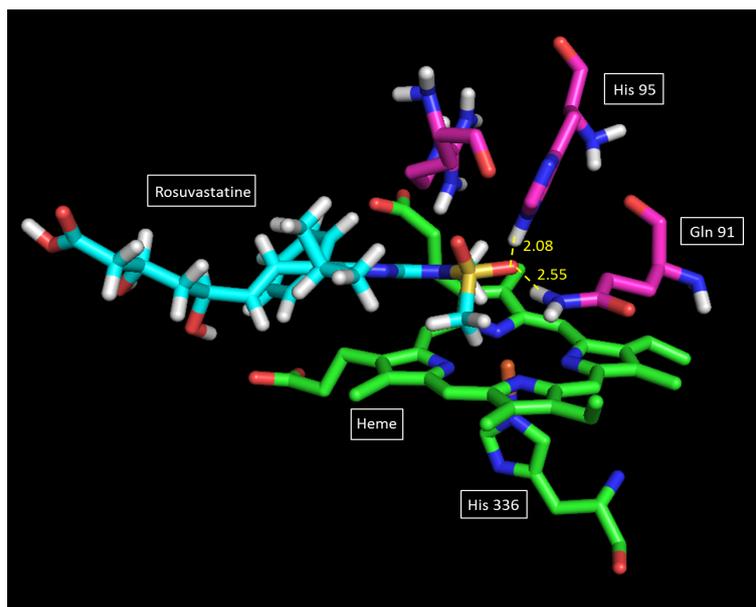


FIGURE 6.9 – Première solution du complexe MPO-rosuvastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

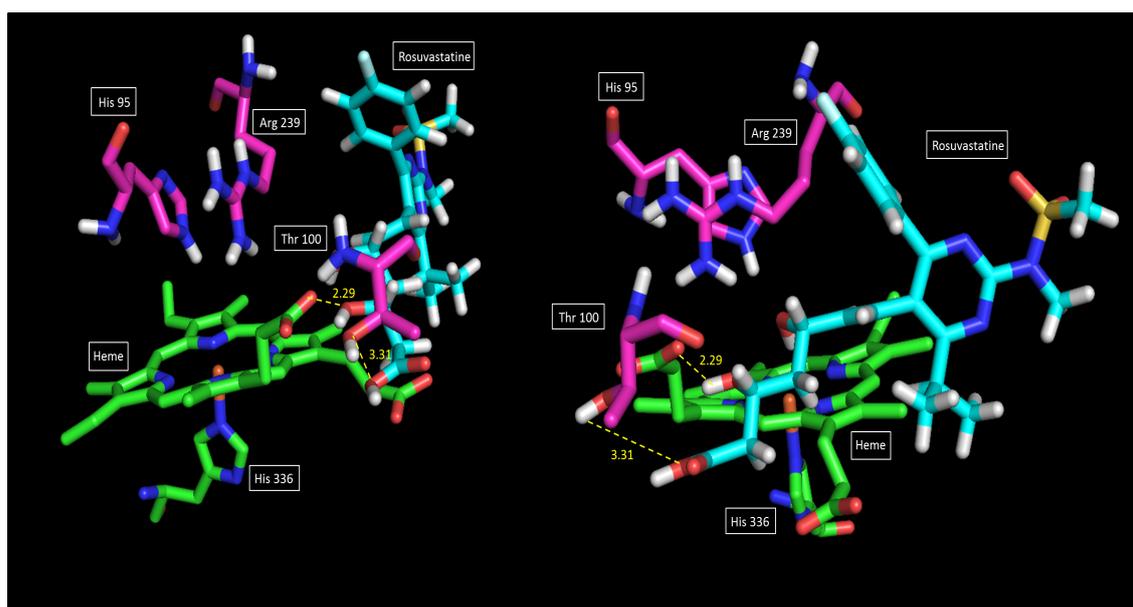


FIGURE 6.10 – Deuxième solution du complexe MPO-rosuvastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

Dans la seconde solution (17% d'occurrence) (figure 6.10), la molécule de rosuvastatine est située devant la structure porphyrrique avec la chaîne carbonée placée entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème. Un groupement hydroxyle de la chaîne est capable de former une liaison hydrogène avec une des chaînes de la structure hémique et un oxygène du groupement acide carboxylique peut former un pont hydrogène avec la thréonine 100. La partie comprenant les deux cycles et l'atome de soufre est positionnée dans le canal d'entrée de la cavité hémique.

c) Cérivastatine :

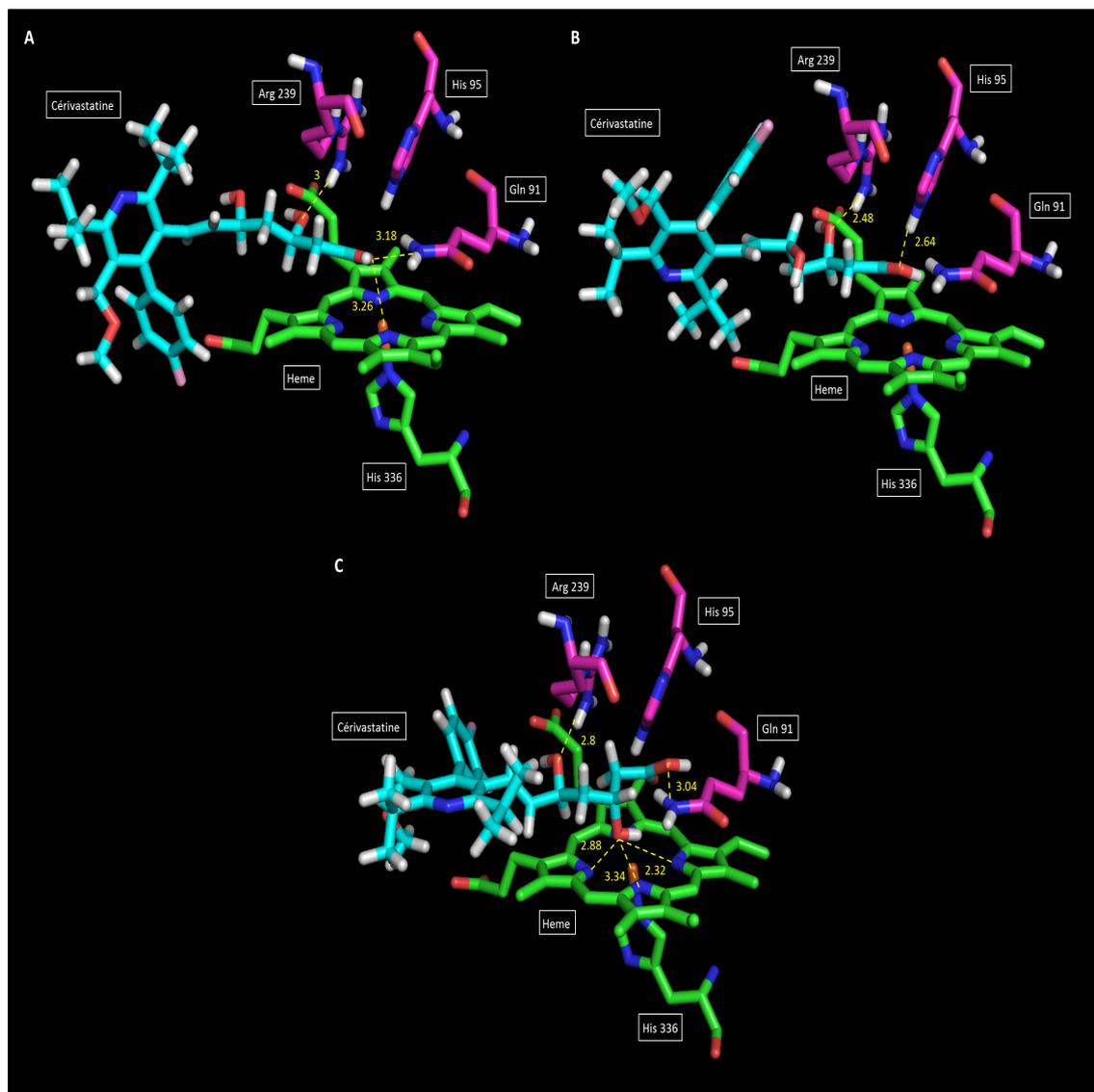


FIGURE 6.11 – Trois solutions du complexe MPO-cérivastatine obtenues par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

GOLD donne cinq complexes MPO-cérivastatine différents mais, pour quatre d'entre eux, la chaîne carbonée est placée au-dessus du plan de l'hème. Cependant, l'orientation de celle-ci, en raison de sa flexibilité, ainsi que la profondeur de son insertion varient en fonction des solutions provoquant des associations de liaisons hydrogène avec divers éléments de l'enzyme, comme l'histidine 95, le noyau de fer, l'arginine 439, les atomes d'azote de l'hème ou la glu-

tamine 91. Le reste de la molécule est positionné dans le canal d'entrée du site actif. Trois orientations de la molécule, proposées par GOLD, sont présentées à la figure 6.11.

d) Fluvastatine :

Comme pour les résultats obtenus pour l'atorvastatine ou la rosuvastatine, GOLD positionne la fluvastatine à l'entrée de la cavité hémique avec la chaîne carbonée entre les deux chaînes d'acide propanoïque (figure 6.12) (71 % d'occurrence). La structure imposante de la molécule l'empêche de pénétrer profondément au sein du site actif entre l'hème et l'histidine 95. Une liaison hydrogène serait possible entre la chaîne de l'hème, la thréonine 100, la sérine 149, l'acide glutamique 102 de l'enzyme et la chaîne carbonée de la fluvastatine. Cependant, contrairement au cas de l'atorvastatine et de la rosuvastatine, aucune solution ne positionne une partie de la molécule, notamment la chaîne hydrocarbonée, dans le plan de l'hème entre le noyau de fer et l'histidine 95. Par conséquent, aucune liaison n'est possible entre la molécule et le fer ou l'histidine 95.

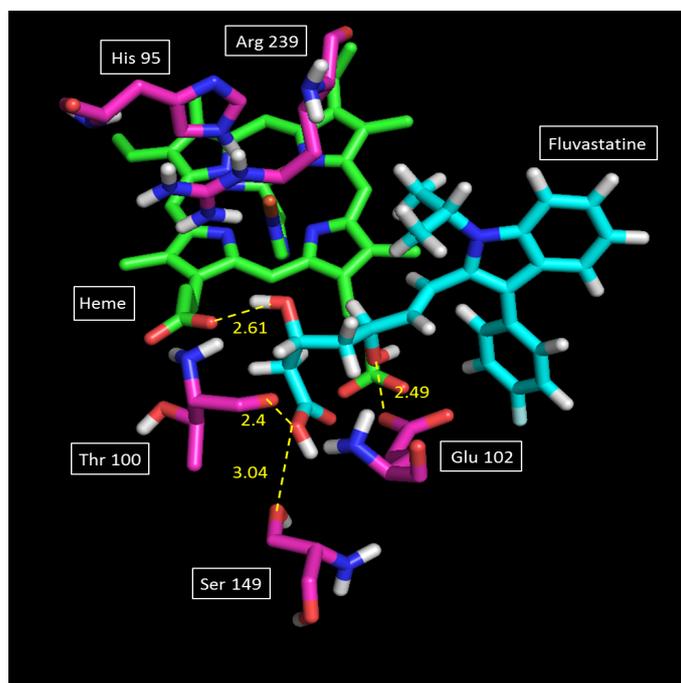


FIGURE 6.12 – Solution la plus probable du complexe MPO-fluvastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

e) Pitavastatine :

Pour la pitavastatine, GOLD fournit un très grand nombre de solutions différentes. Les figures 6.13 et 6.14 représentent les deux complexes les plus fréquemment obtenus. La première solution (43% d'occurrence) positionne presque entièrement la molécule devant l'hème dans le canal d'entrée du site actif. La molécule n'est placée ni au-dessus de l'hème ni entre les deux bras d'acide propanoïque. Par conséquent, il n'y a aucune liaison avec des acides aminés situés profondément dans la cavité comme l'histidine 95 ou l'arginine 439. Seules deux liaisons hydrogène sont possibles entre les deux groupements hydroxyles de la chaîne carbonée avec l'acide glutamique 102 et la thréonine 100.

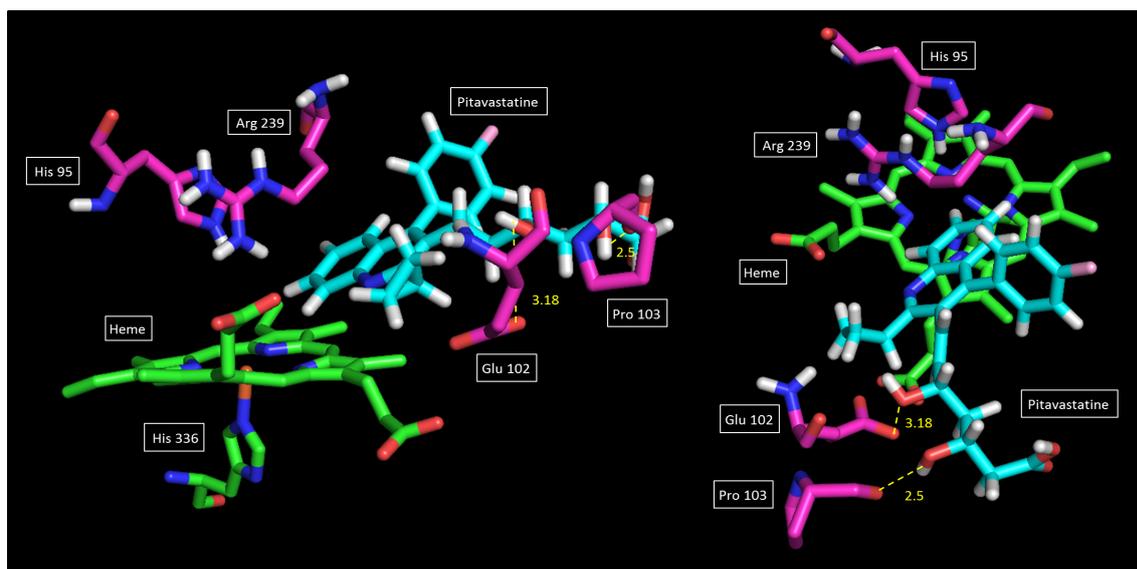


FIGURE 6.13 – Première solution du complexe MPO-pitavastatine obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

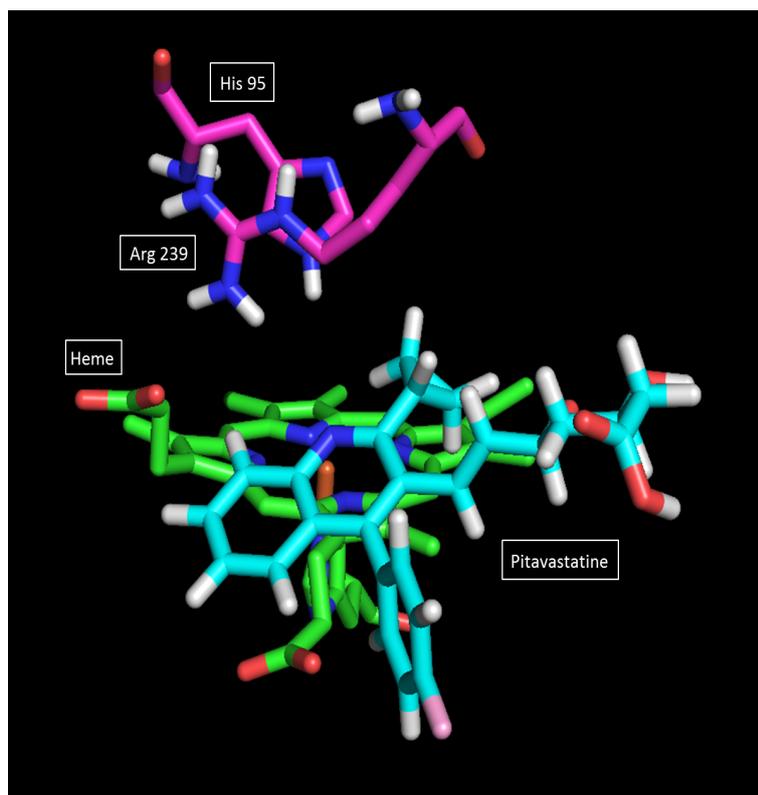


FIGURE 6.14 – Deuxième solution du complexe pitavastatine-MPO obtenue par le programme de modélisation moléculaire GOLD.

Dans le second complexe (23% d'occurrence), la partie bicyclique de la molécule est positionnée entre les deux chaînes de l'hème et la chaîne carbonée est dirigée dans le canal d'entrée du site actif. Aucune liaison n'est possible avec l'enzyme.

### 6.4.3 Conclusion

De façon générale, la structure imposante des statines, composée de plusieurs cycles et d'une ou plusieurs chaînes carbonées, ainsi que leur géométrie non linéaire (particulièrement pour les statines synthétiques) provoquent un encombrement stérique important au sein de la cavité hémique de la MPO. Par conséquent, il était prévisible que ces molécules ne puissent s'insérer aisément dans le site actif. Cela a été confirmé particulièrement par le grand nombre de solutions fournies par le programme GOLD pour chaque molécule. Il faut garder à l'esprit qu'afin de pouvoir réaliser l'analyse de *docking*, il est nécessaire de définir une zone, ici reprenant la cavité hémique, dans laquelle le programme est forcé de positionner le ligand étudié. Les résultats alors obtenus ne permettent pas de déterminer si les statines peuvent réellement s'insérer dans le canal d'accès au site et accéder à celui-ci. Les dimensions des molécules posent donc la question d'une réelle possibilité d'interaction entre les statines et la MPO.

Malgré cela, des statines ressortent tout de même du lot. C'est le cas de la lovastatine et la mévastatine. En effet, le programme GOLD a fourni un nombre plus limité de solutions, avec une structure très fréquemment obtenue pour laquelle une liaison hydrogène est possible avec l'histidine 95 ou le noyau de fer, éléments essentiels au déclenchement des cycles de l'enzyme. Ensuite, une troisième d'origine naturelle, la pravastatine, présente un résultat intéressant lors de la modélisation car une liaison hydrogène avec l'histidine 95 est également possible. Ces trois statines ont donc été sélectionnées pour approfondir l'étude de leur capacité d'interaction, voire d'inhibition avec la MPO.

Dans le cas des statines d'origine synthétique, leurs structures complexes défavorisent leur capacité à former un complexe avec la MPO. En effet, généralement, parmi le grand nombre de complexes proposés par GOLD, deux solutions se démarquent, contrairement aux statines naturelles pour lesquelles une seule solution ressort. Mais pour deux statines (atorvastatine et rosuvastatine), une des solutions proposées montre une possibilité de liaison avec deux groupements situés au coeur du site actif (histidine 95, arginine 439,...). Une proposition de liaison avec des acides aminés situés au sein du site, dans une portion moins flexible de la protéine, est plus probable. Malgré l'incertitude sur la capacité de ces deux molécules à se lier à l'enzyme, elles ont été sélectionnées pour la suite des tests. De plus, l'atorvastatine est une des molécules les plus vendues. La cérivastatine a également été sélectionnée car, malgré le grand nombre de complexes proposés et le nombre de possibilités de liaisons avec l'enzyme, il existe une éventualité de formation de liaisons avec des éléments centraux de la cavité.

Les trois statines, simvastatine, pitavastatine et fluvastatine, n'ont pas été retenues pour le reste de l'étude, car aucune des solutions fournies par GOLD ne rend possible l'établissement de liaisons, comme des ponts d'hydrogène, avec l'histidine 95 ou le noyau de fer.

## 6.5 Etude de l'action réductrice et antioxydante des statines

### 6.5.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Afin de pouvoir expliquer les éventuelles propriétés réductrices des statines, leur potentiel d'oxydoréduction a été déterminé grâce à la voltammétrie cyclique dans du tampon phosphate pH 7,4. Ce tampon a été utilisé pour réaliser la majorité des expériences de ce travail car il permet de simuler le pH physiologique.

Le voltammogramme de la lovastatine est représenté sur la figure 6.15. Celui-ci montre l'oxydation irréversible de la molécule avec un pic d'oxydation à 1,16 V. Cette valeur est proche de celle obtenue par Zhang et al. [624], 1,13 V, dans des conditions expérimentales

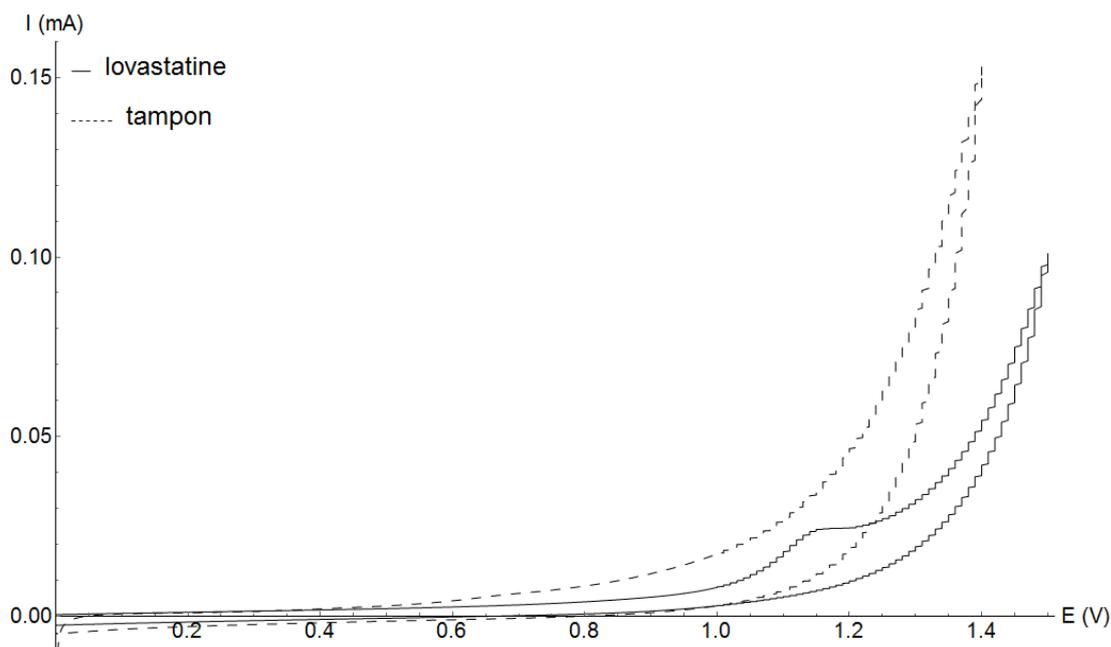


FIGURE 6.15 – Voltammogramme de la lovastatine (5 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

proches, la seule différence étant le pH plus acide du milieu d'analyse. Le potentiel d'oxydoréduction de la lovastatine est donc estimé par le potentiel de demi-pic, + 1,09 V vs SCE, soit + 1,33 V vs ESH (électrode standard à hydrogène)[169].

L'article de Zhang et al. [624] ne propose pas de mécanisme d'électro-oxydation pour la lovastatine. Cependant, il peut être déduit à partir de celui proposé pour d'autres statines, comme la simvastatine [629] qui possède une structure très proche. L'oxydation de la simvastatine se fait via le groupement hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, par un processus à deux électrons, pour donner une fonction cétone. L'apparition de ce type de fonction explique le caractère irréversible de l'oxydation de la simvastatine car les cétones sont réduites à des potentiels inférieurs à -1V [629]. Ce mécanisme d'électro-oxydation a également été proposé pour la pravastatine, autre statine naturelle [630]. De plus, l'électro-oxydation de la simvastatine est indépendante du pH. Si la lovastatine est oxydée de la même façon, cela explique pourquoi son potentiel d'oxydation dans notre étude est proche de celui de l'étude de Zhang et al. [624], malgré la différence de pH.

Le voltammogramme de l'atorvastatine est représenté sur la figure 6.16. Comme pour la lovastatine, un seul pic d'oxydation est observé à + 923 mV par rapport au contrôle tampon et solvant. Aucun pic de réduction n'est observé. L'oxydation de l'atorvastatine est un processus irréversible. Par conséquent, le potentiel d'oxydoréduction est estimé par le potentiel de demi-pic, + 813 V vs SCE, soit + 1,06 V vs ESH (électrode standard à hydrogène)[169].

A nouveau, ce résultat est proche de ceux décrits dans la littérature. En effet, deux publications [631, 632] montrent l'oxydation irréversible de l'atorvastatine, avec un pic entre 1,05 et 1,07 V, à pH 2-3 et avec une électrode de référence Ag/AgCl. Abbar et al. [631] ont montré l'effet du pH sur la position du pic d'oxydation. La basification du milieu provoque la diminution de la valeur du potentiel du pic. A pH 7,4, le pic d'oxydation est alors positionné à 945 mV vs Ag/AgCl et donc à 906 mV vs SCE. Ils ont également montré que l'augmentation

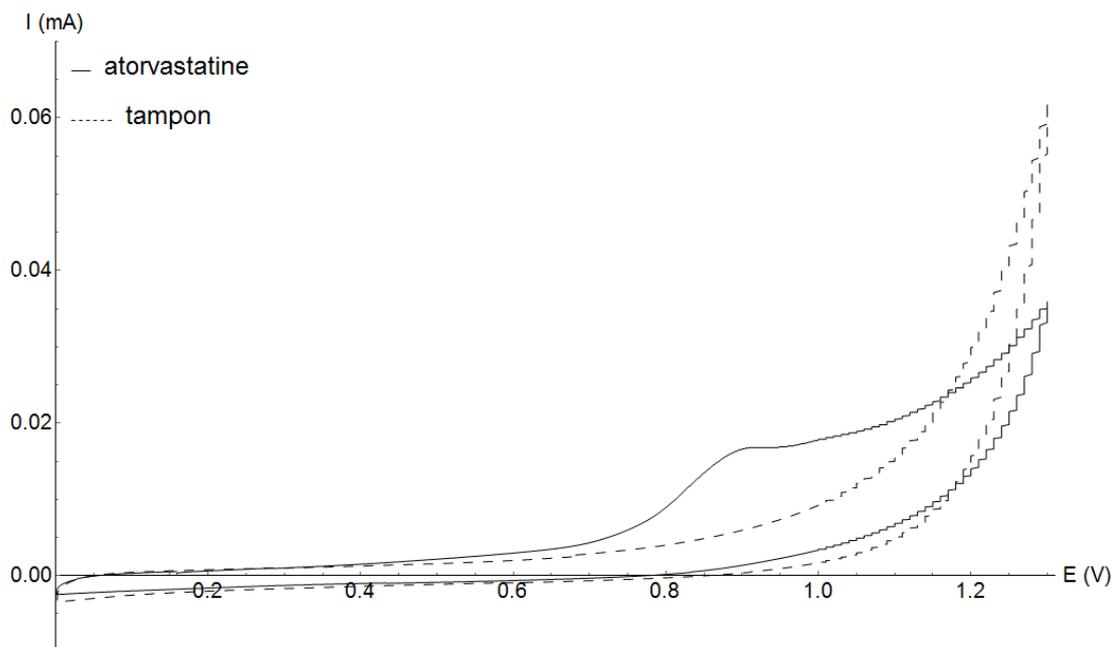


FIGURE 6.16 – Voltammogramme de l'atorvastatine (1 mM) (courbe pleine) dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe pointillée (contrôle contenant du tampon phosphate avec 10% de DMSO)) (vitesse d'acquisition : 10 mV/s). L'électrode de référence utilisée est une électrode de calomel saturée.

du pH ainsi que la diminution de la vitesse de scan du voltammogramme diminuent fortement l'amplitude du pic. Cela explique que le pic d'oxydation obtenu dans cette étude est moins bien défini que dans la publication. Abbar et al. [631] proposent également un mécanisme d'électro-oxydation (figure 6.17). L'oxydation de l'atorvastatine se produirait au niveau du cycle pyrrole de la molécule, via un processus à deux électrons afin de donner deux produits finaux, l'acide 5-(4-fluoro-phenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxylique phenylamide et l'acide 3,5-dihydroxy-7-oxo-heptanoïque. Cela explique le caractère irréversible de l'oxydation de l'atorvastatine.

Les potentiels redox des quatre autres statines, rosuvastatine, cérvastatine, mévastatine et pravastatine, n'ont pas pu être déterminés au cours de cette étude. En effet, avec le dispositif expérimental (électrode de carbone vitreux, pH 7,4 et volume minimum de 30 ml), de fortes concentrations en molécules auraient été nécessaires pour observer un pic d'oxydation. De telles mesures n'ont donc pas pu être réalisées. Mais sur base des valeurs obtenues pour la lovastatine et l'atorvastatine, très proches de celles référencées dans la littérature, les potentiels redox des quatre statines ont été estimés pour la suite de ce travail à partir de ceux décrits dans la littérature.

Pour la rosuvastatine, le potentiel redox est estimé à +1,4V vs ESH [633] et pour la pravastatine à +1,43 V vs ESH [630]. Aucune étude voltammétrique de la cérvastatine et de la mévastatine n'a pu être trouvée dans la littérature. Cependant, les potentiels redox de ces deux statines peuvent être supposés supérieurs à 1 V, comme pour les autres statines.

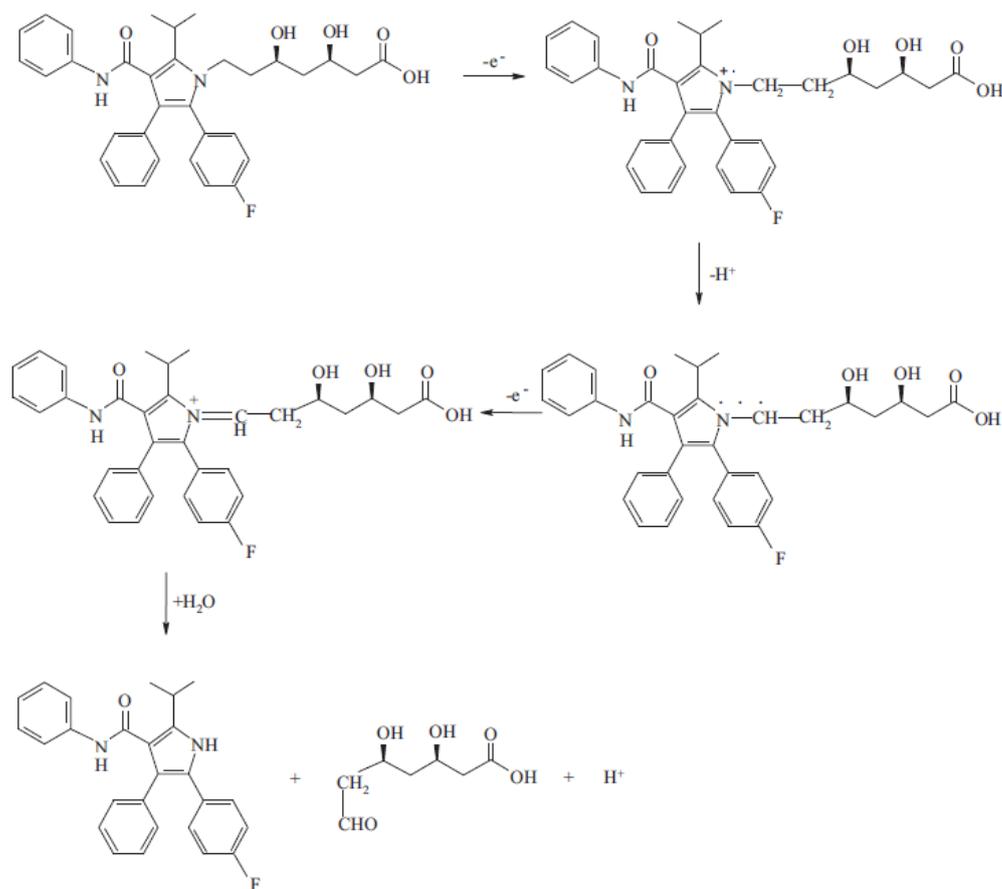


FIGURE 6.17 – Mécanisme d'oxydation de l'atorvastatine. Image originale de Abbar et al. [631].

### 6.5.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS

L'activité antioxydante des six statines sélectionnées a été déterminée à l'aide du modèle ABTS associé à la spectroscopie d'absorption UV-visible (voir section 2.1.2), plus précisément en étudiant leur action réductrice sur le cation radicalaire  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ .

Les six statines ne montrent pas d'action significative de piégeage des radicaux (figure 6.18). Seules deux statines naturelles, la pravastatine et la lovastatine, présentent une faible activité réductrice à haute concentration,  $100 \mu\text{M}$ , de l'ordre de 10 % par rapport au contrôle DMSO. Ces résultats démontrent clairement l'incapacité des statines à céder un électron aux radicaux  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  en solution. L'action des statines n'augmente pas dans le temps. En effet, après une incubation d'une heure, le taux de piégeage reste identique.

Ce résultat peut s'expliquer grâce à la comparaison des potentiels d'oxydoréduction des différentes statines et du couple  $\text{ABTS}^{\cdot+}/\text{ABTS}$ . En effet, les statines testées sont caractérisées par des potentiels redox supérieurs à 1V dans une solution de pH 7,4. Dans ce travail, le potentiel redox de l'ABTS dans du tampon phosphate de pH 7,4 a été déterminé par voltamétrie cyclique et une valeur de 698 mV a été obtenue (voir section 2.1.2). De façon générale, l'ensemble des statines présentent un potentiel d'oxydoréduction, dans des conditions comparables, largement supérieur à celui de l'ABTS. Sur base de cette comparaison, on peut aisément affirmer que les statines ne peuvent pas agir comme agent réducteur sur l'état oxydé de l'ABTS.

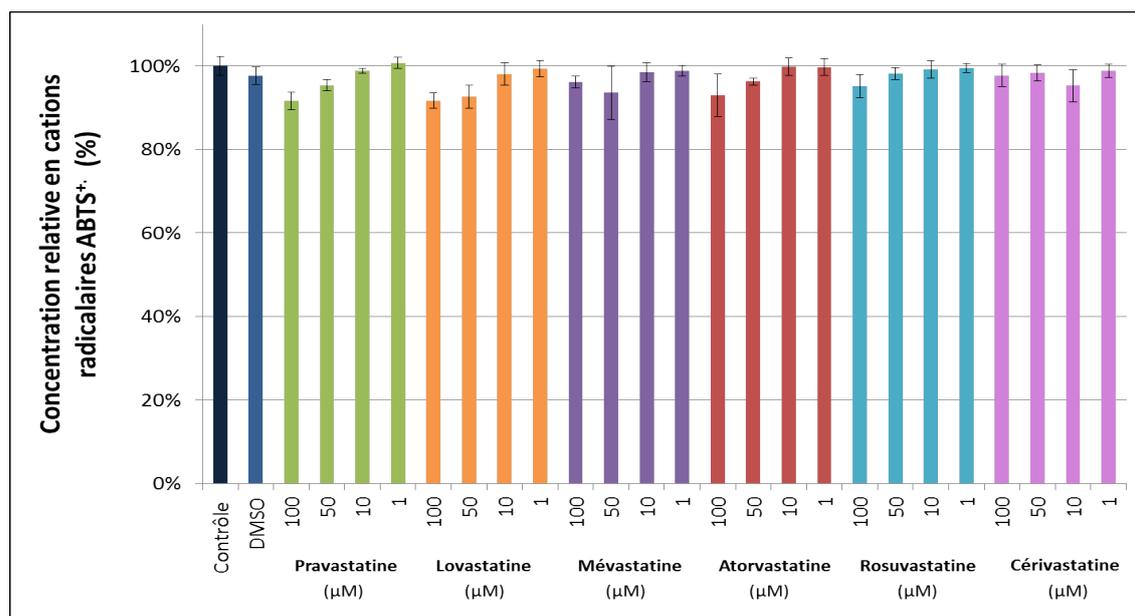


FIGURE 6.18 – Action réductrice des statines sur les radicaux ABTS<sup>+</sup> en solution aqueuse. La mesure a été réalisée immédiatement après l’ajout de la solution d’ABTS<sup>+</sup> dans les puits de la plaque de mesure. Le pourcentage de l’activité de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type (N=2 et n=3).

### 6.5.3 Etude de l’action de piégeage de ROS - Anion superoxyde

L’action de piégeage de trois statines sur l’anion superoxyde a été étudiée par chimiluminescence (figure 6.19). L’anion superoxyde a été produit chimiquement grâce au KO<sub>2</sub> (voir section 2.1.3). La rosuvastatine ne montre aucune action de piégeage. Par contre, la lovastatine et l’atorvastatine présentent une action non négligeable à la plus forte concentration testée, 100 μM. Les deux molécules piègent environ 32% de l’anion superoxyde à cette concentration.

La capacité très faible, voir nulle, de piégeage de l’anion superoxyde peut s’expliquer par la comparaison des potentiels d’oxydoréduction. En effet, le potentiel du couple O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est de +0,89 V (pH 7) [352]. Il est donc inférieur aux potentiels des statines qui sont supérieurs à +1 V. Par conséquent, elles ne peuvent céder un électron et réduire l’anion superoxyde en peroxyde d’hydrogène.

### 6.5.4 Etude de l’action de piégeage de ROS - Oxygène singulet

L’oxygène singulet est produit par le système inflammatoire. L’action de piégeage de ce ROS par les statines a été étudiée et comparée à celle d’un piègeur connu, l’azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) [245]. Dans cette étude, l’oxygène singulet est produit par l’irradiation du rose Bengale et est détecté via son interaction avec l’ADPA par spectroscopie d’absorption (voir section 2.1.4).

En absence de piègeur, le piégeage chimique de l’oxygène singulet par l’ADPA provoque la diminution du spectre d’absorption de ce dernier (contrôle) (figures 6.20 et 6.21). L’ajout de solvant (eau ou DMSO) n’impacte pas significativement la décroissance de l’absorbance à 405 nm. Après 10 minutes, elle atteint une valeur proche de celle du contrôle.

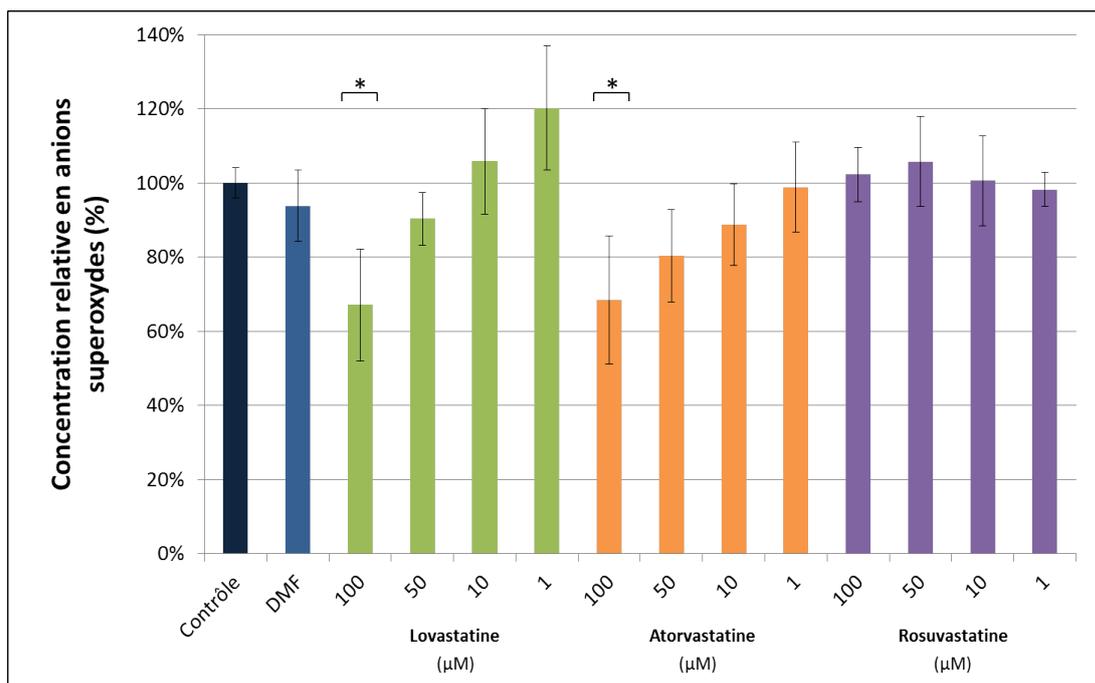


FIGURE 6.19 – Action de piégeage de la lovastatine, de l'atorvastatine et de la rosuvastatine sur l'anion superoxyde, produit par la décomposition du  $\text{KO}_2$ . L'anion superoxyde réagit avec une sonde chimiluminescente le L-012. Le pourcentage de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P < 0,01$  ou \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (DMF).

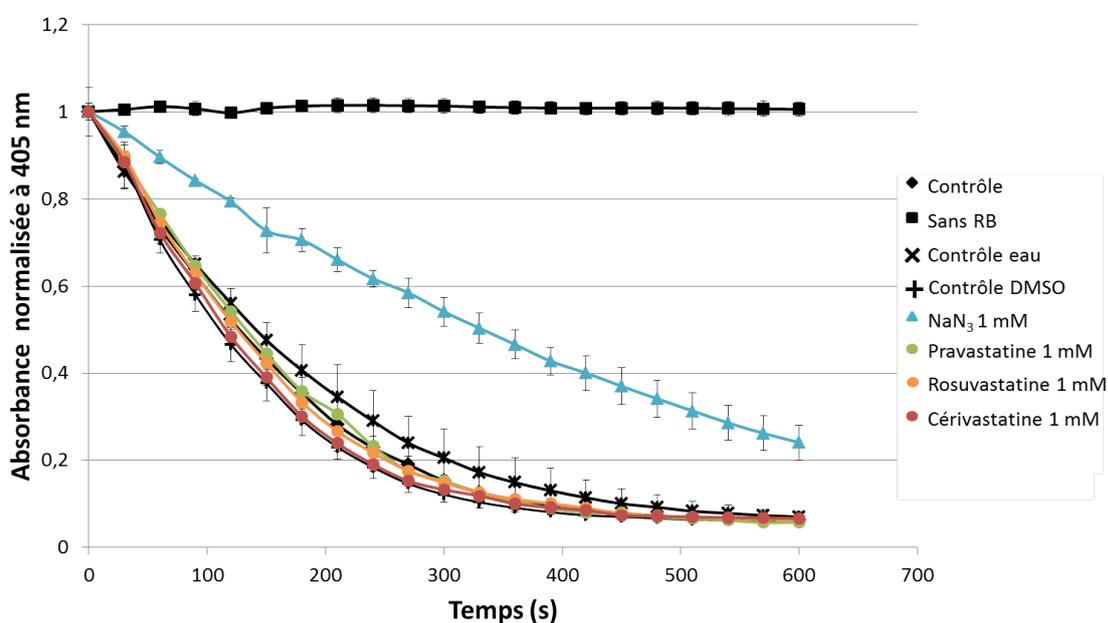


FIGURE 6.20 – Action de piégeage de la pravastatine, de la rosuvastatine et de la cérivastatine sur l'oxygène singulet, produit par l'irradiation du rose Bengale (RB). L'oxygène singulet réagit avec l'ADPA et provoque la diminution de l'absorbance de la molécule à 405 nm. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=1$  et  $n=3$ ).

La pravastatine, la rosuvastatine et la cérvastatine ne présentent aucune action de piégeage de l'oxygène singulet à la concentration de 1 mM (figure 6.20). Elle est différente et non négligeable pour la lovastatine, la mévastatine et l'atorvastatine (figure 6.21). L'évolution temporelle de l'action de piégeage de la lovastatine et de la mévastatine diffère fortement de celle du contrôle solvant (DMSO), pour tout de même aboutir à une inhibition d'environ 6% de la décroissance de l'absorbance de la solution d'ADPA à 405 nm après 10 minutes. Bien que les mesures réalisées ne permettent pas de déterminer les constantes de vitesse d'interaction entre les statines et l'oxygène singulet, la légère action de piégeage observée pour la lovastatine et la mévastatine laisse supposer qu'elles sont caractérisées par une constante de vitesse du même ordre que celle de l'ADPA ( $8,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [174]), car elles ne peuvent pas entrer significativement en compétition avec la molécule.

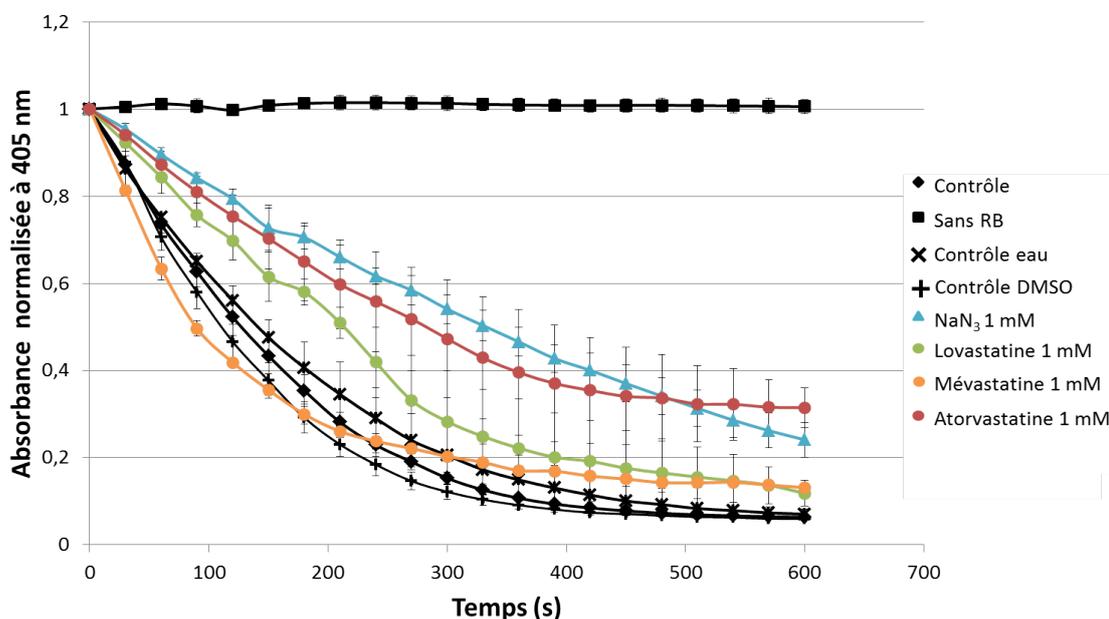


FIGURE 6.21 – Action de piégeage de la lovastatine, de la mévastatine et de l'atorvastatine sur l'oxygène singulet, produit par l'irradiation du rose Bengale (RB). L'oxygène singulet réagit avec l'ADPA et provoque la diminution de l'absorbance de la molécule à 405 nm. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=2$  et  $n=3$ ).

La statine la plus efficace est l'atorvastatine. Celle-ci présente une capacité de piégeage de l'oxygène singulet proche de celle du  $\text{NaN}_3$ . Après dix minutes d'irradiation, l'atorvastatine réduit de 25% la transformation de l'ADPA en endoperoxyde et donc la diminution de son absorbance à 405 nm. L'action finale de la statine est de 7% supérieure à celle du  $\text{NaN}_3$ . Cela indique que l'atorvastatine doit être caractérisée par une constante de vitesse de piégeage de l'oxygène singulet du même ordre que celle du  $\text{NaN}_3$  ( $5,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [247]). Ce résultat est en accord avec celui de Razavi et al. [634] qui ont déterminé la constante de vitesse à  $3,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Le spectre d'absorption de l'atorvastatine est caractérisé par un pic à 240 nm avec une large bande centrée aux alentours de 280 nm (figure 6.22) [635, 636]. L'ajout du rose Bengale provoque une légère augmentation de l'amplitude du pic d'absorption. Après l'irradiation de la solution pendant dix minutes et la production d'oxygène singulet, un décalage hypsochrome du pic d'absorption peut être observé avec une diminution de son amplitude. La modification du spectre n'est pas photo-induite. En effet, un filtre est utilisé pour supprimer les longueurs

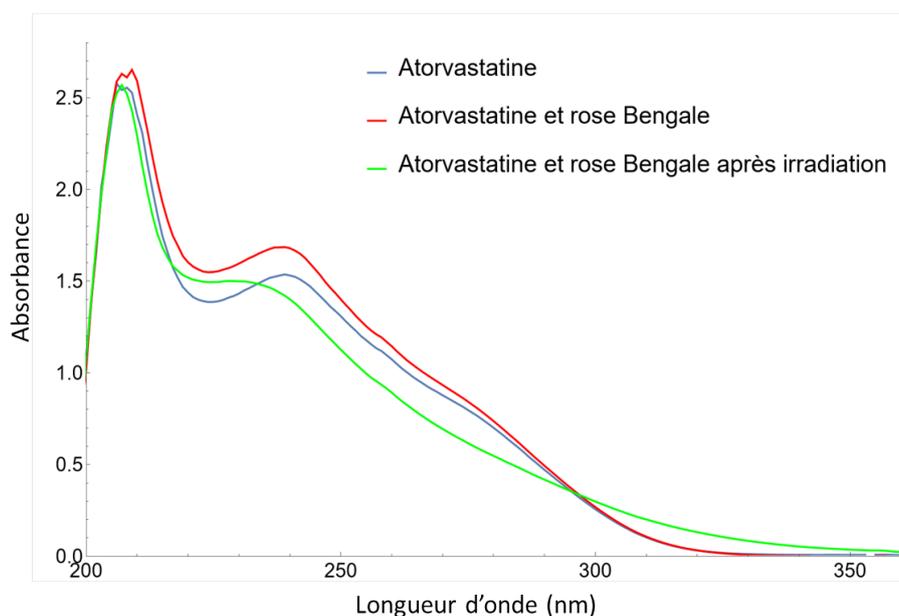


FIGURE 6.22 – Spectres d'absorption de l'atorvastatine 1 mM dans du tampon phosphate pH 7,4 (courbe bleue), en présence de rose Bengale 10  $\mu$ M (courbe rouge), et après 10 minutes d'irradiation (courbe verte).

d'onde inférieures à 450 nm émises par le projecteur servant à irradier l'échantillon. La modification du spectre d'absorption de l'atorvastatine, suite à son interaction avec l'oxygène singulet, montre que la molécule est un piègeur chimique de l'espèce réactive de l'oxygène. En effet, l'interaction de la statine avec l'oxygène singulet provoque une modification de la structure de la molécule qui se reflète sur son spectre. Les études de Wang et al. [637, 638] montrent la dégradation de l'atorvastatine suite à son oxydation par l'oxygène singulet. Ils proposent également un mécanisme réactionnel. L'oxygène singulet attaque le cycle pyrrole au centre de la molécule d'atorvastatine, avec ouverture du cycle et formation d'un composé qu'ils nomment P416 (figure 6.23) [637].

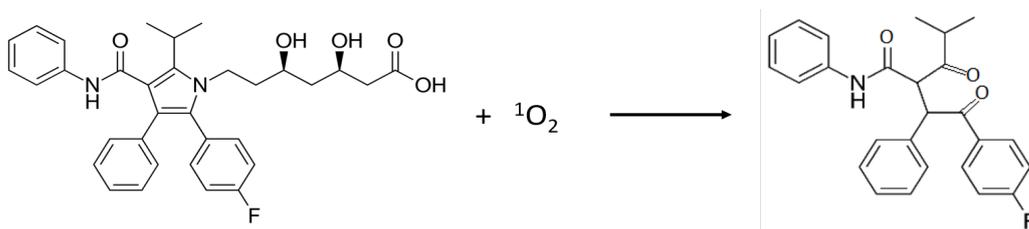


FIGURE 6.23 – Dégradation de l'atorvastatine suite à son interaction avec l'oxygène singulet menant à la formation du composé P416.

### 6.5.5 Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux

L' $\text{HOCl}$  est une espèce oxydante puissante produite par la MPO lors du processus inflammatoire. Piéger ce ROS est un moyen de réduire l'impact oxydant de l'enzyme. L'action de piégeage de trois statines a été étudiée grâce à la spectroscopie de fluorescence (voir section 2.1.5).

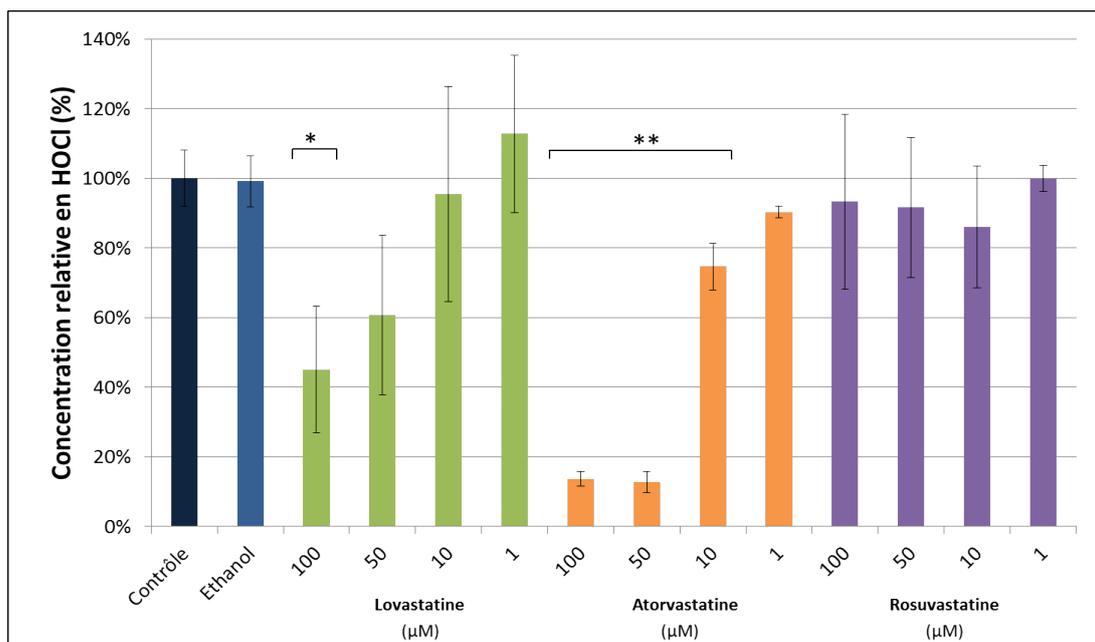


FIGURE 6.24 – Action de piégeage de la lovastatine, de l’atorvastatine et de la rosuvastatine sur l’acide hypochloreux, produit par le NaOCl. Le pourcentage de piégeage a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type ( $N=3$  et  $n=3$ ). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\* $P<0,01$  ou \* $P<0,05$  par rapport au contrôle solvant (éthanol).

La statine présentant l’action de piégeage la plus importante est l’atorvastatine (figure 6.24). La molécule réduit la concentration en HOCl de 85% aux deux plus hautes concentrations, 50 et 100  $\mu\text{M}$ . La capacité de piégeage chute à 25% à la concentration 10  $\mu\text{M}$  et devient négligeable à 1  $\mu\text{M}$ . Par opposition, la rosuvastatine ne présente pas d’action de piégeage du HOCl. Dans le cas de la lovastatine, la seule action de piégeage significative est observée à la plus forte concentration, 100  $\mu\text{M}$ . Une diminution de 55% de la concentration en HOCl est observée.

La capacité de piégeage du HOCl par l’atorvastatine peut s’expliquer par la structure chimique de la molécule et, plus précisément, par la présence d’un groupement amine. En effet, cette fonction chimique réagit avec l’acide hypochloreux pour donner une fonction chloramine. L’atorvastatine est la seule statine présentant ce groupement chimique. Cela peut expliquer sa prédominance en tant que piègeur de HOCl par rapport aux autres molécules.

### 6.5.6 Bilan de l’action réductrice et antioxydante des statines

Globalement, les statines étudiées présentent une action réductrice et antioxydante très faible, voire nulle. Leurs potentiels d’oxydoréduction élevés, supérieurs à 1V, leur confèrent un caractère réducteur très faible, ce qui ne leur permet pas de céder un électron à des radicaux comme celui de l’ABTS. Seule l’atorvastatine se démarque. En effet, la molécule est capable de piéger l’oxygène singulet et l’acide hypochloreux. Cependant, elle ne montre pas d’action réductrice efficace sur l’anion superoxyde. Il est également important de noter que les concentrations auxquelles la molécule présente une action de piégeage significative (50  $\mu\text{M}$ -1mM) sont largement supérieures à celles atteintes dans le plasma de patient ( $\approx 30$  nM [611]).

## 6.6 Etude de l'action des statines sur l'activité oxydante des PMNs

### 6.6.1 Inhibition de la production d'anions superoxydes

L'impact des statines sur le mécanisme de la flambée respiratoire des PMNs a été étudié par luminescence (voir section 2.2.3). Les cellules ont été activées avec le PMA en présence des molécules et la production d'anions superoxydes a été détectée (figure 6.25). La pravastatine provoque une diminution significative (43%) de la production de ROS mais uniquement à la plus forte concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Par contre, la lovastatine et la mévastatine présentent, quant à elles, une action non négligeable aux trois plus hautes concentrations. En effet, la plus élevée (100  $\mu\text{M}$ ) réduit la concentration en anions superoxydes en solution de 78% et de 67% par rapport au contrôle solvant (DMSO), pour la lovastatine et la mévastatine respectivement. L'action des deux statines chute chacune à 34% et à 26% pour une concentration de 10  $\mu\text{M}$ . Pour les trois autres statines, atorvastatine, rosuvastatine et cérivastatine, aucune inhibition significative n'est observée après une incubation de 10 minutes des PMNs en leur présence.

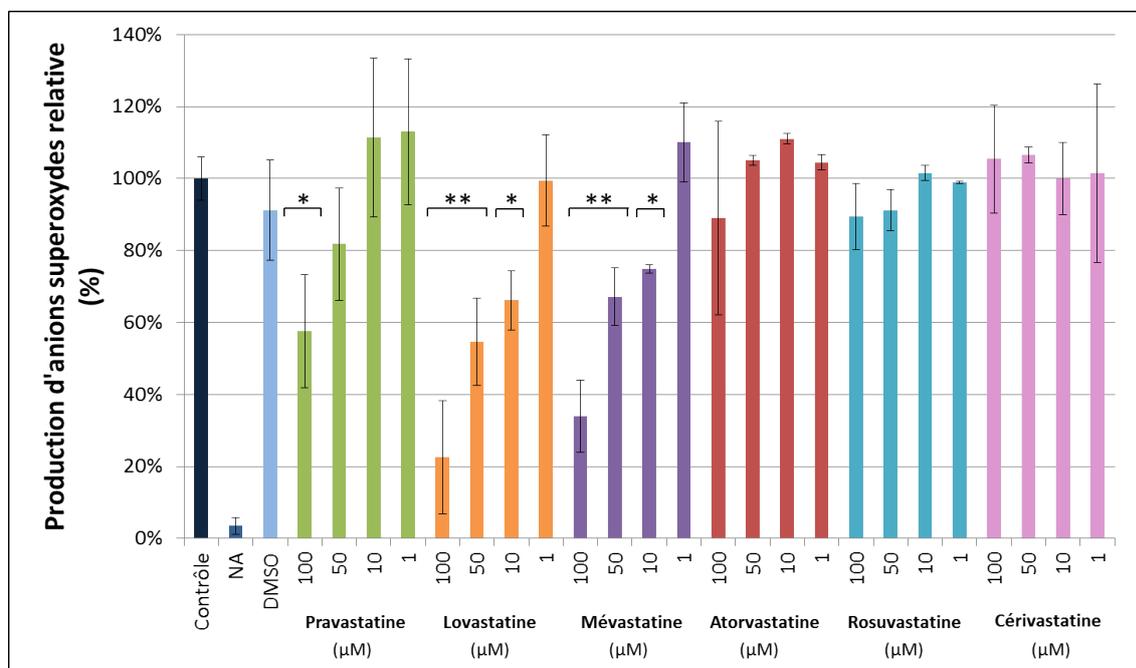


FIGURE 6.25 – Action des statines sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (pravastatine, lovastatine et mévastatine : N=3 et n=3, atorvastatine, rosuvastatine et cérivastatine : N=2 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

Les molécules de statines étant toujours présentes en solution lors de l'activation des PMNs, la réduction observée du signal de luminescence de la sonde L-012, utilisée pour détecter l'anion superoxyde, peut être due à deux contributions. Tout d'abord, les molécules d'intérêt pourraient interagir avec les cellules et potentiellement inhiber la production de ROS via divers mécanismes (inhibition de la formation du complexe NADPH oxydase, inhibition du complexe, perturbation de l'échange d'électron). D'autre part, les statines pourraient agir comme piègeur de ROS. L'association des deux mécanismes est également une possibilité.

En se basant sur les résultats illustrés à la figure 6.19, les statines ne sont globalement pas des piègeurs efficaces de l'anion superoxyde. Par conséquent, on peut en déduire que la réduction de la concentration en ROS observée est principalement due à l'interaction de la lovastatine et de la mévastatine avec les cellules elles-mêmes et à une réduction de leur capacité à produire et libérer les ROS, peut-être via une interférence avec le complexe NADPH oxydase.

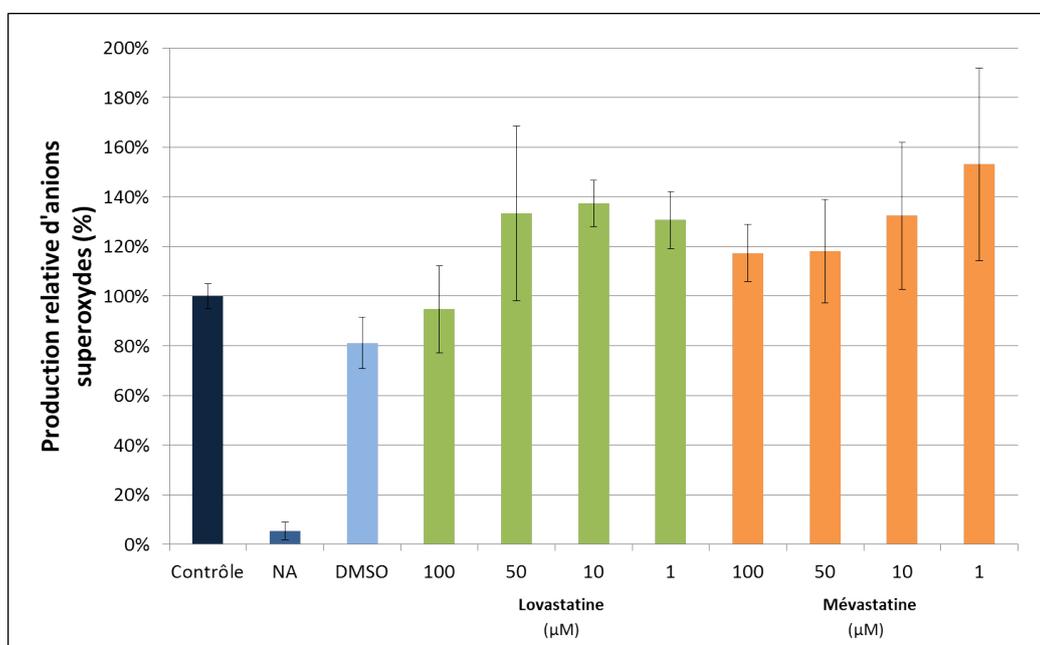


FIGURE 6.26 – Action de la lovastatine et de la mévastatine sur la production d'anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Les statines ont été éliminées du milieu avant la mesure, après 10 minutes d'incubation. Le pourcentage d'inhibition de la production d'anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à leur contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs :  $^{***}P < 0,01$  ou  $^{*}P < 0,05$  par rapport au contrôle solvant (DMSO).

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le mécanisme d'action de la lovastatine et de la mévastatine, une expérience similaire a été menée. Dans ce cas, une étape supplémentaire permettant de supprimer les statines du milieu après la période d'incubation des PMNs a été ajoutée. Cette étape (centrifugation et élimination du surnageant) permet d'éliminer les molécules n'ayant pas interagi avec les cellules, c'est-à-dire n'ayant pas pénétré la membrane plasmique, potentiellement atteint le cytoplasme ou ne s'étant pas liées à la membrane. Suite au lavage, l'action inhibitrice de la mévastatine et de la lovastatine a fortement chuté et est devenue nulle (figure 6.26). Cela montre qu'une période d'interaction de dix minutes entre les molécules et les PMNs n'est pas suffisante pour permettre leur entrée dans la membrane et une potentielle interaction avec différents éléments comme le complexe NADPH oxydase. Ce résultat semble en contradiction avec l'hypothèse émise à la suite de la première expérience, cependant il peut s'expliquer. En effet, lors des deux expériences, le temps d'incubation des PMNs en présence des statines est identique. Cependant, la seconde expérience est réalisée en séparant immédiatement les cellules et les molécules de statines par une étape de centrifugation, suivie de la séparation du culot cellulaire et du surnageant. Par la suite, les cellules sont stimulées par du PMA afin de déclencher la flambée respiratoire. Dans la première expérience, l'activation des PMNs est réalisée immédiatement après l'incubation et la mesure, qui dure 30 minutes, a lieu en présence des statines en solution. Cela veut dire qu'en pratique, le temps réel d'interaction entre les cellules et les statines est d'environ 40

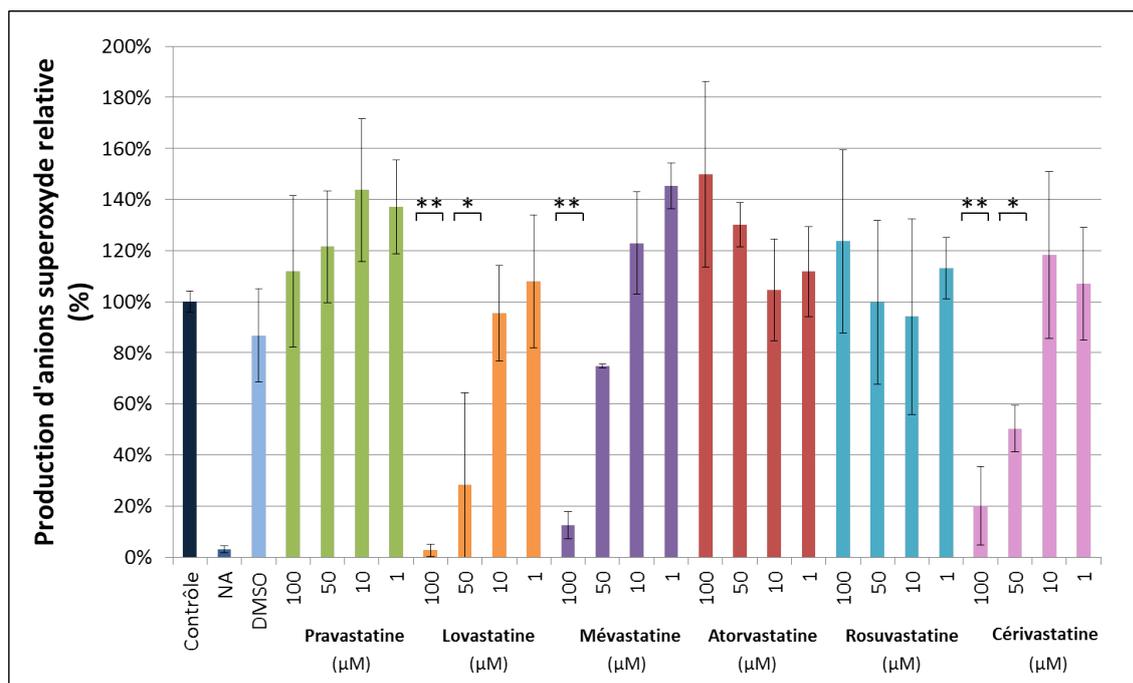


FIGURE 6.27 – Action des statines sur la production d’anions superoxydes par des PMNs équins activés (NA : contrôle PMNs non activés par du PMA). Les statines ont été éliminées du milieu avant la mesure, après une heure d’incubation. Le pourcentage d’inhibition de la production d’anions superoxydes a été calculé pour chaque composé par rapport à leur contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

minutes pour la première expérience, car les molécules peuvent continuer d’interagir pendant la mesure, contre 10 minutes lors de la seconde expérience. Cette différence de temps conséquente peut avoir un impact important sur la capacité de la lovastatine et de la mévastatine à interagir avec les cellules en fonction de leur cinétique d’interaction.

Afin de confirmer cette hypothèse, la seconde expérience a été répétée pour les six statines, avec une période d’incubation d’une heure (figure 6.27). Comme supposé, l’inhibition de la production de ROS par la lovastatine et la mévastatine augmente avec le temps d’incubation. Bien que les molécules soient éliminées du milieu avant l’activation des PMNs, elles continuent néanmoins d’impacter la formation des ROS. La plus forte concentration, 100  $\mu$ M, induit une réduction du signal de luminescence de 98% pour la lovastatine et de 88% pour la mévastatine. Cette inhibition diminue avec la concentration et devient négligeable à partir de 10  $\mu$ M pour les deux molécules.

Une troisième statine, la cérivastatine, montre également une capacité à réduire la production de ROS par des PMNs activés après une incubation d’une heure. Une réduction de 80% est observée à 100  $\mu$ M et celle-ci chute à 50% à 50  $\mu$ M pour devenir négligeable à plus faible concentration. Pour cette molécule, le temps d’interaction avec les cellules est également un facteur essentiel pour permettre son action inhibitrice. En effet, après 10 minutes d’incubation, aucune action n’a été détectée (figure 6.26).

Avant de pouvoir conclure que les trois statines, lovastatine, mévastatine et cérivastatine, réduisent la production de ROS par les PMNs activés via une inhibition d’un élément du mécanisme de production, par exemple via le complexe NADPH oxydase, il est important

d'étudier leur effet sur la viabilité cellulaire. En effet, les molécules cytotoxiques vont empêcher la production de ROS en provoquant la mort cellulaire.

### 6.6.2 Viabilité cellulaire

L'impact des statines sur la viabilité des PMNs a été évalué grâce au test d'exclusion au bleu trypan (voir section 2.2.2).

Après une incubation de dix minutes des PMNs en présence de 100  $\mu\text{M}$  de lovastatine, une diminution de 61% de la viabilité cellulaire est observée (figure 6.28). L'effet cytotoxique de la lovastatine n'est plus significatif à 10  $\mu\text{M}$ , par rapport au DMSO. L'effet cytotoxique de la lovastatine a été montré par Zhang et al. [624]. La lovastatine étant lipophile, elle peut traverser la membrane plasmique [639] et provoquerait l'apoptose des PMNs en bloquant deux voies de signalisation cellulaire (ERK et AKT). De façon surprenante, la mévastatine ne possède pas le même effet cytotoxique et n'induit pas la mort des PMNs à 100  $\mu\text{M}$  malgré sa grande similitude de structure avec la lovastatine.

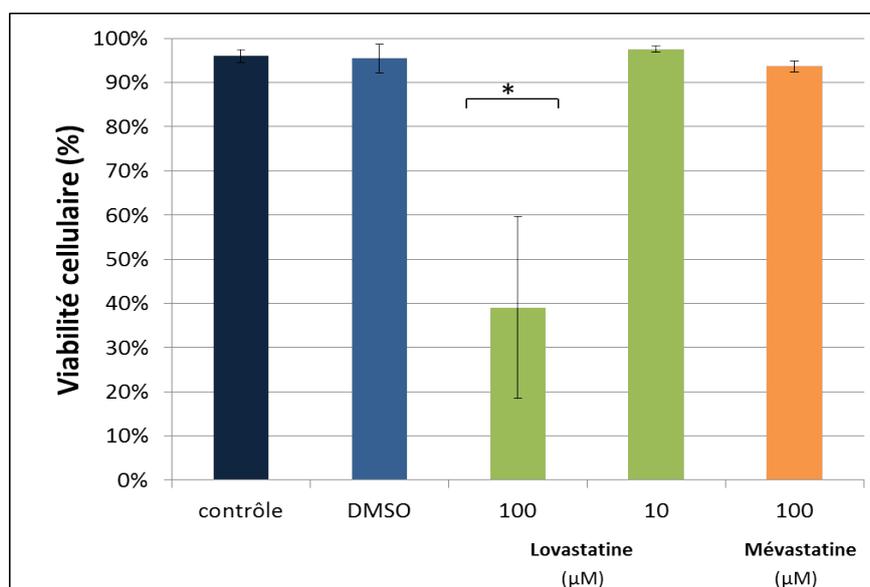


FIGURE 6.28 – Evaluation de la viabilité cellulaire de PMNs incubés en présence de lovastatine et la mévastatine pendant dix minutes, en terme de pourcentage de cellules vivantes. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

Pour la lovastatine, la mortalité cellulaire augmente avec le temps d'incubation des PMNs (figure 6.29). Après une heure, l'entièreté des cellules meurent en présence d'une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . A nouveau, la mortalité devient négligeable par rapport au contrôle solvant à 10  $\mu\text{M}$ . La mévastatine et la cêrivastatine n'impactent pas la viabilité des PMNs, à la plus forte concentration testée 100  $\mu\text{M}$ , par rapport au contrôle solvant (DMSO).

En associant l'ensemble des résultats obtenus avec les PMNs, production de ROS et viabilité, on peut conclure que la capacité observée de la lovastatine à réduire la production d'anions superoxydes à hautes concentrations (100  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$ ) est due à sa cytotoxicité. En tuant les cellules, elle bloque leur activation et le déclenchement de la flambée respiratoire. Par contre, la mévastatine et le cêrivastatine agissent différemment. En effet, elles n'impactent pas

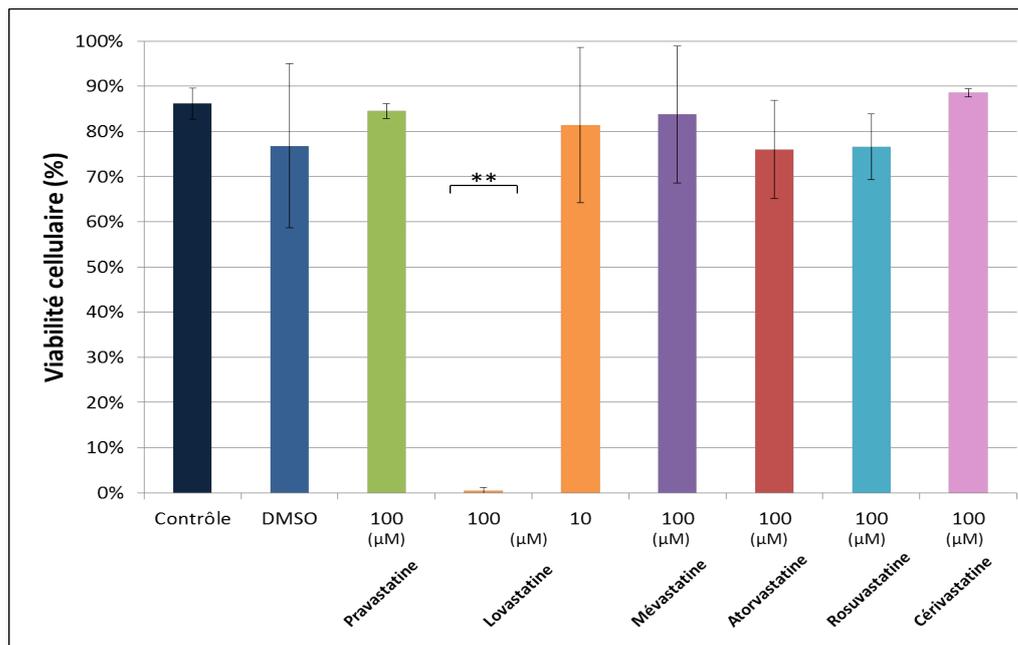


FIGURE 6.29 – Evaluation de la viabilité cellulaire de PMNs incubés en présence des statines pendant une heure, en terme de pourcentage de cellules vivantes. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

la viabilité des cellules, même à la plus forte concentration testée. Par conséquent, leur mécanisme d'action, dépendant du temps d'incubation, se fait probablement via leur pénétration de la membrane cellulaire et une potentielle interaction avec le complexe NADPH oxydase. Les deux statines sont lipophiles et peuvent donc atteindre le cytoplasme des cellules. Elles pourraient alors potentiellement perturber les différentes phases de la formation du complexe en agissant sur les sous-unités cytosoliques ou membranaires. Par exemple, une étude de 2002 a montré que la simvastatine et la cérivastatine sont capables de réduire la production d'anions superoxydes par des monocytes, notamment en inhibant la translocation de deux sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase, p67<sup>phox</sup> et p21 rac 2 [640]. De plus, les statines lipophiles sont également capables d'inhiber l'activité des complexes enzymatiques I et III de la chaîne de transport des électrons au niveau du système respiratoire des mitochondries dans les cellules musculaires squelettiques [641]. Les statines pourraient potentiellement interagir avec le complexe NADPH oxydase. Des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir la compréhension du mécanisme d'action des molécules. Cependant, les statines capables d'inhiber la production d'anions superoxydes présentent une efficacité à hautes concentrations, éloignées de celles atteintes dans le plasma de patients.

### 6.6.3 Inhibition de la dégranulation

Une seconde propriété des PMNs est leur capacité à libérer la MPO dans le milieu extracellulaire, c'est-à-dire la dégranulation. Il est intéressant d'étudier l'impact des statines sur ce mécanisme grâce à un test ELISA (voir section 2.2.4). De façon générale, aucune des six statines ne permet de réduire de manière significative l'excrétion de MPO par les PMNs (figure 6.30). Il semblerait même que certaines puissent stimuler la libération de MPO, mais cette augmentation de la concentration en MPO n'est pas significative. L'augmentation observée pour une concentration de 100  $\mu$ M de lovastatine peut être liée à l'apoptose des PMNs. En effet, les cellules mortes libèrent leur contenu cytoplasmique et le contenu des granules dans

le milieu extracellulaire.

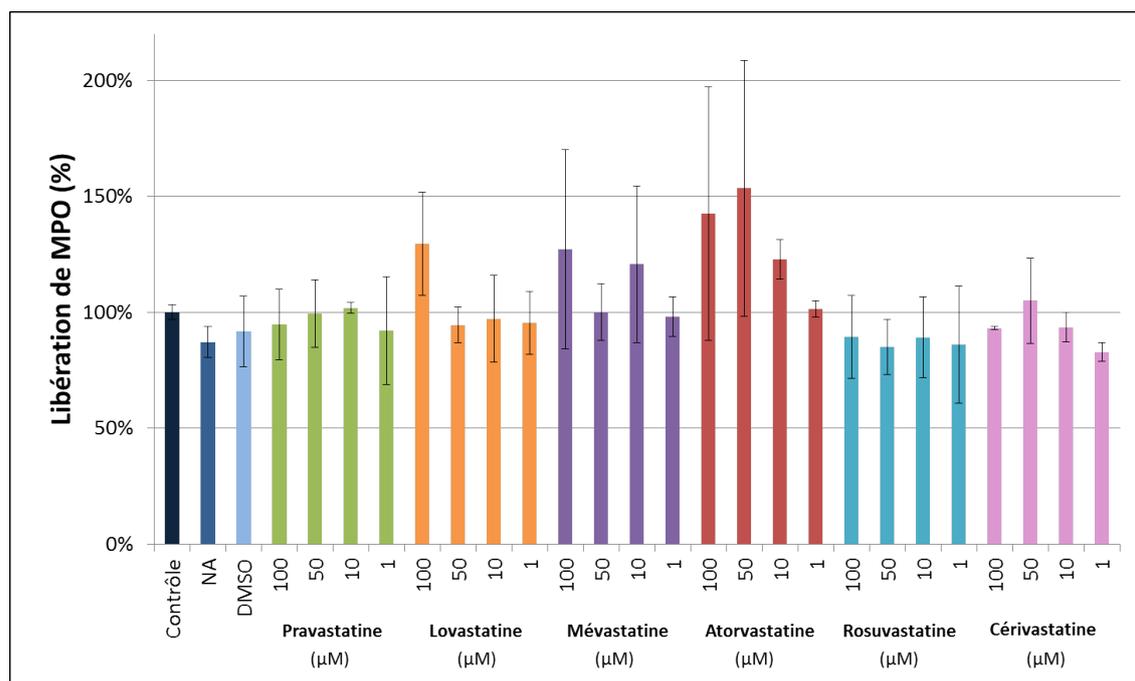


FIGURE 6.30 – Action des statines sur la quantité de MPO libérée par les PMNs activés (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). Le pourcentage de libération de MPO a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=2 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

#### 6.6.4 Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés

Malgré l'incapacité des statines à réduire la libération de MPO, leur action inhibitrice sur l'activité oxydante de l'enzyme a tout de même été étudiée grâce au test SIEFED (voir section 2.2.5). Seules la pravastatine et la cérivastatine provoquent une réduction de l'activité peroxydasique de la MPO, à la plus forte concentration testée 100  $\mu\text{M}$  (figure 6.31). Une inhibition de 33% est observée pour la pravastatine et de 36% pour la cérivastatine. De façon surprenante, la cérivastatine montre également une action inhibitrice significative à la plus faible concentration de 1  $\mu\text{M}$ . Ces résultats suggèrent qu'à haute concentration, les deux statines peuvent interagir avec l'enzyme, s'insérer dans le site actif et y former des liaisons résistantes à l'étape de lavage caractéristique du SIEFED. Cependant, l'action des deux molécules est modérée. Cela pourrait être lié à leur taille et à leur structure, gênant leur insertion dans le site de l'enzyme. Seule l'utilisation d'une importante concentration, largement supérieure à celles détectées dans le plasma de patients ( $\sim 10\text{-}100\text{nM}$ ), permet d'observer une action inhibitrice significative.

A 100  $\mu\text{M}$  la lovastatine et la mévastatine montrent quant à elles l'effet inverse, malgré des écarts-types importants. Elles semblent stimuler l'activité oxydante de l'enzyme et augmentent l'oxydation de la sonde fluorescente, l'Amplex Red. Cependant, cette augmentation de l'activité est plus probablement liée à l'augmentation de la libération de MPO observée par le test ELISA (figure 6.30), plutôt qu'à une stimulation de l'enzyme. Pour la lovastatine, la surlibération de la MPO et l'augmentation de l'activité oxydante qui en découle, peuvent se comprendre par la capacité cytotoxique de la molécule. L'apoptose des PMNs peut provoquer la libération du contenu cellulaire dans le milieu extérieur.

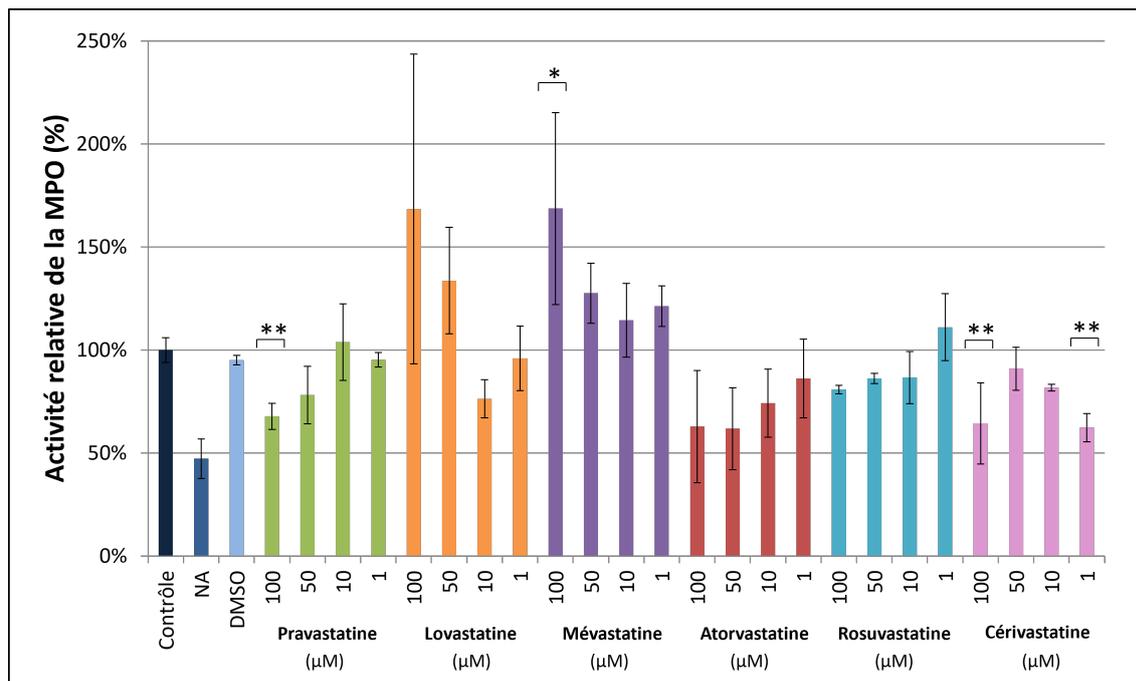


FIGURE 6.31 – Action des statines sur l'activité oxydante de la MPO libérée par les PMNs activés, via un test SIEFED (NA : contrôle PMNs non activés par du fMLP). Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

### 6.6.5 Bilan de l'action des statines sur les PMNs

Pour conclure, l'impact global des statines sur les PMNs est faible. Les seuls effets observés apparaissent à hautes concentrations, largement supérieures aux concentrations plasmatiques observées lors du traitement de patients (voir section 6.2). L'atorvastatine et la rosuvastatine ne montrent aucune action inhibitrice sur les deux propriétés des PMNs, la production de ROS et la dégranulation qui libère la MPO. La pravastatine et la cérivastatine montrent uniquement une faible interaction avec la myéloperoxydase libérée par les cellules, à haute concentration, mais elles n'empêchent pas la libération de l'enzyme dans le milieu extracellulaire. La cérivastatine montre également, tout comme la mévastatine, une capacité à réduire la production d'anions superoxydes et donc de ROS par des PMNs activés, après une incubation d'une heure. Cet effet n'étant pas corrélé à une augmentation de la mortalité cellulaire et les deux statines n'agissant pas comme piègeurs de l'anion superoxyde, on peut supposer que le mécanisme d'inhibition doit agir au niveau d'une ou plusieurs étapes du processus de production de ROS par le complexe NADPH oxydase. Des tests spécifiques sont nécessaires pour investiguer le mécanisme d'action précis. Les statines empêchent-elles l'assemblage du complexe ? Bloquent-elles son fonctionnement ? Agissent-elles au niveau de l'échange d'électrons au sein du complexe ? Pour finir, la lovastatine provoque l'apoptose des PMNs. Dans ce travail, cet effet est observé uniquement à haute concentration, i.e. 100 μM. Cependant, Zhang et al. ont montré que des concentrations plus faibles, 30 nM, peuvent induire le même effet dans des organismes modèles comme le poisson-zèbre [624]. L'induction de la mort cellulaire permet d'inhiber la production d'anions superoxydes mais peut également augmenter la libération de MPO dans le milieu extracellulaire.

## 6.7 Etude de l'action des statines sur l'activité oxydante de la myéloperoxydase

Les six statines étudiées dans ce travail ne sont pas capables de réduire la libération de myéloperoxydase par des PMNs stimulés. Le premier test SIEFED réalisé sur la MPO dégranulée a montré que l'interaction des statines avec la MPO est faible, voire inexistante (figure 6.31).

Cependant, il est tout de même intéressant d'étudier l'action des molécules d'intérêt sur la MPO purifiée. En effet, lors du premier SIEFED, les statines sont incubées en présence de MPO mais également d'autres molécules et d'autres protéines libérées par la dégranulation. Celles-ci peuvent potentiellement interférer et perturber l'interaction entre les statines et la MPO. Dans le milieu physiologique, l'ensemble des enzymes du processus inflammatoire sont présentes et il est essentiel d'avoir connaissance de leur impact sur l'éventuelle action inhibitrice des molécules d'intérêt. Il est néanmoins intéressant d'étudier l'interaction des statines avec l'enzyme en l'absence d'éléments perturbateurs, d'évaluer leur capacité d'insertion dans le site actif et de faire la comparaison avec les résultats obtenus grâce au *docking*.

De plus, le test SIEFED permet uniquement d'obtenir des informations sur la capacité de liaison des molécules avec le site actif. Or, cette liaison n'est pas nécessaire pour inhiber l'activité oxydante de l'enzyme, seule l'insertion est requise. La structure des statines la permet-elle dans le site actif? Un échange d'électrons est-il possible avec les intermédiaires redox de l'enzyme? Peuvent-elles inhiber le cycle de peroxydase et/ou de chloration?

### 6.7.1 Interaction avec le cycle de peroxydase

Lorsqu'on ne réalise pas l'étape de lavage caractéristique du SIEFED, l'ensemble des molécules d'intérêt restent en solution et peuvent interagir avec la MPO lors de la mesure (voir section 2.3.2).

Les six statines testées ne sont pas des inhibiteurs efficaces de l'activité peroxydasique de la MPO (figure 6.32). Seules la pravastatine et la lovastatine induisent une faible diminution significative de l'activité oxydante de l'enzyme, 28% pour la pravastatine à 100  $\mu\text{M}$  et 32% pour la lovastatine à 50  $\mu\text{M}$ . Globalement, les six molécules n'inhibent pas l'activité de l'enzyme à la plus faible concentration testée, proche des concentrations physiologiques.

Ces résultats, associés aux premiers résultats SIEFED du contenu de dégranulation des PMNs, montrent que les statines, si elles ont la capacité de s'insérer dans le site actif de la MPO comme suggéré par le *docking*, ne peuvent pas y former de liaisons fortes. Elles ne sont pas capables de céder un électron aux intermédiaires du cycle de peroxydase, composé I et composé II, et de jouer le rôle de substrat réducteur.

Cette conclusion est corroborée par l'estimation des valeurs du potentiel d'oxydoréduction des statines (voir section 6.5.1). En effet, ces molécules sont caractérisées par des potentiels redox supérieurs à 1 V et donc supérieurs au potentiel du couple enzyme native/composé II (0,97 V). Par conséquent, elles ne peuvent agir comme réducteurs pour le composé II de l'enzyme. En ce qui concerne l'interaction avec le composé I, certaines statines (rosuvastatine, pravastatine) ont un potentiel supérieur à celui du couple composé II/composé I (1,35 V). Les potentiels de la lovastatine et de l'atorvastatine déterminés dans ce travail sont légèrement inférieurs. Les deux molécules pourraient donc agir comme réducteurs envers le composé I, mais elles sont en compétition avec le nitrite, utilisé ici pour stimuler le cycle de peroxydase, qui possède un potentiel proche (1,04 V) [583]. De plus, la taille des molécules est en faveur d'une interaction préférentielle avec le nitrite, qui peut s'insérer plus facilement dans le site

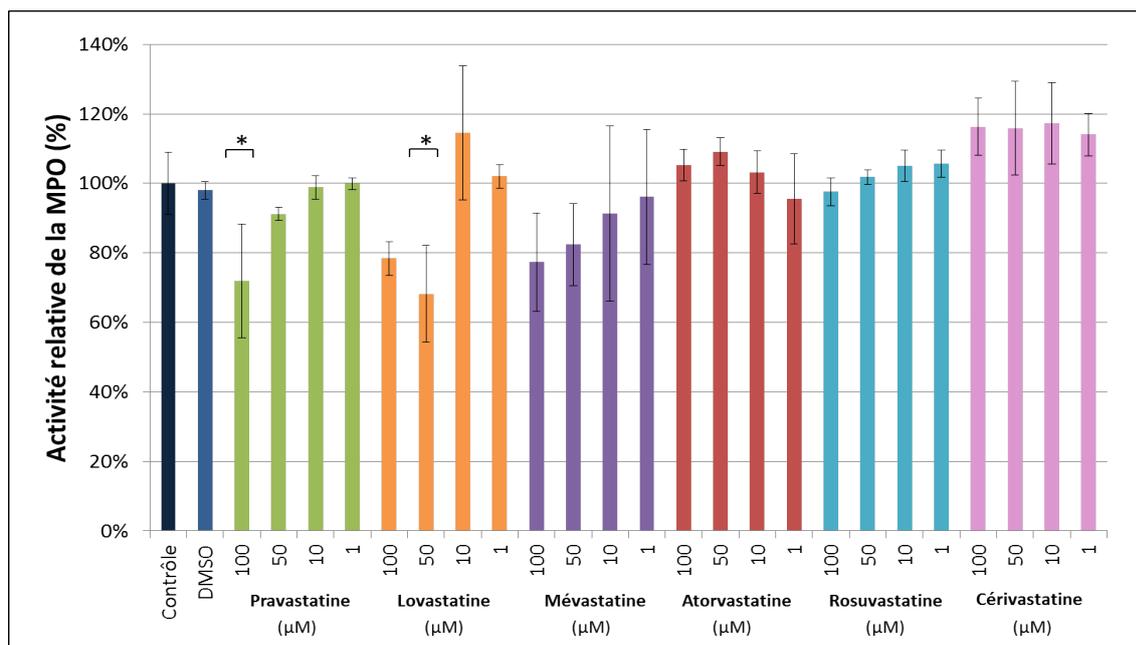


FIGURE 6.32 – Action des statines sur l'activité peroxydasique de la MPO. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

actif. En effet, l'encombrement stérique de la structure des statines est en défaveur d'une insertion de la molécule dans le site actif, malgré les résultats obtenus grâce au *docking*.

## 6.7.2 Interaction avec le cycle de chloration

La MPO possède une propriété unique de production de l'acide hypochloreux, via le cycle de chloration (voir section 2.3.3). Lors de l'étude de l'action inhibitrice des statines sur le cycle de peroxydase, le nitrite, utilisé pour accélérer le cycle, peut entrer en compétition avec elles pour interagir avec le composé I. Lors de l'étude de leur action sur le cycle de chloration, le nitrite n'est pas utilisé. Dans ce test, les statines sont en compétition avec les ions chlorure pour réduire le composé I et empêcher la formation de l'acide hypochloreux. L'affinité du composé I avec les ions chlorure et la prédominance du cycle de chloration par rapport à celui de peroxydase dépendent du pH du milieu [54]. Seule l'action inhibitrice de la lovastatine et de l'atorvastatine, caractérisées par des potentiels redox permettant la réduction du composé I, été étudiée grâce à la spectroscopie de fluorescence dans deux tampons de pH différents (5,5 et 7,4) (voir section 2.3.3).

### 6.7.2.1 Milieu acide - pH 5,5

La lovastatine ne montre pas d'action inhibitrice de l'activité de chloration de la MPO (figure 6.33). A pH acide, l'interaction entre les ions chlorure et le composé I domine celle de la molécule. L'atorvastatine montre quant à elle une légère inhibition de 19% à la plus forte concentration de 100μM. Cependant, les deux molécules ne montrent aucune action inhibitrice, à la concentration (1 μM) proche de celles détectées dans le sang de patients traités.

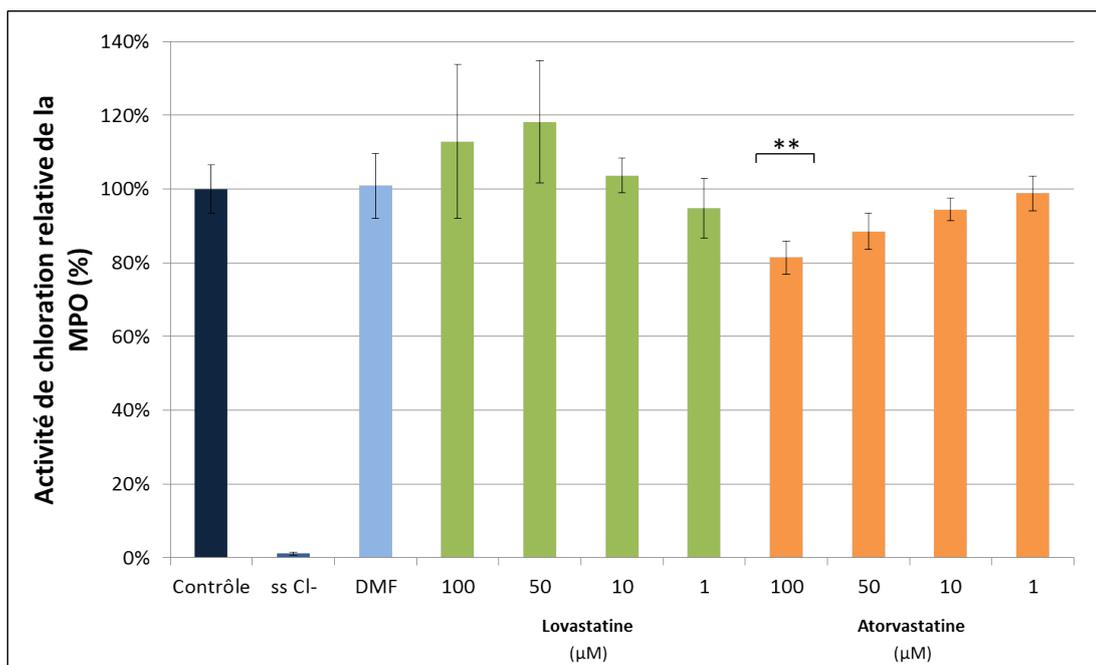


FIGURE 6.33 – Action de la lovastatine et de l’atorvastatine sur l’activité de chloration de la MPO à pH 5,5. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMF).

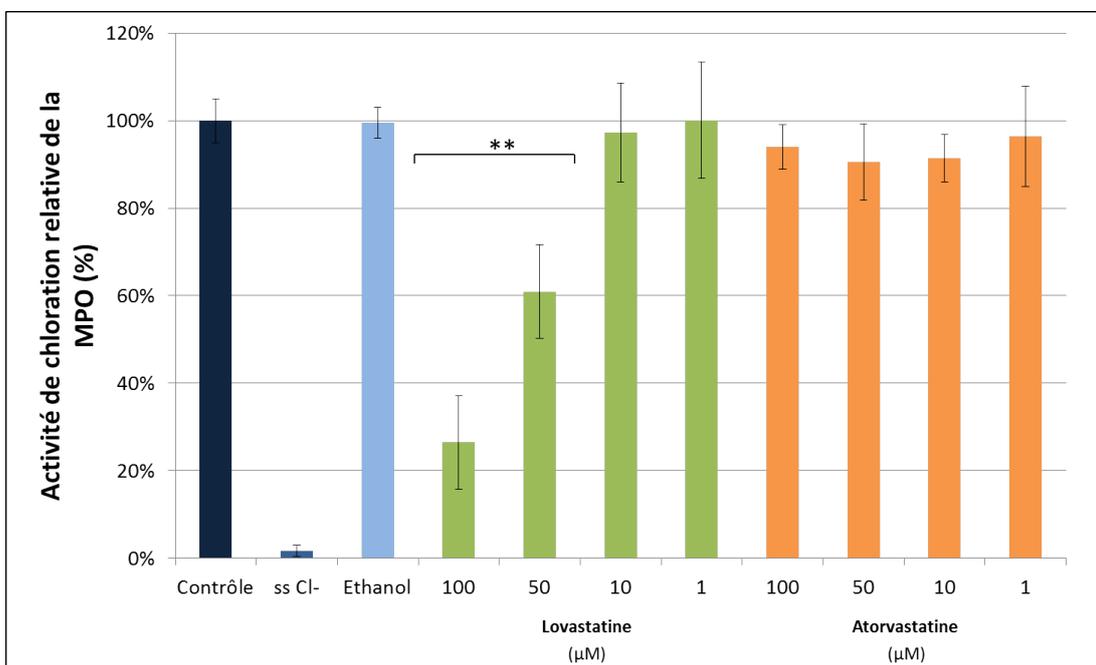


FIGURE 6.34 – Action de la lovastatine et de l’atorvastatine sur l’activité de chloration de la MPO à pH 7,4. Le pourcentage d’inhibition de l’activité de l’enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (éthanol).

### 6.7.2.2 Milieu extracellulaire - pH 7,4

La basification du milieu augmente fortement l'action inhibitrice de la lovastatine aux deux plus fortes concentrations testées (figure 6.34). Une inhibition de 74% est observée à 100  $\mu\text{M}$  et elle chute à 40% à 50  $\mu\text{M}$ . Par contre, l'atorvastatine ne montre toujours aucune action inhibitrice, quelle que soit la concentration utilisée.

Le mécanisme d'action de la lovastatine est probablement une combinaison entre son interaction avec le composé I, en compétition avec les ions  $\text{Cl}^-$ , et sa capacité à piéger l' $\text{HOCl}$  (figure 6.24). La basification du milieu favorise la compétition entre la statine et les ions chlorure ainsi que le détournement de l'action de chloration vers celle de peroxydase, phénomène déjà observé pour d'autres substrats [54]. De ce fait, l'absence d'inhibition observée pour l'atorvastatine est surprenante. En effet, la molécule montre une action de piégeage de l'acide hypochloreux importante à haute concentration, qui ne s'observe pas ici.

### 6.7.3 SIEFED

La méthode SIEFED permet d'étudier expérimentalement la capacité d'un ligand à se fixer au site actif de la MPO et d'évaluer la force des liaisons formées (voir section 2.3.4). Contrairement au premier test SIEFED réalisé sur le contenu de dégranulation des PMNs (figure 6.31), celui-ci est réalisé sur la MPO purifiée en l'absence de toute autre enzyme (figure 6.35).

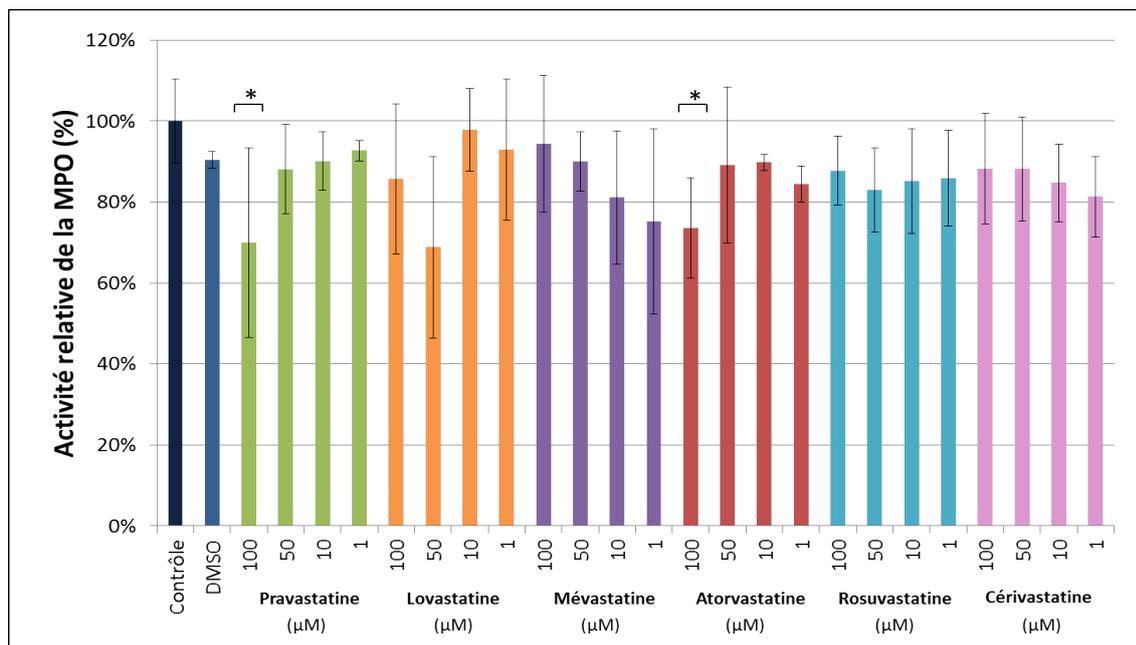


FIGURE 6.35 – Action des statines sur l'activité oxydante de la MPO, mesurée par SIEFED. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme a été calculé pour chaque composé par rapport à son contrôle solvant, considéré comme 100%. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (N=3 et n=3). Sont trouvés statistiquement significatifs : \*\*P<0,01 ou \*P<0,05 par rapport au contrôle solvant (DMSO).

Seules la pravastatine et l'atorvastatine induisent une réduction de l'activité peroxydasique d'environ 30%, à 100  $\mu\text{M}$ . Ces résultats montrent l'impossibilité des statines de se fixer au site actif de l'enzyme.

#### 6.7.4 Bilan de l'action des statines sur la myéloperoxydase

Dans l'ensemble, les statines ne sont pas des inhibiteurs efficaces de l'action oxydante de la MPO. Elles n'agissent pas efficacement, que ce soit sur le cycle de peroxydase ou sur le cycle de chloration. Leur structure complexe et leur encombrement stérique rendent difficile leur insertion dans le site actif de l'enzyme. Elles ne sont pas capables de former des liaisons suffisamment fortes pour résister à l'étape de lavage du SIEFED. Leurs potentiels d'oxydoréduction élevés en font de mauvais substrats réducteurs pour les composés intermédiaires de la MPO. Seule la lovastatine a montré une capacité de réduction de l'activité de chloration à pH neutre. Cependant, cette action a lieu lorsque de fortes concentrations en molécules sont utilisées, largement supérieures aux concentrations plasmatiques détectées chez des patients.

### 6.8 Conclusion

Six statines (lovastatine, mévastatine, pravastatine, cérvastatine, rosuvastatine et atorvastatine) ont été étudiées sur trois aspects du processus inflammatoire : les PMNs, la MPO et les ROS. De façon générale, ce travail a montré que l'impact anti-inflammatoire de ces six molécules est faible, voire inexistant. En effet, les molécules ne sont pas des piègeurs efficaces de ROS, ni des substrats réducteurs ou des ligands efficaces pour la MPO. De plus, elles n'inhibent pas efficacement la production de ROS par les PMNs, ainsi que leur libération de MPO.

Parmi les six molécules testées, seules la lovastatine, la mévastatine et l'atorvastatine se sont démarquées. En effet, la lovastatine a montré une action inhibitrice du cycle de chloration à de hautes concentrations mais, plus important encore, elle induit l'apoptose des PMNs, réduisant de ce fait leur production d'anion superoxyde mais augmentant la libération de MPO dans le milieu extracellulaire. De façon similaire, la mévastatine réduit la production de ROS via la réduction de la production de l'anion superoxyde. Cependant, de façon surprenante, étant donné la similarité entre les structures des deux statines, cette dernière n'induit pas la mort cellulaire des PMNs. L'atorvastatine ne montre aucune action inhibitrice significative sur les activités oxydantes de la MPO. La seule contribution de la molécule pourrait être sa capacité de piégeage de l'acide hypochloreux et de l'oxygène singulet.



---

## Conclusion générale

---



L'établissement de traitements contre les pathologies inflammatoires chroniques, qui réduisent fortement le confort de vie des malades et peuvent mener à long terme à l'apparition de pathologies encore plus sévères comme le cancer, reste toujours un défi important à relever et fait l'objet de nombreuses recherches. Le repositionnement des médicaments est une voie très intéressante et de plus en plus privilégiée afin d'accélérer le processus long et complexe qu'est le développement de nouveaux traitements. De plus, la connaissance préliminaire de la posologie et de la toxicité des molécules étudiées permet de réduire le risque de la découverte, lors des tests précliniques *in vivo*, de leur toxicité aux posologies nécessaires à leur nouvelle action.

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer les propriétés immunomodulatrices de composés ayant des indications thérapeutiques et une utilité clinique avérées dans d'autres domaines que celui du traitement de l'inflammation. Un caractère anti-inflammatoire peut offrir à ces molécules une nouvelle perspective d'action dans une autre voie thérapeutique. Pour certains composés, l'ajout d'une propriété immunomodulatrice à leur action clinique initiale peut être considéré comme un atout supplémentaire.

Ce travail propose une approche multidisciplinaire associant différentes techniques d'analyse (spectroscopies de fluorescence, d'absorption et RPE, voltammétrie, modélisation moléculaire) permettant d'étudier l'impact de molécules d'intérêt sur une sélection d'espèces et de mécanismes essentiels du processus inflammatoire. Les expériences menées se sont concentrées sur l'étude de l'action de ces molécules sur les processus oxydants des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) et de l'enzyme myéloperoxydase (MPO). Ces deux marqueurs de l'inflammation, dont l'activité est étroitement liée, font partie des cibles importantes pour le traitement de pathologies inflammatoires.

Ce travail a mis en place une méthodologie originale d'investigation de la capacité des composés d'intérêt à moduler, voire à inhiber l'action oxydante de la MPO (cycle de peroxydase et de chloration). Les différentes informations récoltées permettent de comprendre, ou du moins dans certains cas de donner des pistes pour la détermination du mécanisme d'inhibition des molécules. En effet, le coût élevé de la MPO représente une contrainte importante qui a conduit à la sélection de techniques et de protocoles permettant d'acquérir des informations avec une consommation limitée que ce soit de l'enzyme ou des molécules testées elles-mêmes. Les résultats obtenus permettent de sélectionner parmi ces composés, ceux présentant une action prometteuse. Ceux-ci pourront alors faire l'objet d'une étude plus approfondie nécessitant l'utilisation potentielle de techniques d'analyse plus coûteuses en réactifs.

Etant donné que l'activité de la MPO est étroitement liée à celle des PMNs, ce travail a également étudié l'impact des molécules d'intérêt sur divers mécanismes caractéristiques des cellules comme la production de ROS et la dégranulation. L'évaluation du potentiel d'oxydoréduction des différents composés étudiés ainsi que de leurs propriétés de piégeage de radicaux et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a permis d'obtenir des informations complémentaires essentielles à la compréhension des mécanismes d'inhibition observés.

Dans le cadre de cette thèse, le choix des inhibiteurs potentiels à étudier s'est porté, comme évoqué précédemment, sur des molécules déjà employées dans d'autres traitements que celui de l'inflammation mais ayant néanmoins déjà montré une action antioxydante *in vitro* ou *in vivo*. Les molécules sélectionnées sont la morphine (molécule analgésique), le propofol (molécule anesthésiante), six statines (molécules hypocholestérolémiantes) et six molécules anticancéreuses. Leur étude a laissé apparaître différentes propriétés immunomodulatrices. Un tableau récapitulatif des résultats de ce travail est repris en annexe A. Ces résultats ont ouvert la perspective d'investigations complémentaires. Tout d'abord, des composés comme la morphine ou

encore l'atorvastatine présentent des capacités de piégeage de ROS (anion superoxyde, acide hypochloreux, oxygène singulet). D'autres comme le propofol et deux de ses dérivés (PPFQ et PPFQD) ainsi que l'anticancéreux 6-thioguanine, montrent une activité intéressante en tant qu'inhibiteurs de la production d'anions superoxydes par les PMNs activés. Des pistes permettant d'expliquer des mécanismes d'action intervenant pour chaque molécule ont été proposées mais des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer à quel niveau les molécules agissent sur le complexe NADPH oxydase à savoir : phosphorylation des sous-unités, migration des sous-unités cytosoliques, assemblage du complexe protéique, échange d'électrons,... Dans cette perspective, une étude de l'action des molécules d'intérêt sur les éléments isolés du complexe représente une voie intéressante. Enfin, ces molécules sont également, à des concentrations physiologiques, des inhibiteurs efficaces de l'activité oxydante de la MPO. Plus particulièrement, les résultats obtenus pour le PPFQ et la 6-thioguanine suggèrent la formation d'un complexe avec l'enzyme. Malgré les différentes expériences menées, la preuve de la liaison covalente irréversible de la 6-thioguanine au sein du site actif de la MPO reste encore à apporter, notamment par une étude cristallographique de la structure du complexe.

L'action inhibitrice des molécules d'intérêt ayant été évaluée uniquement sur une sélection de mécanismes liés à la MPO et aux PMNs, l'étude de leur impact sur les phénomènes de phagocytose et de nétose serait également extrêmement intéressante, étant donné leur rôle important dans le processus inflammatoire. De surcroît, la sélection des molécules anticancéreuses retenues pour ce travail est assez restreinte. Il en existe encore énormément d'autres, présentant des structures variées, dont il serait intéressant d'évaluer les propriétés immunomodulatrices. En ce qui concerne les résultats obtenus avec la 6-thioguanine, associés à ceux publiés dans la littérature sur les thioxanthines (molécules inhibitrices prometteuses mais dont l'étude a été arrêtée en raison de leur toxicité), ils montrent que la présence d'un atome de soufre permet à une molécule, si elle est capable d'être oxydée par la MPO, d'agir comme inhibiteur irréversible de l'enzyme. L'étude d'autres composés présentant ces caractéristiques pourrait s'avérer être une piste prometteuse.





---

# Annexes

---



# Annexe A

## Résumé des résultats

	Activité réductrice et oxydante (piégeage)				Inhibition de l'activité oxydante des PMNs		Inhibition de l'activité oxydante de la MPO			
	ABTS	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	HOCl	Production de ROS	Dégranulation	Peroxydase	Chloration 5,5	Chloration 7,4	Liaison
morphine	efficace	efficace	efficace	efficace	non	non	forte	faible	faible	non
propofol	efficace	efficace	non	faible	moyenne	non	forte	non	faible	oui (▲)
PPFG	non	non	non	non	non	non	non	non	non	non
PPFQ	non	efficace	non	non	forte	faible (▲)	moyenne	forte	forte	oui
PPFDQ	non	efficace	non	non	forte	faible (▲)	non	non	non	non
6-thioguanine	efficace	efficace	non	efficace	faible (▲)	non	forte	forte	forte	oui (★)
hydroxyurée	efficace	non	non	moyen	non	non	faible	non	non	non
melphalan	non	non	efficace	moyen	/	non	non	moyenne	forte	non
5-fluorouracile	non	non	non	non	/	non	non	non	non	non
cladribine	non	non	non	non	/	non	non	non	non	non
crizotinib	efficace	efficace	efficace	moyen	mort cellulaire (▲)	mort cellulaire (▲)	moyenne	moyenne	forte	oui
lovastatine	non	faible	faible	moyen	mort cellulaire (▲)	mort cellulaire (▲)	non	non	moyenne	non
mévastatine	non	/	faible	/	moyenne (▲)	non	non	/	/	non
atorvastatine	non	faible	efficace	efficace	non	non	non	non	non	non
pravastatine	non	/	non	/	non	non	non	/	/	non
cérovastatine	non	/	non	/	moyenne (▲)	non	non	/	/	non
rosuvastatine	non	non	non	non	non	non	non	/	/	non

(▲) à haute concentration  
(★) après oxydation

FIGURE A.1 – Tableau récapitulatif des résultats des différentes expériences *in vitro* menées dans ce travail.



## Annexe B

# Morphine

### B.1 Etude de l'interaction entre les métabolites glucuronides de la morphine et le site actif de la myéloperoxydase par modélisation moléculaire

La morphine est métabolisée au niveau du foie et ses deux métabolites, la morphine-6-glucuronide et la morphine-3-glucuronide, peuvent être détectés dans le sang des patients (figure B.1). Il est donc intéressant d'étudier l'impact de ces deux composés sur le processus inflammatoire. Dans le but d'évaluer le réel intérêt à se procurer ces molécules et à étudier leur potentielle action inhibitrice sur la MPO et par la suite sur les PMNs, une étude préliminaire de leur interaction avec le site actif de la MPO a été réalisée par *docking*.

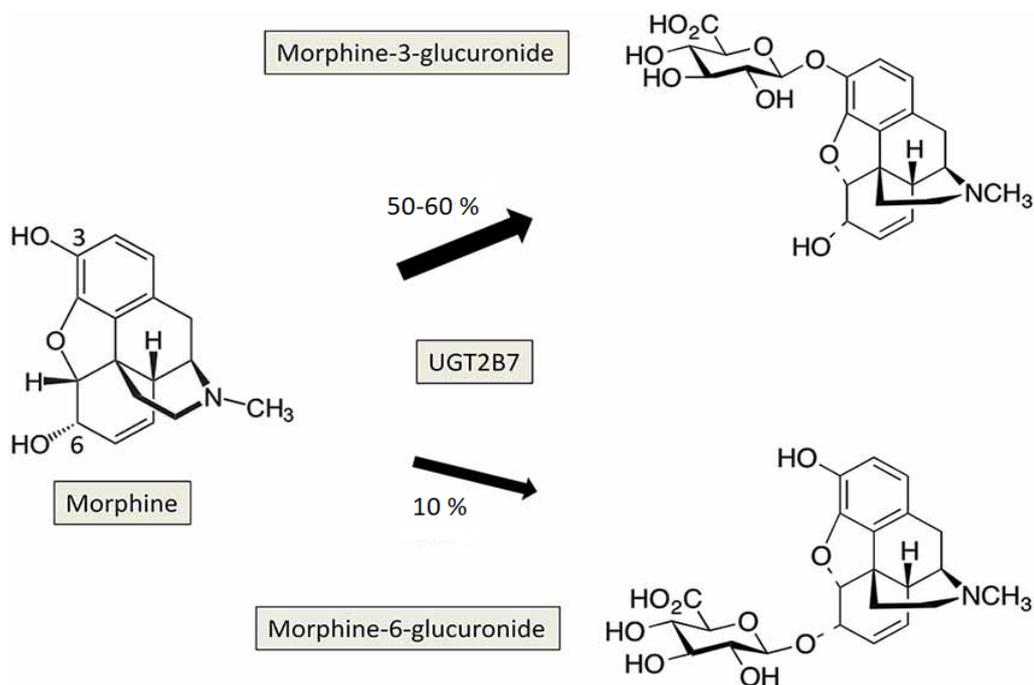


FIGURE B.1 – Métabolisation de la morphine par la UDP-glucuronosyltransférase (UGT2B7) en morphine-3-glucuronide et morphine-6-glucuronide. Image originale de Ouzzine et al. [192]

La première molécule étudiée est la morphine-3-glucuronide, le métabolite principal (figure B.2A). En effet, entre 50 et 60 % de la morphine est transformée en ce composé [200]. La molécule s'insère partiellement dans le site actif de l'enzyme et dans le canal d'entrée. La

partie glucuronide est positionnée au-dessus de l'hème, ce qui permet la formation de ponts hydrogène entre différents atomes d'oxygène du glucuronide et divers acides aminés : Arginine 239, Aspartate 94 et Glutamine 91. Deux liaisons hydrogène sont également possibles avec deux atomes d'azote des cycles pyrroles de l'hème. La molécule de morphine est quant à elle positionnée dans le canal d'accès au site actif.

Sur base du *docking*, une interaction entre la molécule de morphine-3-glucuronide et la MPO semble possible. Cette interaction se ferait principalement par encombrement stérique. En effet, dans le cas de ce métabolite, la liaison du groupement glucuronide est réalisée avec l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle de la fonction phénol de la morphine. Par conséquent, cette liaison devrait réduire fortement, voire totalement, l'action réductrice de la molécule. En effet, Borges et al [206] ont montré par DFT le rôle essentiel des groupements amine et phénol de la morphine pour la cession d'un électron et d'un atome d'hydrogène respectivement. D'autres molécules ont également montré une perte de leur action réductrice suite à l'ajout d'un groupement glucuronide induisant la perte d'un groupement hydroxyle et, par conséquent, d'une fonction phénol [282, 329]. Ce travail a également montré un résultat similaire avec le métabolite du propofol, propofol- $\beta$ -glucuronide (voir chapitre 4).

Bien que le *docking* propose la formation d'un complexe entre la morphine-3-glucuronide et la MPO, cela se traduira-t-il expérimentalement par une inhibition de l'activité de l'enzyme ? En se basant sur les résultats de l'étude du propofol- $\beta$ -glucuronide, on peut fortement en douter. En effet, l'ajout de la fonction glucuronide augmente fortement le volume et donc l'encombrement de la molécule de propofol et de ce fait empêche son insertion dans le site actif. Dans la mesure où la morphine seule connaît déjà des difficultés pour s'insérer efficacement dans le site, on peut aisément supposer que ce sera encore plus le cas pour la morphine-3-glucuronide. Par conséquent, la molécule ne sera pas un inhibiteur efficace de l'enzyme.

L'insertion de la molécule de morphine-6-glucuronide dans le site actif de la MPO a également été étudiée par modélisation. La solution la plus fréquemment obtenue par le programme GOLD est illustrée à la figure B.2B. La différence de liaison entre la molécule de morphine et la partie glucuronide entre la morphine-3-glucuronide et la morphine-6-glucuronide, modifie fortement la capacité d'insertion de la molécule dans le canal d'accès au site actif. En effet, dans le cas de la morphine-6-glucuronide, la molécule est positionnée moins profondément dans la cavité, positionnant le cycle du glucuronide au-dessus du cycle pyrrole D de l'hème. Dans cette configuration, une seule interaction est possible, un pont hydrogène avec l'Arginine 239.

L'interaction entre la morphine-6-glucuronide et la morphine est faible. Bien que le groupement phénol de la morphine soit intact, la faible insertion de la molécule dans le site actif ne permet pas à la partie morphine de la molécule, essentielle pour la propriété réductrice, d'être proche de l'hème, ce qui réduit donc la capacité de la molécule à céder un électron aux intermédiaires redox de l'enzyme.

Sur base de ces résultats, l'étude de l'action inhibitrice des deux métabolites de la morphine n'a pas été approfondie. Tout d'abord, en raison de la dimension importante des molécules par rapport à celle de la cavité du site actif, leur insertion et leur interaction sont supposées faibles. D'autre part, la seule molécule pouvant présenter une action réductrice, la morphine-6-glucuronide, est produite en faible proportion dans l'organisme. En effet, environ 10 % de la morphine est métabolisée dans ce composé [200]. Enfin, la difficulté à se procurer ces composés en quantité suffisante pour réaliser les différentes études de ce travail a mené à l'arrêt des investigations.

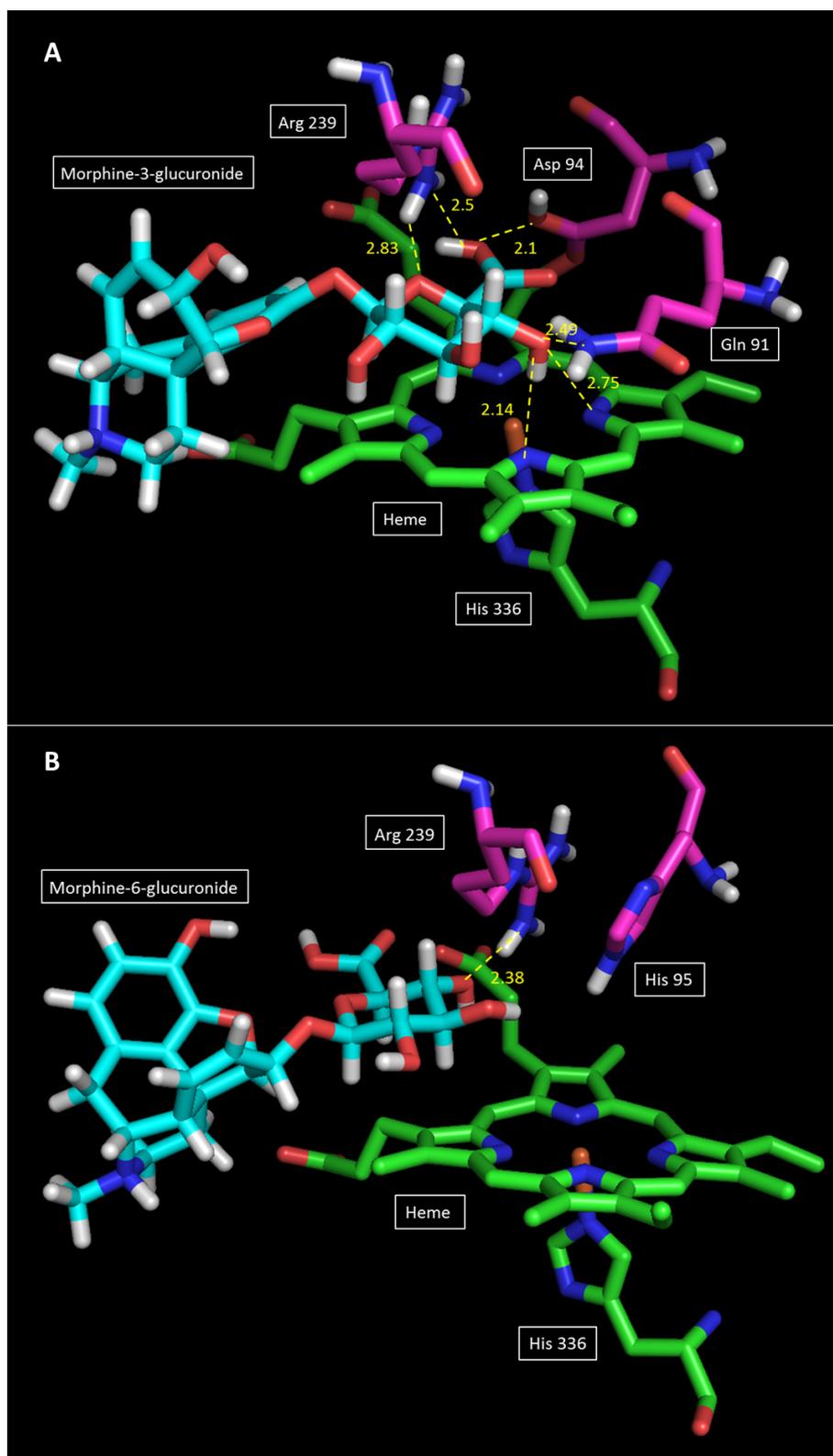


FIGURE B.2 – A : La solution du complexe MPO-morphine-3-glucuronide obtenue par GOLD. B : La solution du complexe MPO-morphine-6-glucuronide obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström.



# Annexe C

## Propofol

### C.1 Synthèse des métabolites du propofol

#### C.1.1 2,6-diisopropyl-1,4-quinone (PPFQ)

##### C.1.1.1 Synthèse

Le PPFQ a été synthétisé selon la méthode décrite par Omura [642]. 2,39g de  $\text{PbO}_2$  sont mis en suspension dans un mélange de 5 ml de  $\text{HClO}_4$  70% et de 15 ml d'acide acétique. Le mélange est agité vigoureusement et une solution de 4 mmol de propofol (715 mg) dans 15 ml d'acide acétique y est ajoutée goutte à goutte.

La solution résultante est mélangée pendant 10 minutes puis filtrée dans un flacon contenant 150 ml d'eau. Le filtrat est lavé à l'éther diéthylique. Pour ce faire, 50 ml d'éther diéthylique sont ajoutés dans le flacon et mélangés. La phase organique est récoltée tandis que la phase aqueuse est lavée une seconde fois avec 50 ml d'éther diéthylique. La seconde phase organique est alors ajoutée à la première.

Le mélange est ensuite lavé avec 50 ml d'eau. La phase organique finale récoltée est séchée avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée et évaporée sous vide. Une huile jaune-orange est alors récoltée.

##### C.1.1.2 Caractérisation

Le spectre d'absorption du PPFQ présente un pic d'absorption à 260 nm, tandis que le propofol est caractérisé par un maximum d'absorption à 271 nm [262] (figure C.1).

#### C.1.2 3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone (PPFDQ)

##### C.1.2.1 Synthèse

Le PPFDQ est synthétisé selon la méthode décrite par Menger et Carnahan [643]. 2,14 g de propofol sont dissous dans 25 ml de chloroforme. La solution est agitée vigoureusement et chauffée à 51°C. 7,6 g de  $\text{KMnO}_4$  sont ensuite ajoutés. La solution est à nouveau agitée pendant une heure et demie puis filtrée. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide. Le solide est recristallisé dans le méthanol, c'est-à-dire dissous dans celui-ci, légèrement chauffé, filtré et séché. Un solide rouge est alors récolté.

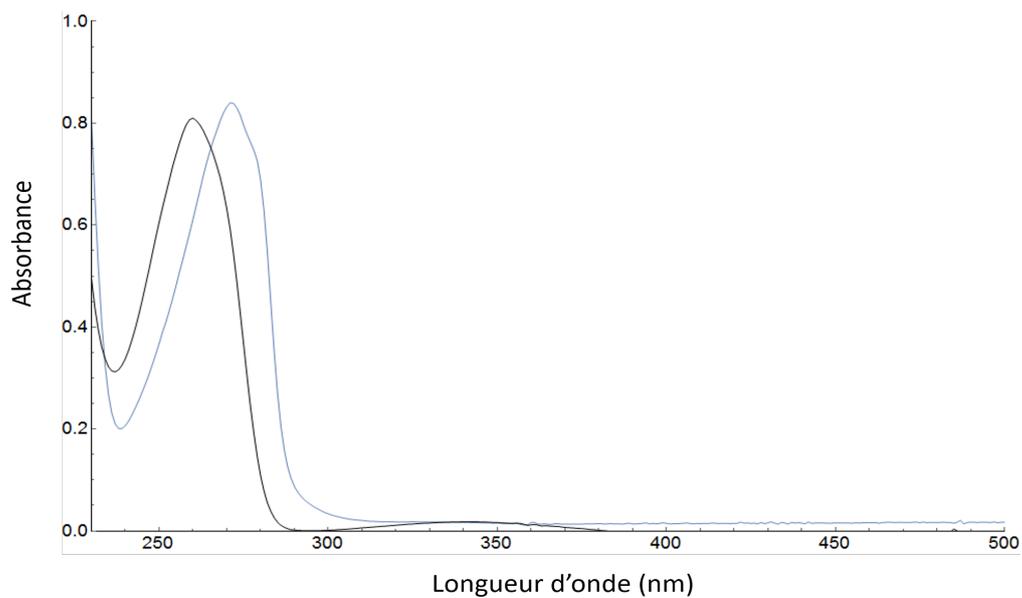


FIGURE C.1 – Spectre d'absorption de la 2,6-diisopropyl-1,4-quinone (PPFQ) ( $10^{-4}\text{M}$ ) (spectre noir) et du propofol ( $10^{-4}\text{M}$ ) (spectre bleu) dans du tampon phosphate pH 7,4.

### C.1.2.2 Caractérisation

Le spectre d'absorption du PPFQ présente un maximum d'absorption à 429 nm dans du tampon phosphate pH 7,4 [262] (figure C.2).

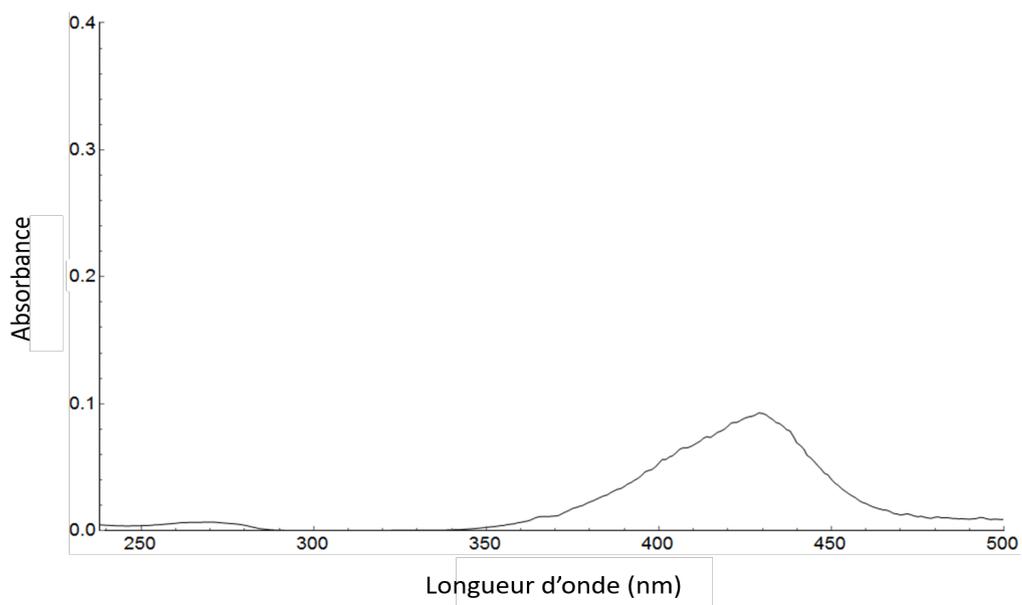


FIGURE C.2 – Spectre d'absorption de la 3,5,3',5'-tétraisopropyl-(4,4')-diphénoquinone (PPFDQ) ( $10^{-4}\text{M}$ ) dans du tampon phosphate pH 7,4.

## C.2 Etude de l'interaction entre les métabolites du propofol et le site actif de la myéloperoxydase par modélisation moléculaire

### C.2.1 1-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide - PPFQ-1-G

Le programme de *docking* GOLD positionne le PPFQ-1-G dans le canal d'entrée du site actif de la myéloperoxydase (figure C.3). La molécule n'est pas placée partiellement au-dessus de l'hème. La partie propofol de la molécule se trouve à l'entrée du canal, tandis que le groupement glucuronide se trouve entre les deux bras de l'hème, les deux chaînes d'acide propanoïque. Ce positionnement permet la formation de deux ponts hydrogène entre deux atomes d'oxygène du glucuronide avec, d'une part, l'arginine 239 et, d'autre part, une des chaînes d'acide propanoïque. Le complexe MPO-PPFQ-1-G proposé par la modélisation moléculaire est semblable au complexe proposé pour le MPO-PPFG. Or, les différentes mesures réalisées sur le PPFQ-1-G ont montré la faible interaction entre la molécule et l'enzyme. La présence du groupement glucuronide impacte négativement la capacité réductrice de la molécule et sa capacité de liaison dans le site actif de l'enzyme. Sur base du *docking*, il semblerait que la présence d'un second groupement hydroxyle sur la molécule de propofol pour le PPFQ-1-G ne modifie par l'interaction de la molécule par rapport au PPFQ-1-G. On peut donc supposer que la molécule PPFQ-1-G n'est pas un inhibiteur efficace de la MPO. Le groupement glucuronide semble réduire la capacité d'insertion de la molécule dans le site actif et ne lui permet pas de s'approcher suffisamment de l'hème pour favoriser l'échange d'électrons.

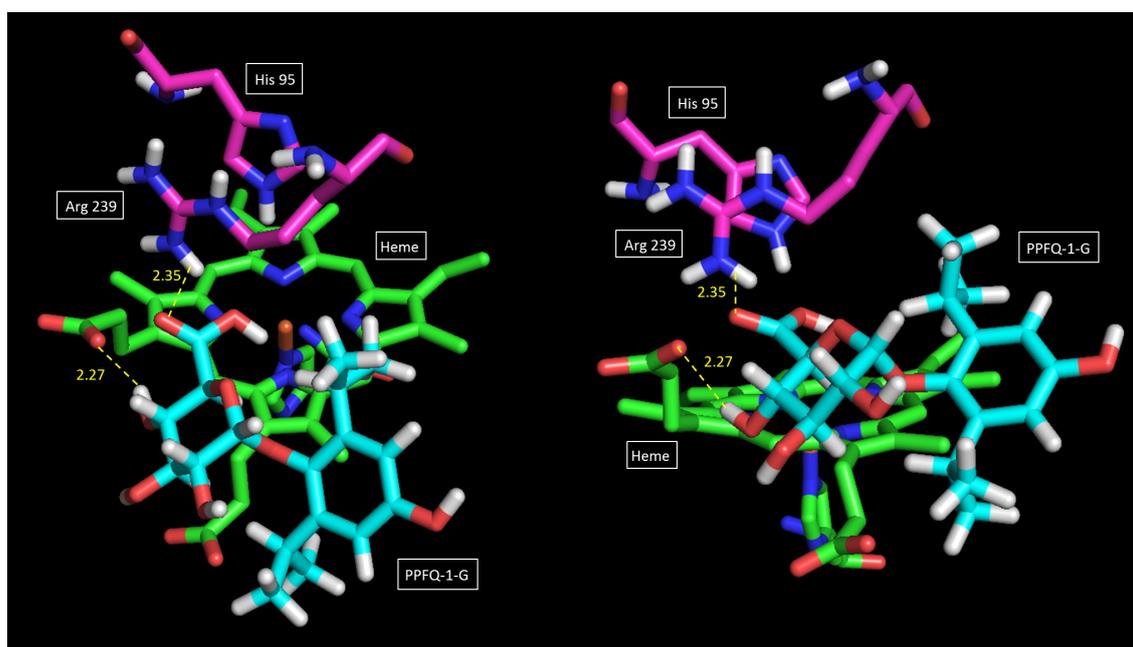


FIGURE C.3 – La solution du complexe MPO-1-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström.

### C.2.2 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide - PPFQ-4-G

L'insertion de la molécule de PPFQ-4-G dans le site actif de la MPO a également été étudiée par modélisation. La solution la plus fréquemment obtenue par le programme GOLD est illustrée à la figure C.4. Par rapport au PPFQ, la molécule de PPFQ-4-G est positionnée dans l'autre sens dans le canal d'accès au site actif. En effet, la partie propofol est insérée plus profondément dans le canal que le groupement glucuronide. Le propofol est placé entre les deux chaînes d'acide propanoïque de l'hème ce qui permet la formation d'un pont hydrogène entre le groupement hydroxyle et un des acides. Un atome du glucuronide forme quant à lui une liaison hydrogène avec l'autre acide. Bien que le positionnement du PPFQ-4-G diffère de celui de PPFQ-1-G, l'interaction et la probabilité de formation réelle du complexe est faible.

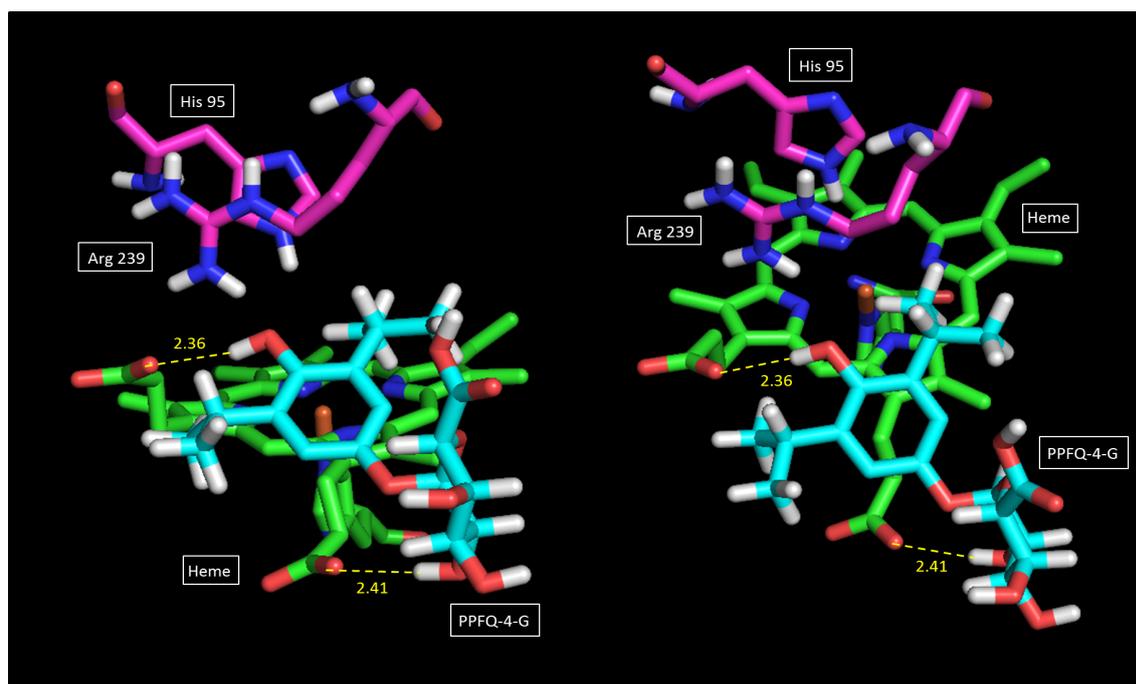


FIGURE C.4 – La solution du complexe MPO-4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-glucuronide obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström.

### C.2.3 4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-sulfate - PPFQ-4-S

La présence d'un groupement sulfate sur le composé quinole du propofol semble augmenter l'interaction de la molécule avec le site actif de la MPO (figure C.5). En effet, la solution unique proposée par le programme de modélisation place ce groupement sulfate au-dessus de l'hème. Ce positionnement permet différentes interactions avec le site actif. Tout d'abord, un empilement  $\pi$ - $\pi$  est possible entre le cycle de la molécule et le cycle pyrrole D de l'hème. Ensuite, deux ponts hydrogène peuvent s'établir entre l'arginine 239 et deux atomes d'oxygène du groupement sulfate.

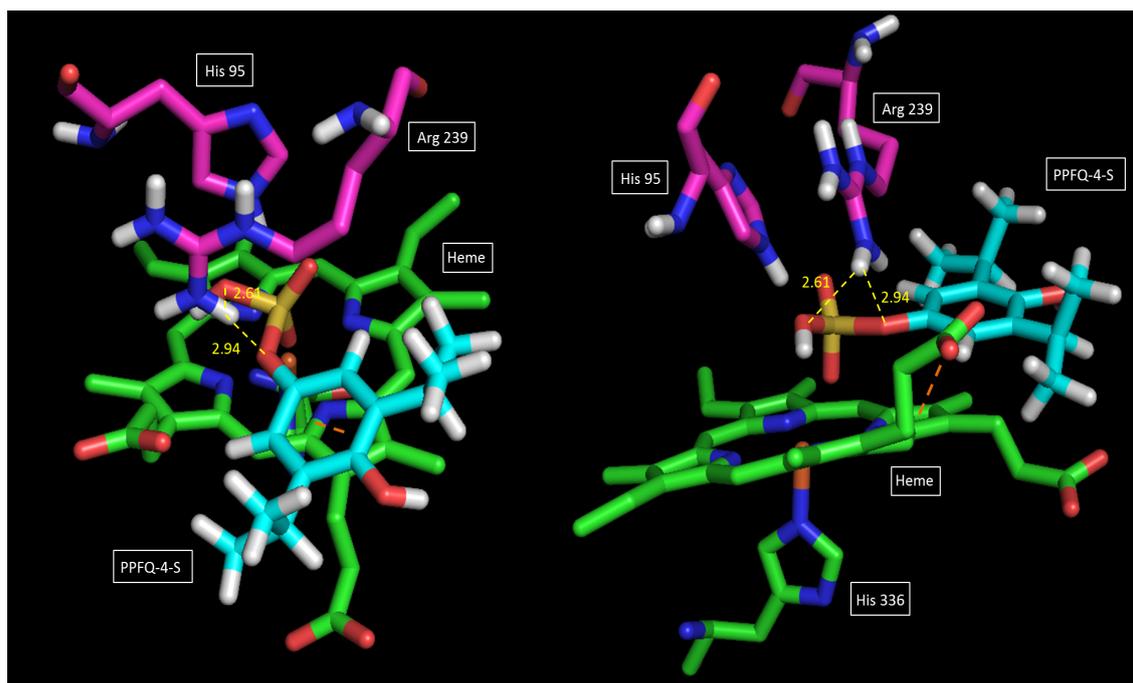


FIGURE C.5 – La solution du complexe MPO-4-(2,6-diisopropyl-1,4-quinol)-sulfate obtenue par GOLD. Les traits pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène. Les distances sont données en Angström. Les traits pointillés orange représentent les interactions  $\pi$ - $\pi$ .



## Annexe D

# Stratégie expérimentale - Aspects techniques

### D.1 Etude de l'activité réductrice et antioxydante des molécules d'intérêt

#### D.1.1 Détermination du potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction des molécules d'intérêt a été évalué grâce à la voltammétrie cyclique (voir annexe E). Un dispositif à trois électrodes (figure D.1) est utilisé dans une cellule en verre, contenant 30 ml d'échantillon. Celui-ci est constitué d'une solution de 1 mM en molécules d'intérêt dans du tampon phosphate pH 7,4. Une électrode de calomel saturée (SCE) et une électrode de platine sont utilisées comme électrode de référence et contre-électrode, respectivement. Une électrode de carbone vitreux, préalablement polie avec du papier verre et nettoyée avec de l'éthanol et de l'eau distillée avant chaque mesure, est employée comme électrode de travail. Tous les échantillons sont dégazés avec de l'azote pendant les dix minutes précédant le déclenchement de la mesure électrochimique et sont gardés sous atmosphère inerte. Le voltammogramme de chaque molécule d'intérêt est acquis en utilisant un potentiostat SP-200 (Biologic) contrôlé par le programme EC-Lab.

Les valeurs de potentiel obtenues grâce aux voltammogrammes sont exprimées par rapport à l'électrode de référence SCE. Elles sont ensuite recalculées pour être exprimées par rapport à l'électrode normale à hydrogène (ESH) (voir annexe E).

#### D.1.2 Etude de l'action de piégeage de radicaux - Méthode ABTS

La capacité des molécules d'intérêt à réduire des espèces radicalaires a été évaluée avec la méthode ABTS. Les cations radicalaires  $ABTS^{+\cdot}$  sont produits en ajoutant un volume équivalent de persulfate de potassium ( $C_{initiale} = 0,02$  M) à une solution d'ABTS ( $C_{initiale} = 0,05$  M). La solution obtenue est alors incubée une nuit dans le noir à température ambiante, afin de permettre l'oxydation totale de l'ABTS. La solution d' $ABTS^{+\cdot}$  présente une coloration verte. Après l'incubation, la solution est diluée 200 fois dans de l'eau MilliQ. Dans les puits d'une plaque 96 puits, 190  $\mu$ l de la solution sont ajoutés à 10  $\mu$ l des différentes molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu$ M (concentrations finales)) ou de leur solvant respectif.

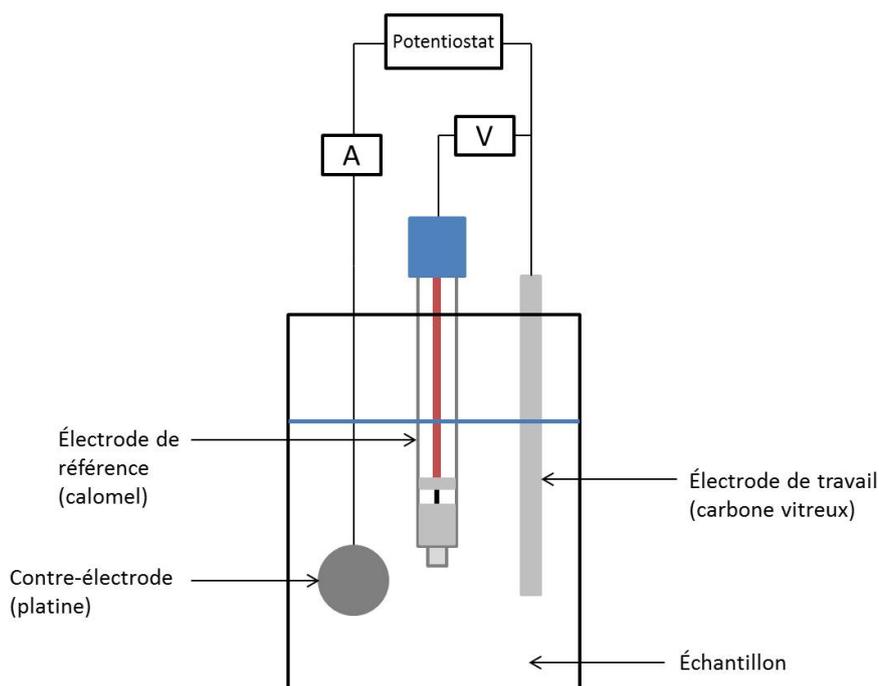


FIGURE D.1 – Schéma d'une cellule électrochimique à trois électrodes.

Un spectromètre Multiskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer l'absorbance de la solution d'ABTS<sup>+</sup> à 740 nm, directement après l'ajout de la solution dans les puits. La mesure est également répétée après une heure d'incubation dans le noir. La capacité de piégeage des radicaux ABTS<sup>+</sup> par les différentes molécules d'intérêt peut être évaluée en mesurant la décroissance de l'absorbance de la solution par rapport à l'absorbance de la solution contrôlée, considérée comme 100%, contenant la solution ABTS<sup>+</sup> et leur solvant respectif.

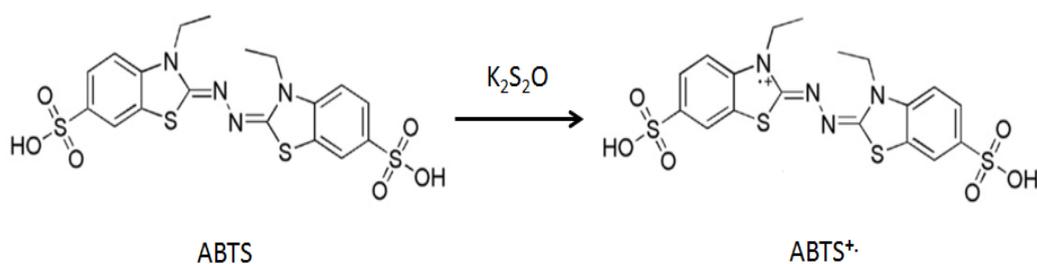


FIGURE D.2 – Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium.

### D.1.3 Etude de l'action de piégeage de ROS - Anion superoxyde

Dans un premier temps, l'action de piégeage de l'anion superoxyde par les molécules d'intérêt a été évaluée grâce à la spectroscopie RPE et au *spin trapping* (voir annexe E). L'anion superoxyde a été produit par un système enzymatique, xanthine/xanthine oxydase.

De la xanthine oxydase ( $C_{finale} = 2$  mg/ml), un piègeur de spin : le DMPO ( $C_{finale} = 200$  mM), du DTPA ( $C_{finale} = 0,4$  mM), de la xanthine ( $C_{finale} = 4$  mM) et différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu$ M (concentrations finales)) sont mé-

langés dans du tampon phosphate pH 8. La solution est immédiatement collectée dans un capillaire en quartz et le spectre RPE du DMPO-OOH est alors obtenu. Les paramètres d'acquisition des spectres sont les suivants : gain  $10^5$ , amplitude de modulation 1 Gauss, constante de temps 81,92 ms, temps de conversion 40 ms et nombre de scans 2. L'intensité du signal RPE est déterminée par double intégration du spectre RPE. La superoxyde dismutase (SOD) a été utilisée afin de contrôler la production d'anions superoxydes par le système enzymatique. La capacité de piégeage de l'anion superoxyde par les molécules d'intérêt (et donc la compétition entre elles et le DMPO), peut alors être évaluée en observant la décroissance de l'intensité du signal RPE du DMPO-OOH.

Dans une seconde expérience, le  $\text{KO}_2$  a permis de produire l'anion superoxyde afin de s'affranchir de toute espèce enzymatique qui pourrait potentiellement interagir avec les molécules testées. Pour cette expérience, la chimiluminescence de la sonde L-012 a été préférée à la spectroscopie RPE.

Une solution de  $\text{KO}_2$  0,1 M est préparée dans un mélange de méthanol/eau (60%/40% en volume). En effet, l'anion superoxyde est généré en dissolvant un sel superoxyde dans des solvants aprotiques [350]. Cependant, la faible solubilité du  $\text{KO}_2$  dans les solvants organiques nécessite de préparer un mélange solvant organique/eau. La sonde luminescente L-012 est préparée dans l'eau avec une concentration stock de 1 mM [644]. Dans les puits d'une plaque 96 puits, 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{KO}_2$ , 20  $\mu\text{l}$  de L-012 et 2  $\mu\text{l}$  de différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou de leur solvant respectif sont ajoutés à 170  $\mu\text{l}$  du mélange méthanol/eau. Pour la solution contrôle, les 10  $\mu\text{l}$  de solvant sont remplacés par 10  $\mu\text{l}$  du mélange méthanol/eau.

Un spectromètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer le signal de chimiluminescence du L-012 à la suite de son interaction avec l'anion superoxyde. Le signal de luminescence est mesuré pendant 30 minutes et les résultats sont exprimés comme la différence entre la dernière et la première mesure. La capacité de piégeage de l'anion superoxyde par les différentes molécules d'intérêt est déterminée en mesurant la décroissance du signal de luminescence et en le comparant au signal de leur contrôle solvant respectif, considéré comme 100%.

#### D.1.4 Etude de l'action de piégeage de ROS - Oxygène singulet

La spectroscopie d'absorption permet d'étudier l'action de piégeage des molécules d'intérêt sur l'oxygène singulet.

Une solution de 100  $\mu\text{M}$  de rose Bengale est préparée avec de l'eau MilliQ. L'ADPA est quant à lui dissous dans de l'éthanol pour obtenir une solution stock de 5 mM. Dans les puits d'une plaque 96 puits, 20  $\mu\text{l}$  de rose Bengale, 20  $\mu\text{l}$  d'ADPA et 20  $\mu\text{l}$  de différentes concentrations des molécules d'intérêt (1 mM et 100  $\mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou de leur solvant respectif sont ajoutés dans 140  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate pH 7,4. Pour la solution contrôle, les 20  $\mu\text{l}$  de solvant sont remplacés par 20  $\mu\text{l}$  de tampon. La plaque est irradiée pendant 30 secondes à l'aide d'un projecteur, dans une pièce plongée dans le noir. Un filtre permet de supprimer les longueurs d'onde inférieures à 450 nm. L'irradiation du rose Bengale produit l'oxygène singulet à partir de l'oxygène triplet naturellement contenu en solution. L'oxydation de l'ADPA par l'oxygène singulet le transforme en endoperoxyde.

L'absorbance de l'ADPA à 405 nm est mesurée avec un spectromètre Multiskan Ascent (Thermo Scientific). L'opération est répétée pendant dix minutes afin de réaliser une cinétique

de l'évolution de l'absorbance de l'ADPA. En l'absence de piègeur, l'oxygène singulet interagit avec l'ADPA pour former l'endoperoxyde caractérisé par un spectre d'absorption différent de l'ADPA. Une décroissance de l'absorbance à 405 nm est donc observée au cours du temps. Par contre, la présence en solution d'une molécule capable de piéger l'oxygène singulet et d'entrer en compétition avec l'ADPA empêche la décroissance de l'absorbance de celui-ci.

Le spectre d'absorption des molécules d'intérêt efficaces a été obtenu dans du tampon phosphate pH 7,4 avec un spectrophotomètre Agilent 8453 (Hewlett-Packard). Du rose Bengale ( $C_{finale} = 10 \mu\text{M}$ ) est ensuite ajouté à la solution qui est alors irradiée pendant dix minutes à l'aide d'un projecteur, dans une pièce plongée dans le noir.

### D.1.5 Etude de l'action de piégeage de ROS - Acide hypochloreux

La capacité de piégeage de l'acide hypochloreux par les molécules d'intérêt a été évaluée grâce à la spectroscopie de fluorescence.

Du NaOCl est dilué dans du tampon PBS (pH 7,4) pour obtenir une concentration de  $140 \mu\text{M}$ . Le pH de la solution est réajusté à 7,4, juste avant son utilisation, en ajoutant du HCl 0,1 M. A ce pH, la solution contient approximativement une quantité équivalente de HOCl et de  $\text{OCl}^-$  [302]. La sonde, APF, est diluée dans du tampon HBSS à une concentration  $5 \mu\text{M}$ . Dans les puits d'une plaque 96 puits,  $2 \mu\text{l}$  de différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et  $1 \mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou de leur solvant respectif sont ajoutés à  $50 \mu\text{l}$  de HOCl et  $148 \mu\text{l}$  d'APF. Pour la solution contrôle, les  $2 \mu\text{l}$  de solvant sont remplacés par  $2 \mu\text{l}$  de tampon HBSS.

Un spectromètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer le signal de fluorescence de l'APF (longueur d'onde d'excitation de 489 nm et longueur d'onde d'émission de 517 nm). Le signal de fluorescence est mesuré pendant 30 minutes et les résultats sont exprimés comme la différence entre la dernière et la première mesure. La capacité de piégeage du HOCl par les différentes molécules d'intérêt est évaluée en calculant la diminution du signal de fluorescence par rapport au signal de leur contrôle solvant respectif, considéré comme 100%.

## D.2 Etude de l'action des molécules d'intérêt sur l'activité oxydante des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs)

### D.2.1 Isolement des PMNs

Pour les différentes expériences utilisant les PMNs, les cellules sont isolées à partir de sang complet de cheval à l'aide d'un gradient de Percoll, avec la méthode décrite par Pycocock et al. [181].

Le sang complet est déposé sur le gradient de Percoll et l'ensemble est centrifugé pendant 30 minutes à 400g. A l'aide d'une trompe à eau, la couche supérieure de plasma (voir figure D.3) est retirée. La couche de PMNs est ensuite isolée avec une pipette et est mélangée à du HBSS. La solution est à nouveau centrifugée pendant 8 minutes dans une petite centrifugeuse de paillasse. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les PMNs est resuspendu dans du tampon d'éclatement (solution aqueuse de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  150 mM, EDTA  $100 \mu\text{M}$  et  $\text{NaHCO}_3$  10 mM), afin de faire éclater les globules rouges résiduels. La solution est une dernière fois

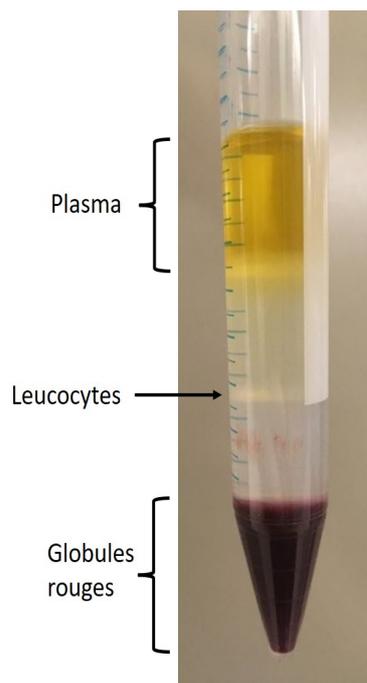


FIGURE D.3 – Photographie d'un tube contenant du sang centrifugé.

centrifugée pendant 8 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les PMNs est remis en suspension dans du tampon PBS. La concentration cellulaire est déterminée par comptage avec une cellule Bruker à l'aide d'un microscope optique.

### D.2.2 Viabilité cellulaire

Le test d'exclusion au bleu trypan permet d'évaluer l'impact des molécules d'intérêt sur la viabilité cellulaire. Les PMNs ( $250 \cdot 10^3$  cellules/ $200\mu\text{l}$ ) sont incubés pendant dix minutes ou une heure avec différentes concentrations des molécules d'intérêt (100 et  $50 \mu\text{M}$ ). L'effet des différents solvants est également analysé. Après l'incubation,  $50\mu\text{l}$  de bleu trypan sont ajoutés à la solution de  $200\mu\text{l}$ . Le nombre total de cellules et le nombre de cellules mortes sont déterminés par comptage avec une cellule Bruker à l'aide d'un microscope optique et le taux de viabilité peut être calculé.

### D.2.3 Inhibition de la production d'anions superoxydes

Dans une première série de mesures, des PMNs ( $250 \cdot 10^3$  cellules/puits) ont été incubés pendant dix minutes dans les puits d'une plaque 96 puits, en présence de différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et  $1 \mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou de leur solvant respectif, dans du tampon PBS pH 7,4 à  $37^\circ\text{C}$ . Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon PBS pH 7,4. Ensuite,  $25 \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{initiale}} = 1,25 \text{ mM}$ ) et  $20 \mu\text{l}$  de L-012 ( $C_{\text{initiale}} = 1 \text{ mM}$ ) sont ajoutés dans chaque puits, avant le déclenchement de l'activation des PMNs (et donc de la production de ROS) par  $10 \mu\text{l}$  de PMA ( $C_{\text{initiale}} = 16,2 \mu\text{M}$ ). Pour le contrôle négatif, les  $10 \mu\text{l}$  de PMA sont remplacés par  $10 \mu\text{l}$  d'eau. La dilution de la suspension cellulaire et des composés d'intérêt est réalisée pour travailler avec un volume final de  $200 \mu\text{l}$  par puits.

Un spectromètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer le signal de chimiluminescence du L-012 en réponse à son interaction avec l'anion superoxyde produit

par les PMNs activés. Le signal de luminescence est mesuré pendant 30 minutes et les résultats sont exprimés comme la différence entre la dernière et la première mesure. L'impact des différentes molécules d'intérêt sur la concentration d'anions superoxydes en solution est évalué en mesurant la décroissance du signal de luminescence et en le comparant au signal de leur contrôle solvant respectif, considéré comme 100%.

Pour la seconde expérience, les PMNs ( $250 \cdot 10^3$  cellules/200  $\mu\text{l}$ ) sont incubés pendant dix minutes ou une heure dans des tubes à essai, en présence de différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou leur solvant respectif, dans du tampon PBS pH 7,4 à 37°C. Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon PBS pH 7,4. Après la phase d'incubation, les suspensions cellulaires sont centrifugées pendant dix minutes à 524g. Les surnageants sont éliminés et les culots cellulaires sont remis en suspension dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon PBS pH 7,4. Les 200  $\mu\text{l}$  de solution sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. Comme lors de la première expérience, 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{initiale}} = 1,25 \text{ mM}$ ) et 20  $\mu\text{l}$  de L-012 ( $C_{\text{initiale}} = 1 \text{ mM}$ ) sont ajoutés dans chaque puits, avant le déclenchement de l'activation des PMNs et donc de la production de ROS par 10  $\mu\text{l}$  de PMA ( $C_{\text{initiale}} = 16,2 \mu\text{M}$ ). Pour le contrôle négatif, les 10  $\mu\text{l}$  de PMA sont remplacés par 10  $\mu\text{l}$  d'eau. Ensuite, la prise de mesures à l'aide du Fluoroskan et le traitement des données sont identiques à ceux de la première expérience (voir paragraphe ci-dessus).

#### D.2.4 Inhibition de la dégranulation

La première phase de cette expérience consiste à activer les PMNs et à déclencher le processus de dégranulation. Pour cela, des PMNs ( $1 \cdot 10^6$  cellules/ml) sont incubés pendant dix minutes avec différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou leur solvant respectif, dans du tampon PBS pH 7,4 à 37°C. Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon PBS pH 7,4. Ensuite, les PMNs sont activés en ajoutant 5  $\mu\text{l}$  de cytochalasine ( $C_{\text{initiale}} = 2 \text{ mM}$ ), avec une incubation de dix minutes à 37°C. Pour terminer, 10  $\mu\text{l}$  de fMLP ( $C_{\text{initiale}} = 100 \mu\text{M}$ ) sont ajoutés. Les suspensions cellulaires sont alors incubées pendant 30 minutes à 37°C. Après l'activation, les PMNs sont centrifugés pendant dix minutes à 524g et les surnageants sont collectés. La dilution de la suspension cellulaire et des composés d'intérêt est réalisée pour travailler avec un volume final de 1 ml.

La quantité de MPO libérée par les PMNs activés est mesurée dans les surnageants collectés grâce à un test ELISA. Ceux-ci sont dilués 200 fois dans du tampon PBS pH 7,4. 100  $\mu\text{l}$  de ces solutions sont ajoutés dans les puits d'une plaque 96 puits (Combiplate 8EB), "coatés" avec des anticorps de cobaye anti-MPO équine. La plaque est incubée durant une nuit à 4°C et les puits sont ensuite vidés et lavés avec une solution de PBS contenant 0,1% de Tween 20 (monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane).

100  $\mu\text{l}$  d'une solution tampon PBS contenant 1 % d'albumine (BSA) et un second anticorps de lapin anti-MPO équine (5  $\mu\text{g/ml}$ ) sont ajoutés dans les puits et incubés pendant 2 heures à 37°C. Après une seconde étape de lavage avec une solution de PBS contenant 0,1% de Tween 20, 100  $\mu\text{l}$  de solution contenant un troisième anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin, couplé à de la phosphatase alcaline sont ajoutés dans les puits et incubés pendant 2 heures à 37°C. Après une troisième et dernière étape de lavage avec une solution de PBS contenant 0,1% de Tween 20, 100  $\mu\text{l}$  de pNPP sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C. La phosphatase alcaline catalyse la conversion du pNPP

en pNP. Cette réaction est arrêtée par l'addition de 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 1,25 M.

Un spectromètre Multiskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer l'absorbance à 405 nm du pNP formé. La capacité inhibitrice de la libération de la MPO par les différentes molécules d'intérêt est évaluée en la comparant au signal de leur contrôle solvant respectif, considéré comme 100%.

### D.2.5 Interaction avec la myéloperoxydase libérée par les PMNs activés

Dans un premier temps, les PMNs doivent être activés afin d'induire la dégranulation. Le protocole de récupération du contenu de dégranulation est décrit dans le premier paragraphe de la section D.2.4.

L'activité de la MPO présente dans le surnageant peut alors être évaluée grâce au SIE-FED. 100  $\mu\text{l}$  de surnageant sont ajoutés dans les puits d'une plaque 96 puits. (Combiplate 8EB), "coatés" avec des anticorps de cobaye anti-MPO équine. La plaque est ensuite incubée pendant deux heures à 37°C, afin de permettre la fixation de la MPO sur les anticorps. L'incubation est suivie d'une étape de lavage. Les solutions sont éliminées des puits et ceux-ci sont lavés à quatre reprises avec une solution de PBS contenant 0,1 % de Tween 20. Le cycle de peroxydase de la MPO est alors déclenché en ajoutant, dans chaque puits, 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaNO}_3$  ( $C_{\text{initiale}} = 40 \text{ mM}$ ) et 100  $\mu\text{l}$  d'une solution composée de tampon phosphate pH 7,5, de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de 40  $\mu\text{M}$  d'une sonde fluorescente, l'Amplex Red. Le nitrite ( $\text{NaNO}_3$ ) agit principalement comme substrat pour le composé I [583] tandis que l'Amplex Red est oxydé par le composé II. L'utilisation du nitrite permet d'accélérer le cycle de peroxydase et, par conséquent, d'améliorer la sensibilité de la méthode en augmentant le signal de fluorescence [645].

Un spectromètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer le signal de fluorescence de l'Amplex Red (longueur d'onde d'excitation de 544 nm et longueur d'onde d'émission de 590 nm). Le signal de fluorescence est mesuré pendant 30 minutes et les résultats sont exprimés comme la différence entre la dernière et la première mesure. La capacité d'inhibition de l'activité de peroxydase de la MPO par les différentes molécules d'intérêt est évaluée en mesurant la décroissance du signal de fluorescence et en le comparant au signal de leur contrôle solvant respectif, considéré comme 100%.

## D.3 Etude de l'action des molécules d'intérêt sur l'activité oxydante de la myéloperoxydase

### D.3.1 Modélisation moléculaire - Docking

La modélisation moléculaire des complexes MPO-inhibiteurs est réalisée avec le programme GOLD [188]. La fonction de scoring utilisée est Goldscore. L'énergie de la structure de l'enzyme (PDB ID : 4C1M [38]) est minimisée avec le programme Yasara [646], après la suppression de l'inhibiteur co-cristallisé HX1. L'état d'oxydation des deux noyaux de fer est modifié pour obtenir l'état  $\text{Fe}^{+3}$ . Une zone cubique de 15 Å d'arête est définie dans la cavité du site actif pour limiter le positionnement de l'inhibiteur. Les paramètres de *docking* sélectionnés permettent de reproduire une structure comparable à celle cristallographique du complexe MPO-HX1 [38]. La visualisation des solutions obtenues est réalisée avec le programme Pymol [647] et la détermination des liaisons entre le ligand et la MPO avec LigPlot et Discovery Studio [648].

Pour chaque molécule d'intérêt, la modélisation est réalisée cinq fois. Les solutions de complexes les plus fréquemment obtenues, et donc les plus probables, sont sélectionnées.

### D.3.2 Interaction avec le cycle de peroxydase

Des solutions contenant 50 ng/ml de MPO humaine et différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu\text{M}$  (concentrations finales)) ou les solvants associés, dans du tampon PBS pH 7,4 sont incubées à 37°C pendant dix minutes. Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon PBS pH 7,4. 100  $\mu\text{l}$  de ces solutions sont placées dans les puits d'une plaque 96 puits. Le cycle de peroxydase de la MPO est alors déclenché en ajoutant dans chaque puits 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaNO}_3$  ( $C_{\text{initiale}} = 40 \text{ mM}$ ) et 100  $\mu\text{l}$  d'une solution composée de tampon phosphate pH 7,5, de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de 40  $\mu\text{M}$  d'une sonde fluorescente, l'Amplex Red. Le nitrite ( $\text{NaNO}_3$ ) agit principalement comme substrat pour le composé I [583] tandis que l'Amplex Red est oxydé par le composé II. L'utilisation du nitrite permet d'accélérer le cycle de peroxydase et par conséquent, d'améliorer la sensibilité de la méthode en augmentant le signal de fluorescence [645]. La mesure du signal de fluorescence de l'Amplex Red ainsi que l'évaluation de la capacité d'inhibition de l'activité de peroxydase de la MPO par les différentes molécules sont identiques à celles décrites à la fin de la section D.2.5.

### D.3.3 Détermination des constantes de vitesse des réactions de réduction des composés I et II de la MPO

La spectroscopie d'absorption UV-visible associée à un système *stopped-flow* permet de réaliser une étude cinétique de l'interaction des molécules d'intérêt avec les composés I et II du cycle de peroxydase de la MPO. Plus précisément, les constantes de vitesse de la réduction des composés I et II par les molécules d'intérêt peuvent être déterminées. Le système *stopped-flow* est composé d'un ensemble de seringues permettant l'injection rapide des différents réactifs dans la cellule de mesure afin de déclencher la mesure de l'absorbance de la solution finale dans des temps très courts et permettre ainsi l'étude de processus chimiques rapides.

La solution de MPO est préparée dans du tampon phosphate pH 7. La concentration de la solution est déterminée en mesurant l'absorbance à 428 nm ( $\epsilon_{428} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) avec un spectromètre Jasco V-630. Grâce à un système *stopped-flow* SFM-400 (Bio-Logic) composé de trois réservoirs, la MPO ( $C_{\text{finale}} = 4,6 \mu\text{M}$ ) est mélangée à un excès de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $C_{\text{finale}} = 46 \mu\text{M}$ ) et incubée pendant 20 ms afin de permettre la formation complète du composé I. Différentes concentrations de la molécule d'intérêt contenues dans la troisième seringue sont ensuite ajoutées à la solution pour pouvoir réduire le composé I en composé II puis ensuite pour réduire le composé II et régénérer l'enzyme native. Après la libération du contenu de la troisième seringue, la solution est injectée dans la cuvette (chemin optique 10 mm (TC-100-10F)) d'un spectromètre MOS-450/AF-CD. La mesure au cours du temps de l'absorbance de la solution à 456 nm est alors réalisée durant 4 secondes. Le temps mort du dispositif est d'environ 3 ms.

Chaque mesure est réalisée à trois reprises pour chaque concentration en molécules d'intérêt testée. L'augmentation exponentielle initiale de l'absorbance à 456 nm (réduction du composé I en composé II) et la décroissance exponentielle suivante de l'absorbance à 456 nm (réduction du composé II en enzyme native) sont ajustées avec Matlab afin d'obtenir la constante de pseudo-premier ordre de l'interaction de la molécule d'intérêt avec les composés I et II, respectivement. Ensuite, la constante de vitesse de second ordre de la réduction des

composés I et II par la molécule d'intérêt est déduite de la pente du graphique des constantes de pseudo-premier ordre en fonction de la concentration en molécules d'intérêt.

### D.3.4 Interaction avec le cycle de chloration

Pour les mesures à pH acide, des solutions contenant 50 ng/ml de MPO humaine et différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu$ M (concentrations finales)) ou les solvants associés, dans du tampon acétate de sodium (NaAC) (NaCl (13.6 mM) et 20% acide acétique) 25 mM pH 5,5 sont incubées à 37°C pendant dix minutes. Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon NaAC. 100  $\mu$ l de ces solutions sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. Le cycle de chloration de la MPO est alors déclenché en ajoutant dans chaque puits 100  $\mu$ l d'une solution composée de tampon NaAC pH 5,5, de 5  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de 20  $\mu$ M d'une sonde fluorescente, l'APF [259, 260].

Pour les mesures à pH 7,4, le protocole est identique à celui décrit juste avant. La seule différence est que le tampon NaAC pH 5,5 est remplacé par du tampon phosphate pH 7,4 contenant du NaCl (13,6 mM).

Un spectromètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific) est utilisé pour mesurer le signal de fluorescence de l'APF (longueur d'onde d'excitation 489 nm et longueur d'onde d'émission 517 nm). Le signal de fluorescence est mesuré pendant 30 minutes et les résultats sont exprimés comme la différence entre la dernière et la première mesure. La capacité d'inhibition de l'activité de chloration de la MPO par les différentes molécules d'intérêt est évaluée en mesurant la décroissance du signal de fluorescence et en le comparant au signal de leur contrôle solvant respectif, considéré comme 100%.

### D.3.5 SIEFED

Le protocole complet du SIEFED ainsi que la prise de mesure de fluorescence sont décrits à la section D.2.5. Dans le cas de cette expérience, l'évaluation de l'action des molécules d'intérêt sur l'activité peroxydasique de la MPO est réalisée sur l'enzyme humaine purifiée et non issue de la dégranulation des PMNs. Par conséquent, ici, ce sont des solutions contenant 50 ng/ml de MPO et différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu$ M (concentrations finales)) ou les solvants associés, dans du tampon PBS pH 7,4 qui sont incubées à 37°C pendant dix minutes. Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon PBS pH 7,4. La suite du protocole est identique à celui décrit précédemment. Il faut cependant remplacer les anticorps "coatant" les puits de la plaque 96 puits par des anticorps de cobaye anti-MPO humaine.

### D.3.6 SIEFED modifié

Le SIEFED modifié est semblable au SIEFED classique repris à la section précédente D.3.5, à l'exception d'une étape supplémentaire qui s'intercale avant le lavage de la plaque. En effet, après la phase d'incubation de deux heures à 37°C permettant la fixation de la MPO sur les anticorps, 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M dans du tampon phosphate pH 7,5) sont ajoutés dans chaque puits, afin de déclencher le cycle de peroxydase de la MPO. La plaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C. L'incubation est suivie de l'étape de lavage. Celle-ci ainsi que le reste du protocole, correspond à celui décrit précédemment.

### D.3.7 ELISA

100  $\mu$ l de solutions contenant 50 ng/ml de MPO et différentes concentrations des molécules d'intérêt (100, 50, 10 et 1  $\mu$ M (concentrations finales)) ou les solvants associés, dans du tampon PBS pH 7,4 sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits (Combiplate 8EB), "coatés" avec des anticorps de cobaye anti-MPO humaine. Pour la solution contrôle, le solvant a été remplacé par un volume équivalent de tampon PBS pH 7,4. La plaque est incubée durant une nuit à 4°C et les puits sont ensuite vidés et lavés avec une solution de PBS contenant 0,1% de Tween 20.

La suite du protocole est reprise dans les deux derniers paragraphes de la section D.2.4.

## D.4 Analyse statistique des données expérimentales

La majorité des données expérimentales relatives aux différentes molécules d'intérêt sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type de N expériences indépendantes réalisées en n-tuple. Les données sont présentées en valeurs relatives par rapport au contrôle solvant associé, considéré comme 100%.

L'analyse statistique des données expérimentales a été réalisée avec le programme Graph-Pad 9.0 pour les expériences caractérisées par N = 3 minimum. La méthode d'analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA), associée à un test de Dunnett (test de comparaisons multiples), a permis de comparer les résultats, obtenus pour les différentes molécules d'intérêt par rapport à leur contrôle solvant respectif. Cette méthode donne la valeur P correspondant à la probabilité que les données traitées aient été obtenues sous l'hypothèse nulle. Celle-ci signifie dans ce cas qu'il n'y a pas de différence entre les résultats obtenus pour les molécules d'intérêt et ceux obtenus pour leur contrôle solvant respectif. Donc, plus la valeur de P est petite, plus la probabilité que l'hypothèse nulle soit correcte est faible. Dans cette étude seront considérés significatifs les résultats caractérisés par une valeur P inférieure à 5 % ( $P < 0,05$ ).

# Annexe E

## Théorie des techniques expérimentales

### E.1 Voltammétrie

La voltammétrie cyclique est une technique d'analyse électrochimique. Elle permet, à l'aide d'un dispositif formé d'électrodes et d'un potentiostat, d'étudier les mécanismes d'oxydation et de réduction d'espèces chimiques et de déterminer ou estimer différentes grandeurs caractéristiques comme leur potentiel d'oxydoréduction. Les informations obtenues permettent de comprendre les mécanismes réactionnels de ces espèces. Les notions théoriques reprises ci-dessous sont une synthèse de celles décrites dans les chapitres 1, 3 et 7 du livre de référence de F. Miomandre et al. "Electrochimie - Des concepts aux applications" [649].

#### E.1.1 Le potentiel d'oxydoréduction

##### E.1.1.1 Notions d'oxydant et de réducteur

Un oxydant O est une espèce acceptrice d'électrons, tandis qu'un réducteur R est une espèce donneuse d'électrons. L'équation de l'échange d'électrons entre un oxydant et un réducteur peut s'écrire :



où  $\nu_O$  et  $\nu_R$  sont les coefficients stoechiométriques de l'espèce oxydante et de l'espèce réductrice, respectivement, et  $n$  représente le nombre d'électrons échangés. [649]

##### E.1.1.2 Le potentiel d'électrode

Considérons une électrode, c'est-à-dire un matériau conducteur d'électrons (métal, semi-conducteur) en contact avec une solution conductrice, appelée électrolyte. L'électrolyte est formé d'un solvant dans lequel est diluée une espèce chimique électroactive (i.e. capable de céder un électron (espèce réductrice) ou de capturer un électron (espèce oxydante)), par exemple un couple O/R. [649]

Dans le métal composant l'électrode, les électrons "transférables", c'est-à-dire pouvant être arrachés au métal, possèdent la même énergie, l'énergie de Fermi ( $E_F$ ). On sait également qu'en se basant sur le théorème de Gauss, le champ électrique au sein d'un métal est nul et par conséquent, le potentiel électrostatique à l'intérieur du métal  $\Phi_M$  est uniforme. L'énergie de Fermi d'un électron est égale au travail nécessaire pour amener un électron de l'infini (là où le potentiel est nul) jusqu'à un point où le potentiel vaut  $\Phi_M$  [649] :

$$E_F = -e\Phi_M + E_{F,0}, \quad (\text{E.2})$$

où  $E_{F,0}$  est l'énergie de Fermi à potentiel nul.

De la même manière, on peut définir une énergie de Fermi  $E_F^{redox}$  pour un électron associé à une espèce chimique électroactive en solution. Cette énergie est égale au travail nécessaire pour amener cet électron de l'infini (là où le potentiel est nul) jusqu'à un point où le potentiel vaut  $\Phi_s$ . Ce point correspond à l'endroit de la solution où se déroule l'échange d'électron entre l'espèce électroactive et le métal (réduction de l'espèce oxydante O ou oxydation de l'espèce R en fonction de l'espèce en présence) [649] :

$$E_F^{redox} = -e\Phi_s + E_{F,0}^{redox}. \quad (\text{E.3})$$

On peut alors définir la différence de potentiel de Galvani [649] :

$$\Phi_M - \Phi_s = \left( \frac{E_F - E_F^{redox}}{-e} \right) - \left( \frac{E_{F,0} - E_{F,0}^{redox}}{-e} \right). \quad (\text{E.4})$$

Pour définir le potentiel d'électrode absolu E, il faut tenir compte de la différence de potentiel entre le métal  $M_1$  de l'électrode et le métal  $M_2$  du câble la reliant à l'instrument de mesure (e.g. un voltmètre) [649]. On a donc :

$$E = \Phi_{M2} - \Phi_s = (\Phi_{M2} - \Phi_{M1}) + (\Phi_{M1} - \Phi_s), \quad (\text{E.5})$$

$$E = \text{constante} + (\Phi_{M1} - \Phi_s), \quad (\text{E.6})$$

le terme  $(\Phi_{M2} - \Phi_{M1})$  étant généralement une constante.

Il existe une valeur du potentiel d'électrode, appelée potentiel d'électrode à l'équilibre électrochimique, pour laquelle l'équilibre électrochimique de l'interface métal|électrolyte est atteint. Cela correspond à la situation où les énergies de Fermi des électrons de part et d'autre de l'interface sont égales. [649] On a donc :

$$E_{eq} = \text{constante} + (\Phi_{M1} - \Phi_s)_{eq} \quad (\text{E.7})$$

$$E_{eq} = \text{constante} - \left( \frac{E_{F,0} - E_{F,0}^{redox}}{-e} \right) \quad (\text{E.8})$$

### E.1.1.3 La loi de Nernst

La loi de Nernst exprime le potentiel d'oxydoréduction  $E_{O/R}$  du couple O/R, c'est-à-dire son potentiel d'électrode à l'équilibre électrochimique :

$$E_{eq,O/R} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_O^{\nu_O}}{a_R^{\nu_R}}, \quad (\text{E.9})$$

où  $R$  est la constante des gaz parfaits,  $n$  est le nombre d'électrons intervenant dans la réaction d'oxydoréduction du couple O/R,  $F$  est la constante de Faraday, les exposants  $\nu$  sont les coefficients stoechiométriques des espèces O et R, et le facteur  $a_k$  est l'activité de l'espèce chimique  $k$ . Dans le cas d'une solution, l'activité correspond à la concentration de l'espèce dans l'électrolyte, normalisée par la concentration standard  $C^\circ = 1 \text{ mol/l}$ . Le terme  $E^\circ$  est le potentiel standard du couple O/R :

$$E_{eq,O/R} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^{\nu_O}}{C_R^{\nu_R}}. \quad (\text{E.10})$$

Lorsque les concentrations en O et R en solution sont identiques, on a  $E_{eq,O/R} = E^\circ$ , le potentiel standard. Par contre, lorsque les concentrations sont différentes, le potentiel d'oxydoréduction réel du couple O/R,  $E_{eq,O/R}$  dépend des conditions de température, de pression et de pH.

#### E.1.1.4 La réaction d'oxydoréduction

Soit deux couples oxydant/réducteur,  $O_1/R_1$  et  $O_2/R_2$ , de potentiels d'oxydoréduction connus,  $E_{eq1}$  et  $E_{eq2}$ . La comparaison des valeurs de potentiel permet de déterminer le sens de la réaction d'oxydoréduction entre les deux couples.

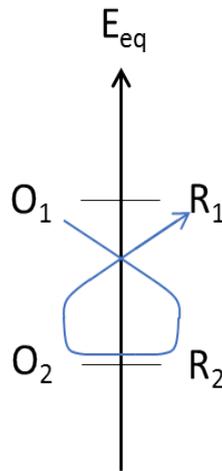


FIGURE E.1 – La règle du gamma

La règle du "gamma" consiste à placer les valeurs sur une échelle ascendante de potentiels croissants (figure E.1). L'oxydant du couple caractérisé par le potentiel le plus élevé peut réagir avec le réducteur du couple caractérisé par le potentiel le plus faible et lui arracher un ou plusieurs électrons en fonction des espèces :



#### E.1.1.5 La cellule électrochimique

Le potentiel d'électrode absolu  $E$  ne peut pas être mesuré. Cependant, avec une cellule électrochimique (figure E.2), une valeur de potentiel d'électrode relative peut être déterminée par rapport à une électrode de référence. Une cellule électrochimique est un montage composé de deux interfaces métal|électrolyte, appelées demi-cellule, dont une est la référence. Les deux solutions électrolytes doivent être reliées par une jonction électrolytique, qui permet l'échange d'ions entre les deux demi-cellules. [649]

La différence de potentiel  $V$  aux bornes de la cellule électrochimique peut être mesurée. Elle peut s'exprimer comme [649] :

$$V = \Phi_{Mb,2} - \Phi_{Mb,1} = (\Phi_{Mb,2} - \Phi_{s2}) - (\Phi_{Mb,1} - \Phi_{s1}) + (\Phi_{s2} - \Phi_{s1}) \quad (\text{E.12})$$

$$V = E_2 - E_1 + (\Phi_{s2} - \Phi_{s1}) \quad (\text{E.13})$$

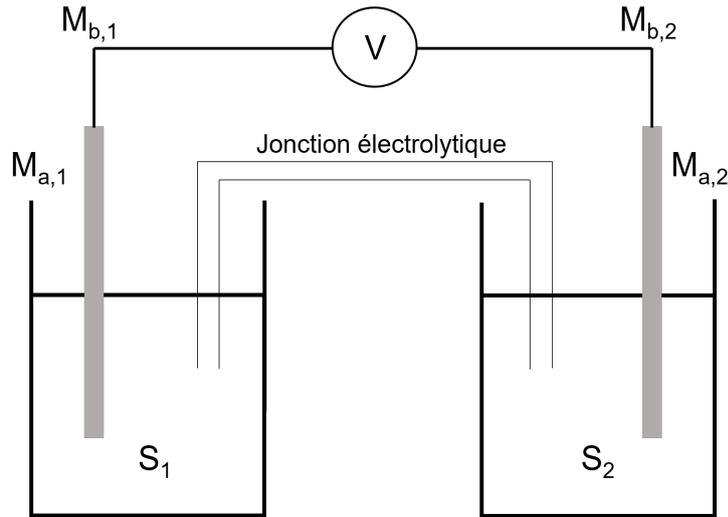


FIGURE E.2 – Cellule électrochimique composée de deux demi-cellules 1 et 2. Un voltmètre peut mesurer la différence de potentiel  $V$  entre les deux demi-cellules.  $M_a$  correspond au métal composant les électrodes (celui-ci peut être différent) et  $M_b$  le métal reliant l'électrode à l'appareil de mesure. Image originale du livre de Miomandre et al. [649]

Les termes  $E_i$  sont les potentiels d'électrode des deux demi-cellules et le terme  $(\Phi_{s2} - \Phi_{s1})$ , appelé potentiel de jonction, est négligeable par rapport aux potentiels d'électrode. [649] On obtient donc :

$$V \cong E_2 - E_1. \quad (\text{E.14})$$

Si une des demi-cellules est définie comme référence et que son potentiel d'électrode est connu, le potentiel d'électrode inconnu de la seconde demi-cellule d'intérêt peut être déterminé grâce à la mesure du potentiel  $V$ . L'électrode standard à hydrogène (ESH) forme la demi-cellule de référence. Cette électrode est formée d'une électrode de platine dans une solution contenant le couple  $\text{H}_3\text{O}^+_{(aq)}/\text{H}_2(g)$ , sous une pression de 1 bar ( $[\text{H}_3\text{O}^+] = 1\text{M}$ ). Par convention, le potentiel d'électrode de l'électrode ESH est fixé à 0V. Par conséquent, le potentiel  $V$  donne directement le potentiel d'électrode de la demi-cellule d'intérêt. [649]

La demi-cellule d'intérêt est formée de l'interface métal/électrolyte et l'électrolyte est une solution contenant le couple oxydant/ réducteur, O/R. [649] On a donc :

$$V \cong E_{O/R} - E_{ESH}, \quad (\text{E.15})$$

$$V \cong E_{O/R} - 0, \quad (\text{E.16})$$

$$V \cong E_{O/R}. \quad (\text{E.17})$$

### E.1.1.6 La cellule électrolytique

Si une cellule électrochimique est connectée à un circuit de résistance  $R$  (cellule galvanique), la différence de potentiel  $V$  entre les deux demi-cellules induit un mouvement d'électrons (figure E.3 A). L'oxydant, contenu dans l'électrolyte de la demi-cellule caractérisée par le potentiel d'électrode à l'équilibre électrochimique  $E_{eq}$  le plus élevé, va être réduit par un électron cédé par le réducteur contenu dans l'électrolyte de la demi-cellule, caractérisée par le

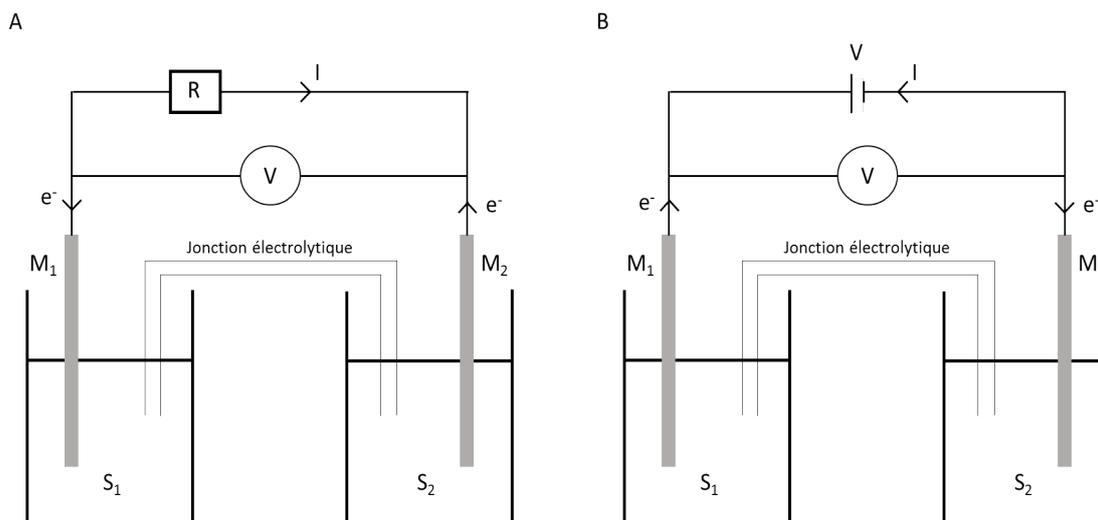


FIGURE E.3 – A. Cellule galvanique B. Cellule électrolytique. Les potentiels d'électrode des deux demi-cellules,  $E_1$  et  $E_2$ , sont tels que  $E_{eq1} > E_{eq2}$ . Image originale du livre de Miomandre et al. [649]

potentiel d'électrode  $E_{eq}$  le plus faible. L'électron est capté et libéré par les deux électrodes métalliques composant les deux demi-cellules. [649]

Dans le cas où la cellule électrochimique est connectée à un générateur de tension, elle devient une cellule électrolytique (figure E.3 B). La tension  $V$  appliquée à la cellule permet d'imposer le sens de circulation des électrons dans le système. Si la tension  $V$  est inférieure à la différence de potentiel d'électrode à l'équilibre électrochimique  $\Delta E_{eq}$  entre les deux demi-cellules, alors la cellule se comporte comme une cellule galvanique. Par conséquent, l'oxydant le plus puissant est réduit et le réducteur le plus puissant est oxydé. Par contre, si la tension  $V$  est supérieure à  $\Delta E_{eq}$ , l'énergie fournie au système est suffisamment importante pour permettre la réduction de l'oxydant le plus faible et l'oxydation du réducteur le plus faible. Le mouvement des électrons et le sens du courant dans le circuit sont inversés, par rapport à la cellule galvanique. [649]

## E.1.2 La voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique est une technique d'analyse qui permet, à l'aide d'une cellule électrolytique, d'étudier la réaction d'oxydoréduction d'un couple O/R d'intérêt et de déterminer son potentiel d'oxydoréduction.

### E.1.2.1 Montage à trois électrodes

En pratique, le montage expérimental est composé d'un système de trois électrodes et d'un potentiostat (figure E.4). La demi-cellule d'intérêt est composée de l'électrolyte, c'est-à-dire de la solution contenant une des deux espèces d'un couple O/R à étudier, dans lequel est plongée une électrode, appelée électrode de travail. C'est avec cette électrode que se déroule l'échange d'électrons lors de la réaction d'oxydoréduction du couple O/R. L'électrode de travail peut être formée de différents matériaux conducteurs : métaux nobles (platine (Pt), or (Au)), différentes formes du carbone (graphite, carbone vitreux).

La seconde demi-cellule, l'électrode de référence, est également plongée dans l'électrolyte. En pratique, l'utilisation de l'électrode standard à hydrogène n'est pas réalisable. C'est pour-

quoi d'autres électrodes de référence ont été créées comme l'électrode au chlorure d'argent (AgCl), l'électrode au calomel saturée (SCE),... La valeur de leur potentiel d'électrode est connu par rapport à celui de l'électrode standard à hydrogène. L'électrode de référence est construite de manière à pouvoir créer une jonction électrolytique avec la solution électrolyte, via par exemple la présence d'un verre fritté à son extrémité.

Le potentiostat sert de générateur de tension et permet d'appliquer une différence de potentiel  $V$  entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Il peut également mesurer le courant circulant dans la cellule électrolytique, entre l'électrode de référence et l'électrode de travail. Or, le courant circulant dans l'électrode de référence peut, lorsqu'il est de l'ordre du mA ou supérieur, provoquer la polarisation de l'électrode et sa dégradation. Pour éviter ce problème, une troisième électrode, la contre-électrode, est utilisée. Celle-ci est composée d'un métal comme le platine. Le courant passant par l'électrode de travail passe alors par la contre-électrode et non l'électrode de référence. Par conséquent, le couple O/R de l'électrode de référence n'intervient plus dans l'échange d'électrons. C'est la contre-électrode plongée dans l'électrolyte d'intérêt qui permettra la circulation des électrons. En effet, si une réaction d'oxydation a lieu au niveau de l'électrode de travail, alors une réduction aura lieu au niveau de la contre-électrode et inversement. [649]

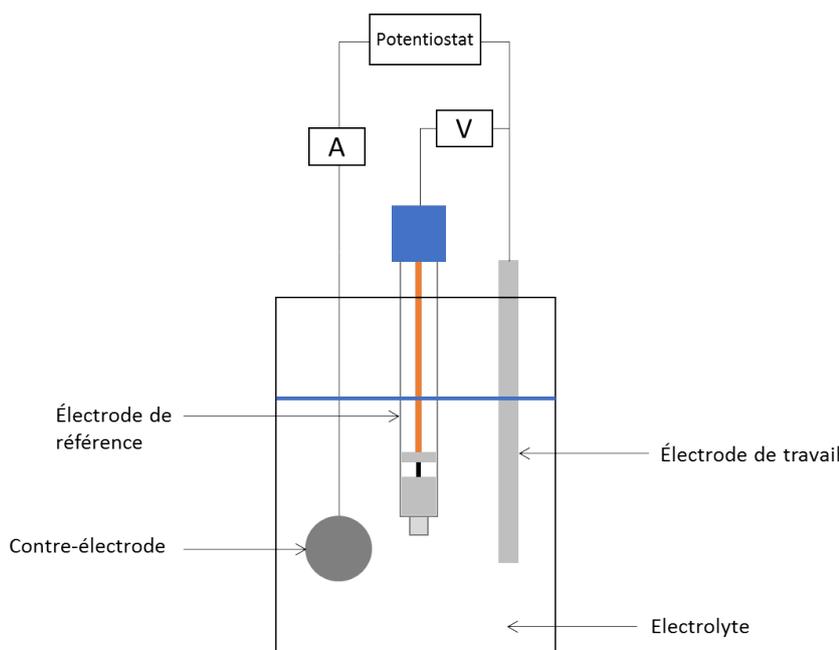


FIGURE E.4 – Montage d'une cellule électrolytique à trois électrodes utilisée en voltammétrie cyclique. Image inspirée du livre de Miomandre et al. [649]

### E.1.2.2 Le voltammogramme

Lors d'une expérience de voltammétrie cyclique, la différence de potentiel  $V$  appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence varie au cours du temps. Elle augmente d'abord de façon linéaire, à vitesse constante, entre deux valeurs minimum et maximum fixées et diminue ensuite, toujours linéairement à vitesse constante, pour revenir à sa valeur minimale initiale. Le courant  $I$  circulant entre l'électrode de travail et la contre-électrode est alors mesuré en fonction de la valeur de  $V$ . Le graphique de  $I(V)$  est appelé voltammogramme (figure E.5). [649]

Pour simplifier le raisonnement, considérons une cellule dont l'électrode de référence est une électrode standard à hydrogène dont le potentiel d'électrode  $E_{ESH}$  est nul. L'électrolyte d'intérêt, dans lequel sont plongées les trois électrodes, contient une des deux espèces du couple O/R. Considérons le cas où l'électrolyte d'intérêt contient l'espèce R d'un couple O/R dont le potentiel d'oxydoréduction  $E_{eq,O/R}$  est positif et donc supérieur à  $E_{ESH}$ . Par conséquent, l'espèce R est un réducteur plus faible que l'espèce réductrice de l'électrode ESH, à savoir  $H_{2(g)}$ . [649]

Lors du balayage de  $V = E_{O/R} - E_{ESH} = E_{O/R}$ , celui-ci augmente et devient supérieur à  $\Delta E_{eq} = E_{eq,O/R} - E_{ESH} = E_{eq,O/R}$ . Par conséquent, l'oxydation de R en O est forcée au niveau de l'électrode de travail (voir section E.1.1.6). Les électrons arrachés aux molécules R par l'électrode de travail circulent dans le circuit et l'intensité du courant augmente. Au fur et à mesure de l'oxydation, la quantité de molécules R suffisamment proches du métal de l'électrode pour être oxydées diminue. Le courant augmente donc de moins en moins vite jusqu'à atteindre un maximum et ensuite décroître. Un pic d'oxydation, caractérisé par le potentiel  $E_{p,o}$ , peut alors être observé sur le voltammogramme. [649]

Ensuite, lorsque  $V$  atteint la valeur maximale fixée, celui-ci diminue. Lorsque  $V < \Delta E_{eq} = E_{eq,O/R}$ , la réduction des molécules O, maintenant présentes près de l'électrode de travail, est possible (voir section E.1.1.6). Un courant commence à circuler dans le circuit en sens inverse et un pic de réduction, caractérisé par le potentiel  $E_{p,r}$ , peut être observé sur le voltammogramme. [649]

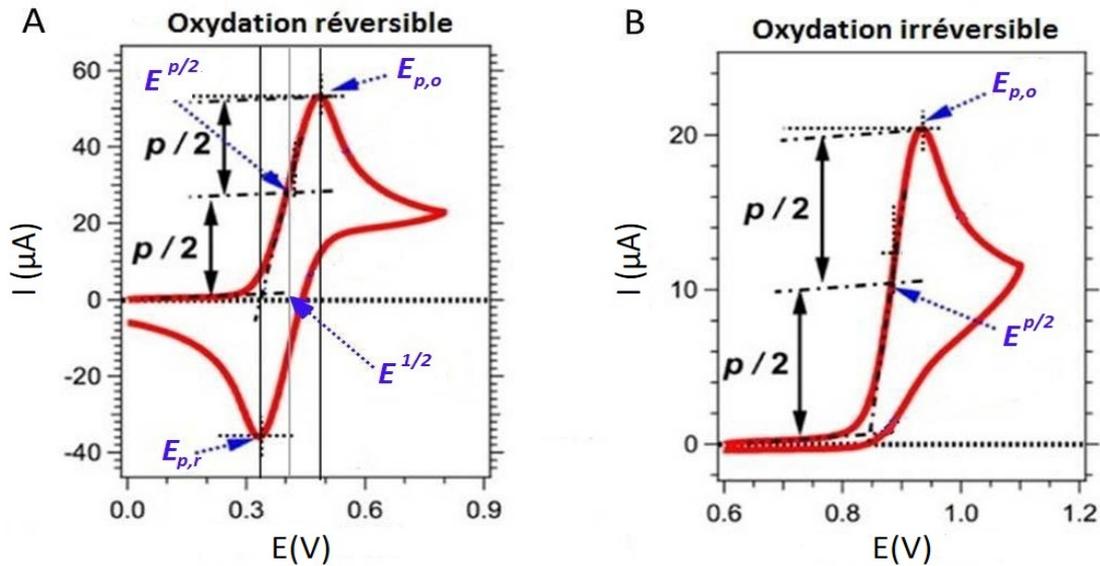


FIGURE E.5 – A. Voltammogramme d'un système réversible B. Voltammogramme d'un système irréversible. Image originale de [169]

Dans le cas d'un système réversible, c'est-à-dire lorsque le processus d'oxydoréduction du couple O/R d'intérêt est réversible, le potentiel de demi-vague  $E^{1/2}$  est défini comme :

$$E^{1/2} = E_{p,r} + \frac{(E_{p,o} - E_{p,r})}{2} \quad (E.18)$$

Dans le cas où l'électrode de référence est l'électrode standard à hydrogène, le potentiel d'oxydoréduction  $E_{eq,O/R} \cong E^{1/2}$ . Le potentiel d'oxydoréduction obtenu, n'est pas le potentiel standard. Il dépend des conditions expérimentales, comme le pH de la solution, la température,

la pression. En pratique, lorsqu'une autre électrode de référence est utilisée, il suffit d'ajouter la valeur de potentiel de l'électrode à la valeur de  $E^{1/2}$  obtenue :  $E_{eq,O/R} \cong E^{1/2} + E_{eq,ref}$ .

Si le système est irréversible, par exemple si lorsqu'après l'oxydation de R en O, ce dernier peut subir une réaction chimique empêchant sa réduction en R, Espinoza et al. [169] ont montré que le potentiel de demi-pic  $E^{p/2}$  est une bonne approximation de  $E_{eq,O/R}$ .

## E.2 Spectroscopie d'absorption UV-visible

La spectroscopie d'absorption UV-visible est une technique d'analyse de composés chimiques organiques ou inorganiques, permettant l'étude des transitions électroniques associées à l'absorption de rayonnements de longueurs d'onde comprises entre 100 et 1000 nm. Cette technique est assez polyvalente car les échantillons analysés par spectroscopie d'absorption peuvent se trouver sous forme gazeuse, liquide ou solide.

### E.2.1 Phénomène d'absorption

Lorsqu'un rayonnement électromagnétique, allant de l'infrarouge proche à l'ultraviolet lointain, atteint une molécule, celle-ci peut absorber ce rayonnement si l'énergie  $h\nu$  du photon est égale à la différence d'énergie  $\Delta E$  entre deux niveaux d'énergie électroniques de la molécule, pourvu que celui de plus faible énergie soit initialement peuplé. A la suite de cette absorption d'énergie, la molécule passe de son état fondamental à l'un de ses états excités, en raison de la transition d'un électron vers un niveau de plus haute énergie. La configuration électronique de la molécule est donc modifiée. Toutes les transitions entre les différents niveaux d'énergie électronique ne sont pas permises. Seules les transitions provoquant une variation du moment dipolaire électrique de la molécule sont possibles.

La molécule se trouvant dans un état excité retourne à son état fondamental en libérant son excès d'énergie. Cette perte d'énergie peut s'effectuer majoritairement sous forme de chaleur via des phénomènes non radiatifs (relaxation vibrationnelle et conversion interne), mais aussi sous forme d'émission d'un rayonnement électromagnétique. Ce phénomène radiatif est le phénomène de fluorescence (figure E.6). [650, 651]

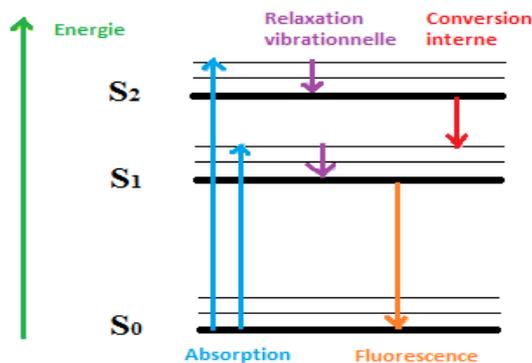


FIGURE E.6 – Diagramme de Jablonski simplifié représentant la structure électronique et vibrationnelle d'une molécule. L'état fondamental est noté S<sub>0</sub>, tandis que les deux premiers états singulets sont notés S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>.

### E.2.2 Loi de Beer-Lambert

En 1760, Jean-Henri Lambert établit une loi indiquant que la proportion de lumière incidente, d'intensité  $I_{0\lambda}$ , absorbée par un milieu transparent est indépendante de  $I_{0\lambda}$ . August Beer stipule quant à lui en 1852, que l'intensité de lumière absorbée par une solution est reliée à sa concentration  $C$  en molécules et à la longueur  $l$  du trajet des rayons lumineux dans cette solution.

De l'association de ces deux lois découle la loi de Beer-Lambert donnant l'expression de l'intensité absorbée par l'échantillon à la longueur d'onde  $\lambda$  :

$$I_\lambda = I_{0\lambda} 10^{-\epsilon_\lambda l C}, \quad (\text{E.19})$$

où  $\epsilon_\lambda$  est le coefficient d'extinction molaire ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et  $C$  est la concentration de la solution ( $\text{mol/L}$ ). Cette relation est valable pour les solutions diluées ( $C \leq 10^{-2} \text{ mol/L}$ ). Le coefficient d'extinction molaire dépend de la molécule d'intérêt ainsi que du solvant dans le cas d'un échantillon liquide. Il est également fonction de la longueur d'onde et de la température. [650, 651]

La loi de Beer-Lambert peut également s'exprimer en termes de l'absorbance  $A_\lambda$  :

$$A_\lambda = -\log_{10} \frac{I_\lambda}{I_{0\lambda}} \quad (\text{E.20})$$

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda l C. \quad (\text{E.21})$$

### E.2.3 Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption représente généralement l'absorbance de l'échantillon en fonction de la longueur d'onde du rayonnement incident. Mais il peut également représenter la transmittance, définie par  $T_\lambda = \frac{I_\lambda}{I_{0\lambda}}$ . [650]

Le spectre d'absorption d'une molécule dans le domaine UV-visible est formé de larges bandes d'absorption. En effet, à chaque niveau d'énergie électronique est associé un ensemble de niveaux d'énergie vibrationnelle et rotationnelle. Dans le cas d'une transition électronique, un grand nombre de transitions du niveau d'énergie fondamental vers les niveaux vibrationnels et rotationnels associés au niveau électronique final sont permises. De ce fait, chaque raie d'absorption liée à la transition électronique est accompagnée par un ensemble de raies d'absorption reliées aux transitions vibrationnelles. Il s'agit de la structure fine vibrationnelle. Chaque bande d'absorption est caractérisée par la valeur  $\lambda_{max}$  de la longueur d'onde associée à son maximum d'intensité. Celle-ci est égale à la longueur d'onde du rayonnement induisant la transition électronique. Les valeurs de l'absorbance  $A_{max} = A(\lambda_{max})$  de chaque bande représentent également des grandeurs caractéristiques du spectre d'absorption. [650, 651]

### E.2.4 Spectre d'absorption d'une molécule organique

Les groupements chimiques responsables du phénomène d'absorption des molécules organiques dans le domaine UV-visible sont appelés des chromophores. Ils contiennent une ou plusieurs doubles ou triples liaisons ( $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}\equiv\text{N}$ , cycle benzénique,...). En fonction du type d'atome, des liaisons et des niveaux d'énergie mis en jeu, différentes transitions électroniques sont possibles (transition  $\sigma\text{-}\sigma^*$ , transition  $\pi\text{-}\pi^*$ , transition d-d, etc.) [650, 651, 652]

#### E.2.4.1 Les complexes métallo-organiques

Ainsi, dans le cas d'une molécule métallo-organique, composée d'un ligand organique lié à un atome de métal de transition (e.g. un noyau métallique dans une porphyrine), les transitions électroniques induites sont des transitions  $\pi\text{-}\pi^*$  et d-d. Les transitions  $\pi\text{-}\pi^*$  sont associées aux doubles liaisons  $\text{C}=\text{C}$ . Une transition  $\pi\text{-}\pi^*$  correspond au passage d'un électron d'une orbitale moléculaire liante  $\pi$  à une orbitale antiliante  $\pi^*$ . Il s'agit d'une transition très intense. La

transition d-d quant à elle, est associée à la présence du métal de transition lié au ligand. Une des caractéristiques des métaux de transition est de présenter 5 orbitales d partiellement remplies par les électrons. Lorsque l'ion métallique est libre, c'est-à-dire non associé à un ligand, les 5 orbitales d possèdent la même énergie. Elles sont dégénérées. La complexation de l'ion avec un ligand provoque une levée de dégénérescence et divise le niveau d'énergie en deux sous-niveaux sur lesquels se répartissent les électrons d en respectant la règle de Hund. Une transition d-d est la transition d'un électron d entre deux orbitales appartenant aux deux sous-niveaux d'énergie. La différence d'énergie entre les deux sous-niveaux dépend du ligand.[650, 651, 652]

**E.2.4.1.1 Les porphyrines et les peroxydases** Les peroxydases sont des métalloprotéines contenant une structure porphyrique avec en son centre un noyau de fer. Le spectre d'absorption des peroxydases est majoritairement influencé par la porphyrine. Il reflète sa structure électronique.

Les porphyrines sont des macrocycles, formés par l'association de quatre cycles pyrroles. La molécule est composée de 11 doubles liaisons C=C et contient donc 22 électrons  $\pi$ . Ce système d'électrons est responsable de la forte absorption dans le domaine UV-visible des porphyrines et donc des peroxydases. En effet, le spectre d'absorption des peroxydases est caractérisé par deux types de bandes d'absorption liées à des transitions  $\pi$ - $\pi^*$ .

Cependant, le spectre est également influencé par la présence du métal de transition au centre de la porphyrine. En effet, celui-ci provoque une perturbation de l'ensemble des électrons  $\pi$  de la configuration électronique de la porphyrine [651, 653, 654]. Mais il ne s'agit pas du seul facteur pouvant perturber le spectre. En effet, la présence de substituants sur la porphyrine, celle de ligands supplémentaires sur le noyau de fer, l'impact de la structure protéique et donc la contrainte appliquée sur l'hème, ainsi que le solvant vont influencer la position et l'intensité des bandes d'absorption de la peroxydase [651].

Le spectre d'une peroxydase native présente une large bande d'absorption très intense, appelée bande de Soret. Elle se situe dans la région de l'ultraviolet proche dans le spectre, entre 380 et 450 nm. Cette bande d'absorption a pour origine les transitions  $\pi$ - $\pi^*$  liées aux doubles liaisons formant la porphyrine. Plus précisément, la molécule se trouvant initialement dans son état fondamental, l'état singulet  $S_0$ , passe dans son état singulet excité  $S_2$ . [651, 654, 655]

La seconde caractéristique spectrale d'une métalloporphyrine est la présence de deux bandes d'absorption, appelées bandes Q. La bande se trouvant au niveau des plus grandes longueurs d'onde est appelée bande  $\alpha$ , alors que la seconde est appelée bande  $\beta$ . Ces bandes sont également attribuables à des transitions  $\pi$ - $\pi^*$  des électrons  $\pi$ . Cependant, elles sont moins intenses que la bande de Soret. Elles ont pour origine la transition de l'état singulet  $S_0$  à l'état singulet excité  $S_1$ . La bande  $\beta$  est plus particulièrement due à la transition vers un des états vibrationnels associés à l'état  $S_1$ . Ces transitions étant moins énergétiques, les bandes Q se situent dans la région visible du spectre, entre 500 et 700 nm. Leur position et leur intensité varient en fonction de différents facteurs, tels que la nature et l'état d'oxydation de l'atome métallique, les types de liaisons entre le métal et les atomes d'azote de la porphyrine, du solvant, des groupements attachés à la porphyrine. [651, 655]

**E.2.4.1.2 Cas de la myéloperoxydase** Le spectre d'absorption de la myéloperoxydase (MPO-Fe(III)), préparée dans du tampon phosphate de pH 7,4, présente un pic de Soret de l'enzyme native qui se trouve à 430 nm (figure E.7). Le spectre présente également deux

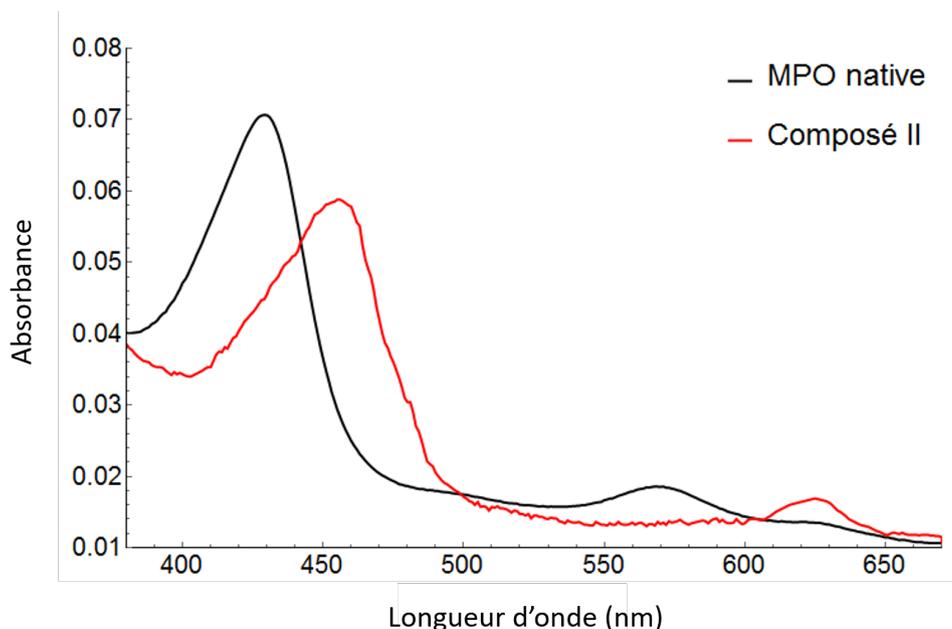


FIGURE E.7 – Spectre d'absorption de la myéloperoxydase (MPO) native et du composé II dans du tampon phosphate pH 7,4.

maxima à 570 nm et à 625 nm. Le pic à 570 nm correspond à la bande  $\alpha$ . Par contre, la bande centrée en 670 nm correspond quant à elle à un autre type de transition électronique. En effet, suite à l'absorption d'un photon d'énergie appropriée, un électron  $\pi$  de la porphyrine se situant initialement à l'état fondamental peut être transféré sur une orbitale d de l'atome de fer se trouvant au centre de la porphyrine. Ce type de phénomène est appelé transition par transfert de charge. [651, 656, 657, 658]

Le composé I de l'enzyme est un cation radicalaire ( $\text{MPO}^{+\cdot}\text{-Fe(IV)=O}$ ). Le noyau de fer est dans l'état d'oxydation IV et est lié à un atome d'oxygène par une double liaison. Le radical est quant à lui délocalisé sur la structure porphyrine. L'état radicalaire, la modification de l'état d'oxydation du noyau de fer ainsi que la présence d'un ligand en position distale modifient la position et l'intensité des bandes d'absorption par rapport à l'enzyme native. En effet, le composé I est caractérisé par un pic de Soret à 430 nm d'amplitude inférieure à celui de l'enzyme native. Le composé est caractérisé, à 430 nm, par un coefficient d'extinction molaire environ deux fois plus petit que celui de l'enzyme native. Le composé I étant très réactif, il est difficilement observable du fait de sa transition rapide vers le composé II.

Le composé II ( $\text{MPO-Fe(IV)=O}$ ) est non radicalaire mais le noyau de fer est toujours dans l'état d'oxydation IV et lié à un atome d'oxygène par une double liaison. Ce composé est caractérisé par un pic de Soret à 456 nm et par un pic à 625 nm.

## E.3 Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique, RPE, est une technique d'analyse non destructive basée sur la détection de l'absorption d'ondes de radiofréquence par des espèces chimiques paramagnétiques placées dans un champ magnétique extérieur. Elle permet l'étude des transitions électroniques entre les niveaux d'énergie magnétique de ces espèces, via l'interaction entre leur moment magnétique et la composante magnétique de l'onde incidente. Les composés paramagnétiques possèdent un ou plusieurs électrons non appariés. Cela signifie qu'ils possèdent un nombre impair d'électrons et, par conséquent, un moment magnétique permanent. Il peut s'agir d'atomes ou de molécules comme des radicaux libres ou des complexes de métaux de transition. La RPE permet d'étudier différents systèmes (e.g. biologiques, semi-conducteurs,...) Diverses informations peuvent être recueillies : détection de la présence d'espèces radicalaires, d'espèces réactives de l'oxygène, étude de métalloprotéines (enzymes), mesure de viscosité, de la cinétique de mécanismes radicalaires, de liaisons.

### E.3.1 Notions de base

#### E.3.1.1 L'électron libre

En se basant sur le modèle de Bohr, un atome peut être décrit comme un noyau autour duquel gravitent des électrons. Ce mouvement est caractérisé pour chaque électron par une grandeur vectorielle, le moment cinétique orbital  $\vec{l}_i$ , auquel est associé un moment magnétique  $\vec{\mu}_i$ . La relation entre  $\vec{l}_i$  et  $\vec{\mu}_i$  est donnée par  $\vec{\mu}_i = \gamma \vec{l}_i$  avec  $\gamma = \frac{-e}{2m_e}$  le rapport gyromagnétique, où  $e$  est la charge élémentaire<sup>1</sup> et  $m_e$  est la masse de l'électron<sup>2</sup>. Un électron possède également un moment cinétique intrinsèque, dit de spin,  $\vec{s}_i$  ainsi qu'un moment magnétique de spin  $\vec{\mu}_{si}$  associé. Il existe également une relation de proportionnalité entre ces deux grandeurs :  $\vec{\mu}_{si} = \frac{-g_s e}{2m_e} \vec{s}_i$ , où  $g_s$  est le facteur de Landé. Celui-ci vaut 2.0023 dans le cas d'un électron libre en tenant compte des corrections relativistes. Le moment cinétique total de l'électron est la somme des deux moments cinétiques de l'électron.

Les moments cinétiques de l'électron ainsi que les moments magnétiques associés sont quantifiés et ne peuvent prendre que certaines valeurs discrètes.  $\vec{l}_i$  ne peut prendre que les valeurs  $l_i = \sqrt{l(l+1)} \hbar$  avec le nombre quantique de moment cinétique orbital  $l = 0, 1, 2 \dots$ . Lorsque l'électron est placé dans un champ magnétique extérieur orienté selon l'axe Oz, le vecteur moment cinétique orbital ne peut prendre que certaines orientations par rapport à cet axe. Pour une valeur fixe de  $l$ , la composante  $l_{iz}$  ne peut prendre comme valeur que  $l_{iz} = m_l \hbar$ , avec  $m_l = -l, -l+1, \dots, l$ . De façon similaire, le moment cinétique de spin ne peut prendre que les valeurs  $s_i = \sqrt{s(s+1)} \hbar$  avec  $s = \frac{1}{2}$  le nombre quantique du moment cinétique de spin. Lorsque l'électron est placé dans un champ magnétique extérieur orienté selon l'axe Oz, le vecteur moment cinétique de spin ne peut prendre que certaines orientations par rapport à cet axe. On a :  $s_{iz} = m_s \hbar$ , avec  $m_s = \pm \frac{1}{2}$  le nombre quantique magnétique.

#### E.3.1.2 L'atome et la molécule paramagnétique

Un atome est composé d'un ensemble d'électrons qui se répartissent sur des niveaux d'énergie croissante. Ces niveaux (ou couches), caractérisés par le nombre quantique principal  $n = 1, 2, 3, \dots$ , sont divisés en sous-couches, caractérisées par le nombre quantique  $l$  et qui, pour une valeur de  $n$  fixée, peut prendre les valeurs  $0, 1, \dots, n-1$ . Chaque sous-couche est également divisée en  $(2l+1)$  orbitales, caractérisées par le nombre quantique  $m_l$ . Chaque orbitale

1.  $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{C}$

2.  $m_e = 9,109 \cdot 10^{-31} \text{kg}$

3.  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{m}^2 \text{kg/s}$ , la constante de Planck

est donc associée au triplet de nombres quantiques  $(n, l, m_l)$ . Les électrons de l'atome vont occuper les orbitales, en remplissant d'abord les plus internes, ayant l'énergie la plus faible, en respectant le principe d'exclusion de Pauli, qui impose à une orbitale d'être occupée par deux électrons au maximum. On obtient ainsi la configuration électronique de l'atome.

Lorsqu'une sous-couche  $(n, l)$  de l'atome est complète, le moment magnétique résultant, qui est la somme des moments magnétiques de tous les électrons de la sous-couche, est nul. Par conséquent, l'ensemble des sous-couches complètes d'un atome ne contribue pas à son moment magnétique. Seules les sous-couches incomplètes peuvent induire la présence d'un moment magnétique non nul. Dans ce cas, on est en présence d'un atome paramagnétique. Le moment magnétique total de l'atome  $\vec{\mu}$  est donc celui de la sous-couche incomplète. On a  $\vec{\mu} = \sum \vec{\mu}_i + \sum \vec{\mu}_{s_i} = \vec{\mu}_l + \vec{\mu}_s$ , somme sur le nombre d'électrons de la sous-couche. Le moment cinétique total de l'atome est noté  $\vec{J} = \sum \vec{l}_i + \sum \vec{s}_i = \vec{L} + \vec{S}$ . On a  $\vec{\mu} = \gamma (\vec{L} + g_s \vec{S})$ .  $\vec{\mu}$  n'est pas directement proportionnel à  $\vec{J}$  et leurs directions ne sont donc pas parallèles. Par contre, si on considère la composante de  $\vec{\mu}$  selon  $\vec{J}$ , on a,

$$\vec{\mu}_J = \frac{-g_j e}{2m_e} \vec{J}, \quad (\text{E.22})$$

où  $g_j = 1 + \frac{j(j+1)\hbar^2 - l(l+1)\hbar^2 + s(s+1)\hbar^2}{j(j+1)\hbar^2}$  est le facteur de décomposition spectrale. Il dépend du couplage spin-orbite, c'est-à-dire du degré d'interaction entre  $\vec{L}$  et  $\vec{S}$ .

L'association des atomes en molécules ne perturbe pas les électrons des couches internes des atomes. Par contre, les électrons se trouvant sur les orbitales moléculaires de plus hautes énergies et intervenant dans les liaisons chimiques sont fortement perturbés. Les molécules possédant un électron non apparié dans leur couche la plus externe, c'est-à-dire ayant un nombre d'électrons impair, possèdent un moment magnétique non nul. Elles sont paramagnétiques.

### E.3.1.3 Effet Zeeman

En présence d'un champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$  orienté, par convention, selon  $\vec{e}_z$ , les moments cinétiques  $\vec{L}$  et  $\vec{S}$  d'un atome paramagnétique ne peuvent prendre que certaines orientations par rapport à la direction de  $\vec{B}_0$ . Par conséquent, les composantes  $L_z$  et  $S_z$  sont quantifiées et on a  $L_z = \hbar m_l$  avec  $m_l = -l, \dots, l$  et  $S_z = \hbar m_s$  avec  $m_s = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$ . Comme  $L_z$  et  $S_z$  sont quantifiés,  $J_z$  l'est également. On a  $J_z = \hbar m_j$ , avec  $m_j = -j, \dots, j$  et  $J_z$  est relié à  $\mu_z$  par la relation  $\mu_z = -\frac{g_j e}{2m_e} J_z$ .

De plus, en réponse à son interaction avec  $\vec{B}_0$ , le moment magnétique total  $\vec{\mu}$  de l'atome subit un moment de force  $\vec{\tau} = \vec{\mu} \wedge \vec{B}_0$  qui tend à orienter le moment magnétique selon la direction de  $\vec{B}_0$ . Le moment magnétique se met donc à précesser autour de la direction de  $\vec{B}_0$  à la vitesse angulaire  $w = -\gamma B_0$ . C'est la précession de Larmor.

L'énergie potentielle d'interaction du moment magnétique  $\vec{\mu}$  avec  $\vec{B}_0$  est donnée par :

$$E_p = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu_z B_0 = \frac{g_j e}{2m_e} J_z B_0 = g_j m_j \frac{\hbar e}{2m_e} B_0 \quad (\text{E.23})$$

En posant  $\mu_B = \frac{\hbar e}{2m_e}$  (magnéton de Bohr), on a

$$E_p = g_j m_j \mu_B B_0 \quad (\text{E.24})$$

On peut constater qu'en présence d'un champ magnétique extérieur, les niveaux d'énergie électronique de l'atome se divisent chacun en  $2J+1$  niveaux magnétiques. On a une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie proportionnelle à l'intensité du champ  $B_0$ , appelée effet Zeeman. La différence d'énergie entre les différents niveaux magnétiques vaut  $g_j \mu_B B_0$ . [659, 651, 363, 660, 661]

### E.3.1.4 Condition de résonance

**E.3.1.4.1 Les radicaux libres** Les radicaux libres sont des molécules paramagnétiques possédant un seul électron non apparié. Celui-ci est délocalisé par rapport au noyau auquel il est associé et peut donc être presque considéré comme un électron libre. Le couplage spin-orbite est par conséquent négligeable. On peut réaliser l'approximation,  $g_j = g_e \text{ libre} = g_e \cong 2$ . Un électron libre n'est pas caractérisé par un moment cinétique orbital. Le moment cinétique total de l'électron non apparié est donc égal uniquement à son moment cinétique de spin  $\vec{S}$  et son moment magnétique est égal  $\vec{\mu}_s$ . On a  $S = 1/2$ .

En suivant le même raisonnement qu'à la section précédente, on obtient qu'en présence d'un champ magnétique  $\vec{B}_0$ ,  $\vec{\mu}_s$  ne peut prendre que certaines orientations par rapport à  $\vec{B}_0$ ,

$$\mu_{sz} = -2\mu_B m_s, \quad (\text{E.25})$$

avec  $m_s = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$ . Ainsi les niveaux d'énergie électronique se divisent en deux niveaux magnétiques d'énergie

$$E = E_n + 2\mu_B m_s B_0, \quad (\text{E.26})$$

donc  $E_n + \mu_B B_0$  et  $E_n - \mu_B B_0$ . La différence d'énergie entre ces deux niveaux est

$$\Delta E = 2\mu_B B_0. \quad (\text{E.27})$$

Les électrons célibataires se répartissent sur ces deux niveaux d'énergie en fonction de la valeur du nombre quantique magnétique  $m_s$  les caractérisant (figure E.8). Le nombre d'électrons peuplant les niveaux caractérisés par  $m_s = -\frac{1}{2}$  et  $m_s = \frac{1}{2}$  sont notés respectivement  $N_-$  et  $N_+$ . Ces populations obéissent à la statistique de Maxwell-Boltzman. A l'équilibre thermique, on a

$$N_+ = N_- e^{\frac{-g_e \mu_B B_0}{k_B T}}, \quad (\text{E.28})$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzman<sup>14</sup>. A température ambiante,  $\frac{N_+}{N_-} = 0.999$ . Le niveau d'énergie inférieur est légèrement plus peuplé que le niveau supérieur.

Ensuite, en envoyant une onde de radiofréquence de fréquence  $\nu_0$  sur l'échantillon, des transitions entre les deux niveaux d'énergie sont induites à condition que l'énergie fournie par l'onde respecte la condition de résonance,

$$h\nu_0 = g_e \mu_B B_0. \quad (\text{E.29})$$

Deux transitions peuvent avoir lieu : une absorption d'énergie permettant à un électron de passer de l'état de spin *down* ( $m_s = -\frac{1}{2}$ ) à l'état de spin *up* ( $m_s = \frac{1}{2}$ ) et l'émission stimulée provoquant le passage d'un électron du niveau d'énergie supérieur au niveau inférieur en émettant un photon dont l'énergie est égale à la différence d'énergie entre les deux niveaux (on néglige le phénomène d'émission spontanée). Bien que ces deux phénomènes présentent la même probabilité d'occurrence, la légère différence de population permet à l'absorption de

14.  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg/s}^2 \text{ K}$

dominer l'émission stimulée. Cette absorption est essentielle pour la technique de RPE. En effet, pour analyser un échantillon paramagnétique, un balayage en champ est réalisé, c'est-à-dire que la fréquence  $\nu_0$  de l'onde électromagnétique est fixée et qu'on fait varier l'amplitude du champ magnétique  $\vec{B}_0$ . A la résonance, lorsque  $h\nu_0 = g_e\mu_B B_{R,0}$  où  $B_{R,0}$  est l'amplitude du champ magnétique extérieur à la résonance, l'échantillon absorbe l'énergie du rayonnement de radiofréquence. Une mesure de l'intensité absorbée par l'échantillon est réalisée en fonction de l'amplitude du champ magnétique extérieur. En pratique, il s'agit de la dérivée de l'intensité absorbée en fonction des valeurs de  $\vec{B}_0$ . [659, 651, 363, 660, 661]

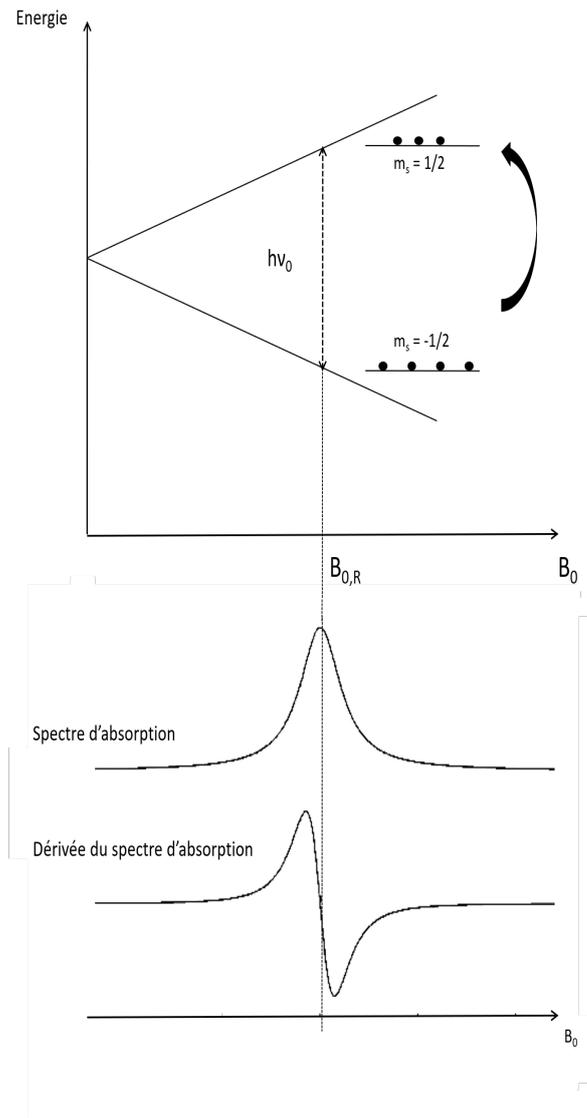


FIGURE E.8 – Schéma représentant la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie magnétique  $m_s = \pm 1/2$  d'un système de spin  $S = 1/2$ , en présence d'un champ magnétique extérieur  $B_0$ . Absorption d'énergie résultant de l'application sur le système d'une onde électromagnétique dont l'énergie respecte la condition de résonance. Schéma inspiré de la thèse de J. Colin [651].

Suite au mécanisme d'absorption, la différence de population entre les deux niveaux d'énergie,  $n = N_+ - N_-$ , évolue selon une loi exponentielle décroissante :  $n = n(0) e^{-2Pt}$ , où  $n(0)$  est la différence de population initiale et  $P$  la probabilité par unité de temps de transition entre les deux niveaux d'énergie. Par conséquent, les deux populations vont s'égaliser. Les phénomènes d'absorption et d'émission stimulée ayant la même probabilité d'occurrence, l'in-

tensité va devenir nulle. C'est le phénomène de saturation qu'il faut éviter. Heureusement, il existe des mécanismes de relaxation, grâce auxquels les électrons se trouvant sur le niveau d'énergie supérieur peuvent libérer leur excès d'énergie. On compte deux phénomènes tendant à rétablir la différence de population obtenue à l'équilibre thermique, l'interaction spin-spin et l'interaction spin-réseau.

L'interaction spin-spin provient de l'interaction de type dipôle-dipôle entre les spins des électrons célibataires avec soit le spin nucléaire des noyaux voisins soit avec le spin des autres électrons. Celle-ci ne provoque pas de perte d'énergie mais uniquement des échanges d'énergie entre les différentes particules. Ce phénomène ne permet donc pas de modifier la différence de population entre les deux niveaux. Il est donc nécessaire d'avoir un second phénomène, l'interaction spin-réseau, qui lui induit des pertes d'énergie des électrons par interaction avec leur environnement. Dans le cas d'un échantillon solide, la perte d'énergie des électrons est causée par la vibration du milieu. Dans le cas d'un liquide, la perte est induite par l'interaction des électrons avec les molécules du milieu en mouvement. [659, 651, 363, 660, 661]

**E.3.1.4.2 Les systèmes complexes** Dans le cas des radicaux libres, le couplage spin-orbite est très faible et peut donc être négligé. Cependant, dans des systèmes plus complexes, l'électron non apparié est lié à un ou plusieurs noyaux. Dans ces conditions, l'électron ne peut plus être considéré comme libre et le couplage spin-orbite n'est plus négligeable. Celui-ci augmente avec le numéro atomique  $Z$  du noyau sur lequel est délocalisé l'électron non apparié. Le couplage va donc induire un champ magnétique local supplémentaire qui sera ressenti par l'électron célibataire. Dans ce cas, la condition de résonance doit tenir compte de ce champ local.

$$h\nu_0 = g_e\mu_B(B_{0,R} + B_{sp}), \quad (\text{E.30})$$

$$h\nu_0 = g_j\mu_B B_{0,R}. \quad (\text{E.31})$$

Le facteur de décomposition spectrale se définit donc comme  $g_j = g_e \left(1 + \frac{B_{sp}}{B_{0,R}}\right)$ . [659, 660, 662]

Le couplage spin-orbite dépend fortement de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique extérieur. Le facteur  $g$  est par conséquent anisotrope. Dans le cas où les molécules de l'échantillon sont fixes les unes par rapport aux autres et ont la même orientation, par exemple dans un cristal, les différentes molécules ressentent la même valeur de champ magnétique local. Par conséquent, la valeur de  $g$  est identique pour toutes les molécules. Lorsque l'orientation du cristal varie par rapport à la direction du champ magnétique extérieur, la valeur de  $g$  varie également. Le spectre RPE est donc formé de raies fines. Lorsqu'il s'agit d'une poudre ou une solution gelée, les molécules ont différentes orientations par rapport au champ magnétique extérieur. Chaque molécule ressent donc une valeur différente du champ local induit par le couplage spin-orbite. Le spectre observé est la superposition de toutes les valeurs du champ magnétique résultant, provoquant l'élargissement des raies ainsi qu'une perte d'informations sur la valeur de  $g$ .

L'anisotropie du facteur  $g$  s'exprime sous la forme d'un tenseur de rang deux symétrique [g]. En choisissant un système d'axes approprié ( $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$  et  $\vec{z}$ ), le tenseur se diagonalise sous la forme :

$$\begin{pmatrix} g_x & 0 & 0 \\ 0 & g_y & 0 \\ 0 & 0 & g_z \end{pmatrix}$$

Lorsque les trois axes  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$  et  $\vec{z}$  sont équivalents,  $g_x = g_y = g_z$  et le tenseur se réduit à un scalaire. Le facteur  $g$  est alors isotrope. Ce cas peut être observé pour des solutions de faible viscosité, dans lesquelles les molécules paramagnétiques peuvent rapidement changer d'orientation par rapport au champ magnétique extérieur. La valeur de  $g$  est donc le résultat d'une moyenne temporelle sur toutes les orientations possibles et les raies du spectre RPE sont fines. L'effet de moyenne s'exprime de la façon suivante :

$$g = \frac{1}{3}(g_x + g_y + g_z) \quad (\text{E.32})$$

En mécanique quantique, l'effet Zeeman s'exprime grâce à l'hamiltonien de Zeeman, qui tient compte de l'interaction entre les moments cinétiques  $\vec{S}$  et  $\vec{L}$  et le champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$ , ainsi que du couplage spin-orbite :

$$\mathcal{H} = g_e \mu_B \vec{S} \cdot \vec{B}_0 + \mu_B \vec{L} \cdot \vec{B}_0 + \lambda \vec{L} \cdot \vec{S} \quad (\text{E.33})$$

où  $\mu_B$  est le magnéton de Bohr et  $\lambda$  est la constante de couplage spin-orbite.[659, 651, 661]

### E.3.1.5 Structure hyperfine

Un spectre obtenu en RPE est caractérisé par une structure hyperfine. Celle-ci provient de l'interaction du moment magnétique de l'électron non apparié avec les moments magnétiques de spin des noyaux se trouvant près de lui. Ces moments magnétiques nucléaires génèrent des champs magnétiques locaux permanents qui vont s'additionner vectoriellement au champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$ . Seuls les noyaux ayant un nombre impair de nucléons et, par conséquent, un moment cinétique de spin nucléaire  $\vec{I}$  non nul peuvent induire l'interaction hyperfine.

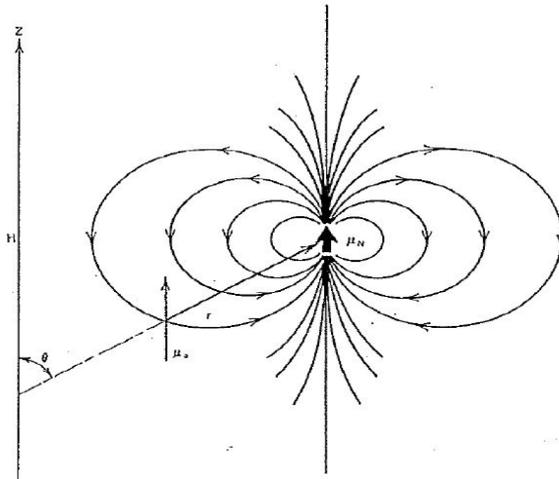


FIGURE E.9 – Schéma représentant l'interaction dipôle-dipôle entre le moment magnétique de l'électron non apparié et le moment magnétique de spin du noyau [660].

Ainsi, si on considère le cas d'un électron célibataire ayant un seul atome voisin, celui-ci est caractérisé par un moment cinétique de spin nucléaire  $\vec{I}$  et un moment magnétique de spin nucléaire  $\vec{\mu}_I$ , liés par la relation  $\vec{\mu}_I = \gamma \vec{I}$  où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique nucléaire, caractéristique du noyau. En présence du champ magnétique  $\vec{B}_0$  dirigé selon l'axe Oz, la composante  $I_z$  est quantifiée et on a  $I_z = m_I \hbar$  avec  $m_I$  variant de  $-I$  à  $I$  par pas d'une unité. La composante  $\mu_{Iz}$  est également quantifiée et peut aussi prendre  $2I+1$  valeurs. Le champ magnétique local créé par le noyau et ressenti par l'électron a pour origine l'interaction

dipôle-dipôle anisotrope entre le moment magnétique de l'électron et le moment magnétique nucléaire. L'amplitude de ce champ local est donnée par

$$B_{local} = \mu_{Iz} \frac{3\cos^2\theta - 1}{r^3}, \quad (E.34)$$

où  $r$  est la distance entre l'électron et le noyau et  $\theta$  est l'angle représenté sur la figure E.9. Le champ local dépend des  $2I+1$  orientations possibles de  $\vec{\mu}_I$  par rapport à la direction de  $\vec{B}_0$ .

Un échantillon à analyser est composé d'un ensemble de molécules possédant un électron non apparié. Ces électrons sont tous proches d'un noyau caractérisé par un moment magnétique d'orientation donnée par rapport à  $\vec{B}_0$ . Le champ magnétique effectif ressenti par les électrons étant donné par  $\vec{B}_{effectif} = \vec{B}_0 + \vec{B}_{local}$ , il existe donc  $2I+1$  valeurs de champ effectif (figure E.10). Ainsi, la condition de résonance est donnée par  $h\nu_0 = g_j\mu_B B_{effectif,R}$ , où  $B_{effectif,R}$  est le champ magnétique effectif à la résonance.

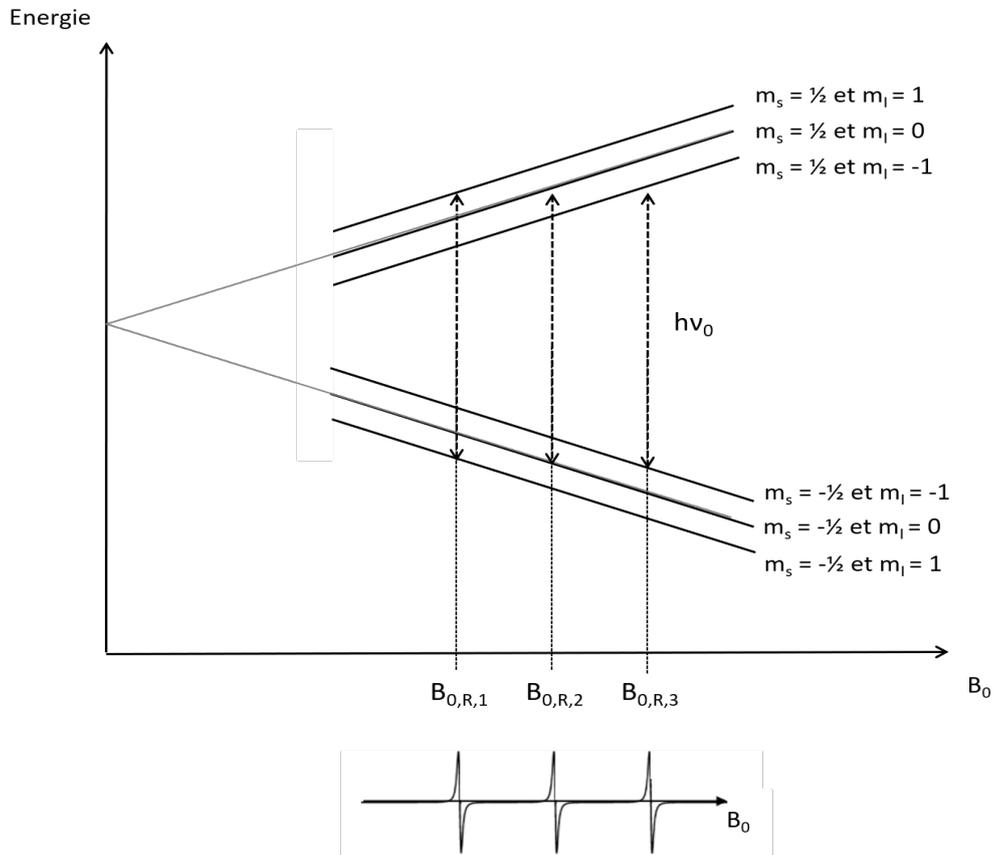


FIGURE E.10 – Schéma représentant la séparation des niveaux d'énergie magnétique d'un système de spin  $S = 1/2$ , en présence d'un champ magnétique extérieur  $B_0$ , suite à son interaction hyperfine avec un noyau de spin nucléaire  $I = 1$ . Les niveaux d'énergie magnétique se divisent en  $2I+1 = 3$  sous-niveaux. Schéma inspiré de la thèse de J. Colin [651].

Expérimentalement,  $h\nu_0$  étant fixé lors du balayage en champ magnétique extérieur, la résonance est donc observée pour  $2I+1$  valeurs du champ magnétique extérieur  $B_0$  (noté  $B_{0,R}$ ), ce qui donne lieu à la séparation des raies d'absorption du spectre en  $2I+1$  raies équidistantes et de même intensité. En effet, les niveaux d'énergie magnétique sont chacun divisés en  $2I+1$  niveaux hyperfins caractérisés par le nombre quantique  $m_I$ . Les deux règles de sélection définissant les transitions permises entre les niveaux d'énergie hyperfins sont  $\Delta m_s = \pm 1$  et

$\Delta m_I = 0$ . On aura donc  $2I+1$  transitions possibles entre ces niveaux. Les valeurs du champ magnétique extérieur pour lesquelles aura lieu la résonance sont  $B_{0,R} = B_0 - a m_I$ , où  $a$  est la constante hyperfine et où  $B_0$  est ici le champ magnétique vérifiant la condition de résonance si on ne considère pas l'interaction hyperfine.  $a$  représente l'intervalle en Gauss entre les différentes raies hyperfines. [651, 659, 660]

Dans le cas d'un électron se trouvant sur une orbitale s, l'origine des champs magnétiques locaux est due uniquement à une interaction hyperfine isotrope d'origine purement quantique et liée à la probabilité de présence de l'électron au noyau. En effet, les électrons ne sont pas localisés dans l'espace. Par conséquent, la valeur du champ local produit par l'interaction dipôle-dipôle est calculée en faisant la moyenne sur toutes les positions possibles de l'électron. Toutes les orientations étant équiprobables dans les orbitales s,  $\cos^2 \theta = 1/3$  (voir équation E.34). Par conséquent, le champ local est nul. L'interaction hyperfine isotrope s'exprime sous la forme de l'Hamiltonien [659, 651] :

$$\mathcal{H}_{iso} = a \vec{S} \cdot \vec{I}, \text{ avec } a = \frac{2\mu_0}{3} g_e \mu_B \gamma |\psi(0)|^2 \quad (\text{E.35})$$

où  $\mu_0$  la perméabilité magnétique du vide,  
 $\gamma$  le rapport gyromagnétique nucléaire,  
 $|\psi(0)|^2$  la densité électronique au noyau,  
 $a$  la constante de couplage hyperfin

Pour des électrons non appariés se trouvant sur une orbitale p,d,f, les champs magnétiques locaux ont une origine liée à des interactions anisotropes. En effet, la fonction d'onde de ces orbitales est le produit d'une fonction de symétrie sphérique et d'une harmonique sphérique. Elle présente un noeud au noyau, là où la probabilité de présence de l'électron est nulle. Les orientations ne sont pas équiprobables. L'Hamiltonien représentant l'interaction hyperfine anisotrope s'exprime de la façon suivante [659, 651] :

$$\mathcal{H}_{aniso} = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \mu_B \gamma \left( \frac{3(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{\vec{I} \cdot \vec{S}}{r^3} \right). \quad (\text{E.36})$$

### E.3.2 Les complexes avec métaux de transition - cas particulier des peroxydases

Jusqu'à présent, seuls ont été considérés les systèmes caractérisés par un moment cinétique de spin  $\vec{S}$  égal à  $1/2$ , c'est-à-dire ayant un seul électron non apparié, comme les radicaux libres. Or, il existe un grand nombre de systèmes avec  $S = n/2$ , avec  $n = 2,3,\dots$  le nombre d'électrons non appariés. C'est par exemple le cas des complexes de métaux de transition et des métalloprotéines. Les peroxydases sont des métalloprotéines qui, à l'état natif, possèdent un noyau de fer à l'état d'oxydation  $+3$ .

#### E.3.2.1 Rhombicité et anisotropie

Au sein du site actif des peroxydases, le noyau de fer, possédant les électrons non appariés, se trouve au centre d'une structure porphyrique (figure E.11a). Le noyau de fer est alors lié de façon covalente à quatre atomes d'azote et le système possède une symétrie axiale. La porphyrine, étant au sein d'une structure protéique, peut passer de la symétrie axiale à une symétrie rhombique, c'est-à-dire sans axe de symétrie, suite à la contrainte qu'impose la structure et la distorsion du plan de l'hème qui en découle. En effet, la liaison de la protéine avec l'hème engendre une asymétrie structurale et électronique dans l'environnement du noyau de fer en perturbant le système d'électrons  $\pi$  de l'hème. La structure porphyrique est proche d'une

structure octaédrique (figure E.11b).

Un système paramagnétique à symétrie rhombique est caractérisé par un facteur  $g$  totalement anisotrope. En effet, l'environnement du noyau de fer, sur lequel est délocalisée sa densité électronique, est anisotrope. Il existe donc trois directions particulières  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$  et  $\vec{z}$  de l'espace (figure E.11b) selon lesquelles, l'application d'un champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$  provoque une réponse différente du système rhombique. Le tenseur  $g$  s'exprime donc avec les valeurs  $g_x \neq g_y \neq g_z$  (figure E.11c), qui dépendent évidemment du couplage spin-orbite, important dans les métalloprotéines en raison de la présence du noyau métallique.

Pour obtenir le spectre RPE d'une métalloprotéine, la solution doit être gelée pour empêcher l'élargissement des raies du spectre suite au temps de relaxation spin-réseau très court du complexe de fer à température ambiante. Dans le cas d'une solution gelée, les molécules paramagnétiques ont une position fixe et toutes les orientations sont représentées de façon équiprobable. Le spectre RPE d'une solution gelée est donc la superposition des différents spectres résultant de toutes les orientations possibles des molécules par rapport au champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$ , comme dans le cas d'une poudre (figure E.11c). [659, 651]

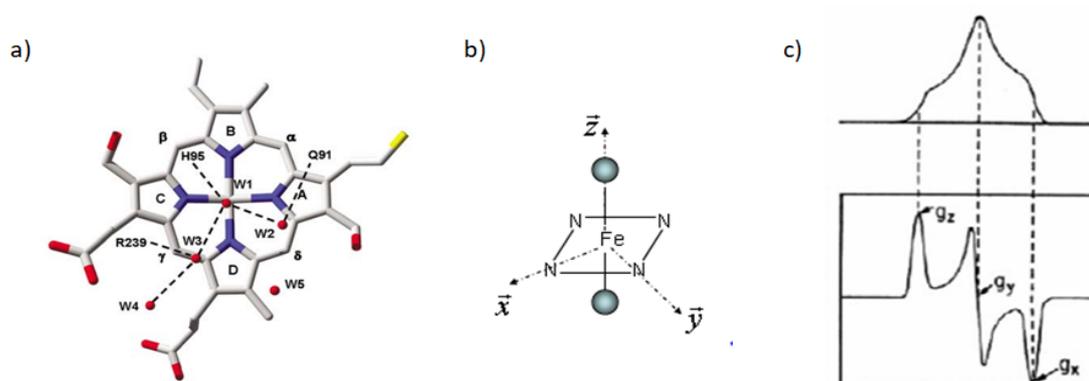


FIGURE E.11 – a) Structure de l'hème de la myéloperoxydase [50], b) Structure octaédrique de la porphyrine des peroxydases [651], c) Allure du signal d'absorption d'un système à symétrie rhombique en solution gelée et allure de la dérivée première du signal d'absorption d'un système à symétrie rhombique en solution gelée [651].

### E.3.3 Champ de ligands

Le noyau de fer au sein de la porphyrine du site actif des peroxydases est à l'état d'oxydation +3. Par conséquent, sur base de sa structure électronique, la sous-couche 3d ne contient que cinq électrons et est de ce fait, à moitié remplie. Chaque électron ayant un spin de 1/2, le spin du complexe métallique  $S$  est de 5/2. Les cinq électrons  $d$  vont se répartir sur les cinq orbitales de la sous-couche, de manière à minimiser l'énergie du complexe. Il va donc y avoir compétition entre la répulsion électrostatique, qui va tendre à séparer les électrons sur les cinq orbitales et maximiser le spin total, et l'interaction électrostatique avec des ligands axiaux potentiels du noyau de fer, qui favorise le regroupement des électrons sur les orbitales de plus faible énergie et minimise le spin total. [659, 651]

L'interaction de l'atome de fer avec un ligand provoque une séparation  $\Delta$  des orbitales  $d$ . Deux situations peuvent être considérées (figure E.12). Lorsque le champ de ligand est faible, c'est-à-dire que l'interaction avec le ligand est faible, l'état de spin de l'atome de fer est dit

fort, ou *highspin*. Les cinq orbitales d sont donc peu séparées et les électrons se répartissent chacun sur une orbitale afin de maximiser le spin total selon la règle de Hund. On a alors  $S = 5/2$ . Par contre, lorsque l'interaction avec le ligand est forte, celle-ci provoque la division des orbitales et le regroupement des électrons sur les trois orbitales de plus basse énergie. L'atome de fer est donc dit spin faible ou *low spin* et on a  $S = 1/2$ . [659, 651, 661]

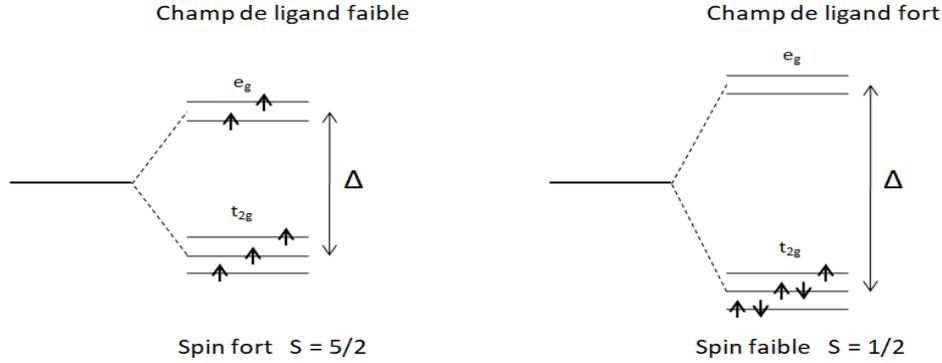


FIGURE E.12 – Séparation en énergie des cinq orbitales d de la sous-couche 3d du noyau de fer des peroxydases sous l'action d'un champ de ligand faible ou fort et répartition des cinq électrons. [651]

### E.3.3.1 Levée de dégénérescence à champ nul

Pour les systèmes paramagnétiques caractérisés par  $S > 1/2$ , il faut également tenir compte de la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie électronique en l'absence d'un champ magnétique extérieur. Ce phénomène est appelé Zero Field Splitting (ZFS). Ce dernier a pour origine le couplage spin-orbite et l'interaction spin-spin entre les différents électrons non appariés. L'Hamiltonien de levée de dégénérescence à champ nul s'écrit sous la forme [659, 651, 661] :

$$\mathcal{H}_{ZFS} = \vec{S} \cdot [D] \cdot \vec{S} \quad (\text{E.37})$$

Le tenseur  $[D]$  est une matrice de trace nulle. La matrice  $D$  exprimée dans le système d'axes  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$  et  $\vec{z}$ , décrit précédemment, est diagonale :

$$[D] = \begin{pmatrix} D_x & 0 & 0 \\ 0 & D_y & 0 \\ 0 & 0 & D_z \end{pmatrix}$$

avec  $D_x + D_y + D_z = 0$ .

Les valeurs propres du tenseur  $D$  dépendent principalement du couplage spin-orbite dans le cas des complexes de métaux de transition, de la distorsion et de l'anisotropie du système de spin.

L'Hamiltonien ZFS peut également s'exprimer de la façon suivante :

$$\mathcal{H}_{ZFS} = D_x S_x^2 + D_y S_y^2 + D_z S_z^2, \quad (\text{E.38})$$

$$\mathcal{H}_{ZFS} = D(S_z^2 - (S(S+1)/3)) + E(S_x^2 - S_y^2), \quad (\text{E.39})$$

avec  $D = 3D_z/2$  et  $E = (D_x - D_y)/2$ .

Si on choisit l'axe  $\vec{z}$  comme étant l'axe principal, tel que  $|D_z| \geq |D_x|, |D_y|$ , on a  $0 \leq \lambda = \frac{E}{D} \leq 1/3$ . Le rapport  $\lambda = \frac{E}{D}$  est une mesure de la rhombicité du système et peut prendre une valeur allant de 0 pour un système axial à 1/3 pour un système ayant une rhombicité maximale. [659, 651, 661]

Prenons l'exemple d'une peroxydase à l'état *high spin*. Le noyau Fe(III) possède cinq électrons non appariés et donc un spin  $S = 5/2$ . Le ZFS provoque la différenciation énergétique entre les états de spin  $\pm 1/2$ ,  $\pm 3/2$  et  $\pm 5/2$ . Les niveaux d'énergie magnétique restent associés en trois doublets, appelés doublets de Kramer. Il est nécessaire de plonger le système dans un champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$  pour que l'effet Zeeman provoque la séparation des trois doublets en six niveaux d'énergie magnétique caractérisés par les valeurs de  $m_s = -5/2, -3/2, -1/2, 1/2, 3/2$  et  $5/2$  (figure E.13).

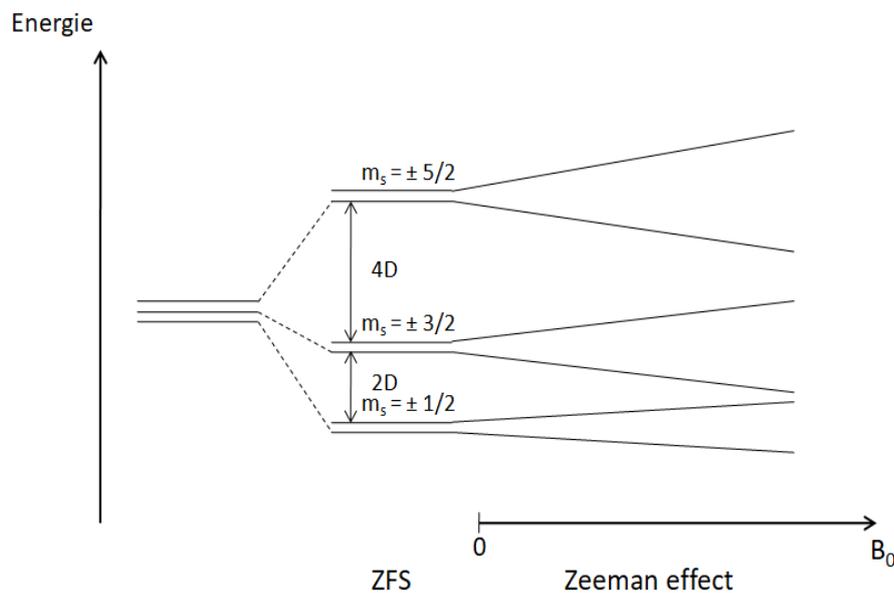


FIGURE E.13 – Effets Zeeman et de levée de dégénérescence à champ nul appliqués aux niveaux d'énergie d'un noyau de fer +3 high spin. [651]

L'écart en énergie entre les états de spin augmente avec le facteur  $D$ . Lorsque  $D = 0$ , il n'y a pas de levée de dégénérescence à champ nul, on retrouve le premier cas illustré à la figure E.14. Les transitions permises entre les différents niveaux d'énergie satisfont à la règle de  $\Delta m_s = 1$  et apparaîtront pour une même valeur de champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$ . Le spectre RPE associé est formé d'une raie isotrope. Dans le cas où le ZFS est non nul, la différence d'ordre de grandeur entre le ZFS et l'effet Zeeman a un impact important sur la structure du spectre RPE. En effet, lorsque le ZFS est faible par rapport à l'effet Zeeman ( $D \ll h\nu$ ), les transitions au sein des trois doublets apparaîtront pour différentes valeurs du champ magnétique extérieur et le spectre sera composé de cinq raies. Lorsque le ZFS est beaucoup plus grand que l'effet Zeeman ( $D \gg h\nu$ ), la troisième configuration est obtenue (figure E.14) Avec les champs magnétiques produits dans les spectromètres conventionnels, seules les transitions au sein du premier doublet  $\pm 1/2$  seront observées. [659, 651, 661]

Dans le cas d'un système rhombique, le paramètre  $E$  doit également être considéré afin de déterminer l'impact du ZFS et de l'effet Zeeman sur les niveaux d'énergie du système et l'allure de son spectre RPE, c'est-à-dire la position des raies et les valeurs du facteur  $g$ . Un rhombogramme donne l'évolution des valeurs de  $g$  caractéristiques du système en fonction du

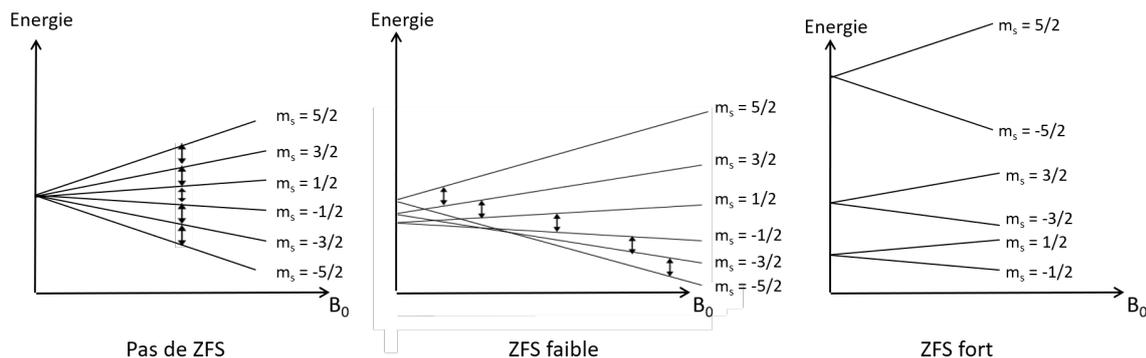


FIGURE E.14 – Influence de l'intensité du ZFS sur la levée de dégénérescence par effet Zeeman des niveaux d'énergie d'un système de spin  $S=5/2$ . [651]

rapport  $\lambda = \frac{E}{D}$ . La figure E.15 illustre le rhombogramme d'un système contenant un noyau de fer +3 à l'état high spin. En s'intéressant au premier doublet  $\pm 1/2$ , on observe que lorsque le système présente une symétrie axiale ( $\lambda = 0$ ), deux résonances apparaissent. Le système est symétrique dans le plan x-y. On obtient donc  $g_x = g_y = 6$  et  $g_z = 2$ . C'est le cas pour une métalloprotéine appelée myoglobine, qui possède une structure porphyrique plane, dans le plan x-y (figure E.11b). Par contre, dans le cas des peroxydases comme la myéloperoxydase, la rhombicité est non nulle suite à la distorsion du plan de l'hème. Par conséquent, les valeurs de  $g_x$  et  $g_y$  sont différentes et s'éloignent de 6. [659, 651, 663, 664]

Les expressions mathématiques suivantes donnent l'évolution des valeurs de  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$  en fonction de  $\lambda$ .

$$\begin{aligned} g_x &= 6,01 + 24\frac{E}{D} - 18,7\frac{E^2}{D^2} \\ g_y &= 6,01 - 24\frac{E}{D} - 18,7\frac{E^2}{D^2} \\ g_z &= 2 - 33,8\frac{E^2}{D^2} \end{aligned}$$

### E.3.4 Spin trapping

La RPE est une technique de spectroscopie de choix permettant notamment l'étude des radicaux libres, des composés chimiques très réactifs possédant un électron non apparié. Cependant, l'observation directe de certains radicaux libres en RPE stationnaire en milieu aqueux est impossible étant donné leur importante réactivité et donc instabilité. Une technique appelée *spin trapping* ou piégeage de spin a été développée afin de permettre l'étude des radicaux de courte durée de vie. Afin de former un radical libre plus stable, appelé adduit de spin, le radical réagit avec une molécule diamagnétique, le piégeur de spin. [660, 665, 666, 667]



#### E.3.4.1 Les nitrones et les nitrosos

Il existe deux classes principales de piégeurs : les composés nitrosos et les composés nitrones. Ces deux types de piégeurs de spin, lorsqu'ils réagissent avec des radicaux libres  $R\cdot$  de façon covalente, forment des radicaux nitroxyles, radicaux contenant le groupement fonctionnel  $\text{NO}\cdot$ .

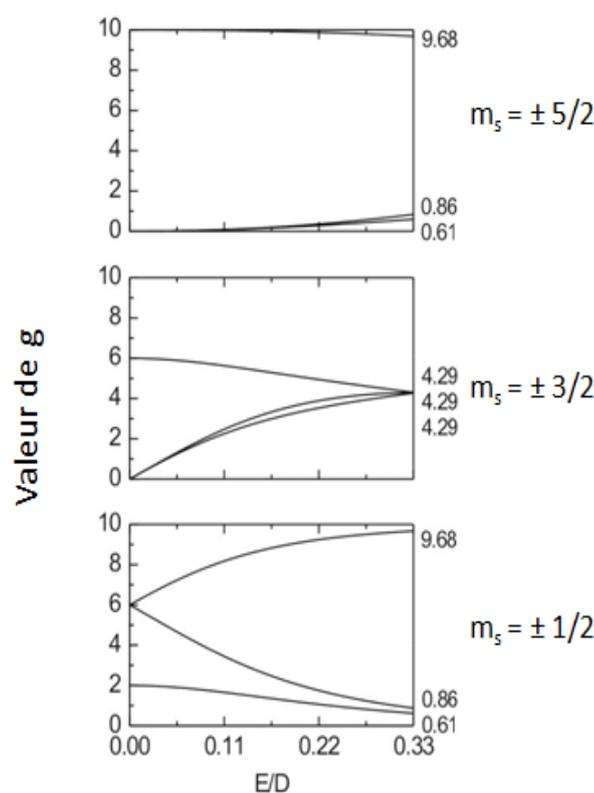


FIGURE E.15 – Rhombogramme d'un système contenant un noyau de fer +3 à l'état high spin. Image originale de la thèse de J. Colin [651]

L'électron non apparié du radical nitroxy est proche du noyau d'azote caractérisé par un spin nucléaire non nul ( $I = 1$ ). Ainsi, en raison du couplage hyperfin, le spectre RPE du radical nitroxy est donc composé de trois raies, une à bas champ, la deuxième à champ moyen et la dernière à haut champ. En outre, en fonction du piègeur et du radical libre ayant réagi, le couplage hyperfin de l'électron célibataire du radical nitroxy sera également influencé par d'autres noyaux. La structure finale du spectre de l'adduit, c'est-à-dire le nombre de raies hyperfines et la constante de couplage hyperfin, dépend du choix du piègeur et du radical libre à étudier. Dans le cas des nitrosos, le radical piégé se fixe directement sur l'atome d'azote du radical nitroxy. Ainsi, les noyaux du radical possèdent une forte influence sur le spectre de l'adduit et la structure hyperfine est donc fortement caractéristique du radical piégé. Par contre, dans le cas des piègeurs nitrones, le radical est piégé plus loin du radical nitroxy. Par conséquent, les noyaux du piègeur auront une plus grande influence sur le couplage hyperfin que ceux du radical. Le spectre sera donc moins spécifique du radical. [660]

### E.3.4.2 Les critères pour le choix du piègeur de spin

#### 1) La stabilité

Le piégeage de radicaux libres par une molécule diamagnétique a pour but d'augmenter leur temps de vie en formant un composé relativement stable pouvant être observé en RPE. Les adduits de spin formés à partir de piègeurs nitrones sont plus stables que ceux formés à partir de piègeurs nitrosos.

## 2) La réactivité

La réactivité du piègeur de spin est caractérisée par la constante de vitesse de la réaction de piégeage, c'est-à-dire de la formation de l'adduit. Or, les radicaux libres ayant un temps de vie court, les piègeurs doivent avoir une constante de vitesse importante pour arriver à les capturer. De plus, le piègeur doit être compétitif. En effet, dans un échantillon, les radicaux libres peuvent réagir avec d'autres molécules. Ces réactions sont donc en compétition avec la réaction de piégeage. La constante de vitesse de celle-ci doit être supérieure à celle des réactions de compétition pour être efficace.

## 3) La solubilité

Le choix du piègeur dépend de celui du solvant dans lequel se fera la réaction de piégeage. Il doit être soluble dans le solvant (eau, tampon, solvant organique,...) [660]

**E.3.4.3 Le DMPO**

Le DMPO appartenant à la famille des nitrones est un piègeur de spin très réactionnel. Il est un des plus utilisés pour le piégeage de radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle. Le DMPO est soluble en milieu aqueux [668].

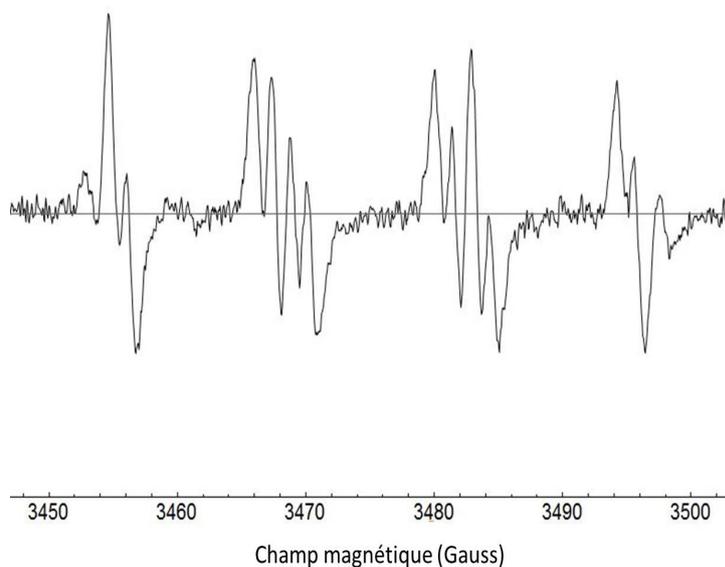


FIGURE E.16 – Spectre de l'adduit de spin DMPO-OOH caractéristique du piégeage de l'anion superoxyde par le DMPO.

La réaction du DMPO avec l'anion superoxyde forme l'adduit de spin DMPO-OOH $\cdot$ . Le radical provoque une rupture homolytique de la liaison  $\pi$  de la double liaison du DMPO. La constante de vitesse de formation de l'adduit est égale à  $10,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [669].

La structure hyperfine du spectre RPE de l'adduit DMPO-OOH $\cdot$  a pour origine l'interaction entre l'électron célibataire et un noyau d'azote ainsi que deux noyaux d'hydrogène. Le noyau d'azote et celui d'hydrogène ont un spin nucléaire non nul et sont caractérisés respectivement par  $I_N = 1$  et  $I_H = \frac{1}{2}$ . Ainsi,  $m_I(\text{N}) = -1, 0, 1$  et  $m_I(\text{H}) = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$ . Les trois noyaux sont

définis par des constantes hyperfines respectives  $a_N = 13,1$  G,  $a_H^\beta = 10,4$  G et  $a_H^\gamma = 1,3$  G. Le spectre RPE du DMPO-OOH $\cdot$  est donc composé de douze raies (figure E.16). [660, 665, 669]

$m_I$ (N)	$m_I$ ( $H^\beta$ )	$m_I$ ( $H^\gamma$ )	$B_{0,R}$	$B_{0,R}$ (Gauss)
1	1/2	1/2	$B_0 - a_N - \frac{a_{H^\beta}}{2} - \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 - 18,95$
1	1/2	-1/2	$B_0 - a_N - \frac{a_{H^\beta}}{2} + \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 - 17,65$
1	-1/2	1/2	$B_0 - a_N + \frac{a_{H^\beta}}{2} - \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 - 8,55$
1	-1/2	-1/2	$B_0 - a_N + \frac{a_{H^\beta}}{2} + \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 - 7,25$
0	1/2	1/2	$B_0 - \frac{a_{H^\beta}}{2} - \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 - 5,85$
0	1/2	-1/2	$B_0 - \frac{a_{H^\beta}}{2} + \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 - 4,55$
0	-1/2	1/2	$B_0 + \frac{a_{H^\beta}}{2} - \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 + 4,55$
0	-1/2	-1/2	$B_0 + \frac{a_{H^\beta}}{2} + \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 + 5,85$
-1	1/2	1/2	$B_0 + a_N - \frac{a_{H^\beta}}{2} - \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 + 7,25$
-1	1/2	-1/2	$B_0 + a_N - \frac{a_{H^\beta}}{2} + \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 + 8,55$
-1	-1/2	1/2	$B_0 + a_N + \frac{a_{H^\beta}}{2} - \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 + 17,65$
-1	-1/2	-1/2	$B_0 + a_N + \frac{a_{H^\beta}}{2} + \frac{a_{H^\gamma}}{2}$	$B_0 + 18,95$

TABLE E.1 – Tableau reprenant le calcul des valeurs du champ magnétique à la résonance  $B_{0,R}$  associées aux douze pics du spectre du DMPO-OOH $\cdot$

## E.4 Modélisation moléculaire - docking

La modélisation moléculaire permet d'étudier l'affinité entre un ligand et un récepteur. Différentes techniques existent en fonction des données de départ utilisées et des informations recherchées. Le *docking* permet notamment d'étudier l'interaction de petites molécules dans un site de liaison d'une cible protéique de structure déterminée. Cette technique permet d'étudier l'insertion du ligand et son orientation dans le site actif en tenant compte de l'environnement d'acides aminés et des différents moyens d'interaction possibles entre eux (interactions de Van der Waals, interactions ioniques, liaisons hydrogène, lipophilie, etc.). Des programmes de *docking* (GOLD, Glide, Autodock) ont été développés pour prédire la position et l'interaction d'un ligand au sein d'un site actif prédéfini dans la structure d'une protéine. Ils proposent différentes conformations protéine/ligand qui minimisent l'énergie du complexe et peuvent, grâce au *scoring*, estimer et comparer l'affinité de liaison entre le ligand et la protéine de chaque conformation. Le *docking* est notamment utilisé pour le criblage virtuel également appelé *virtual screening*. Cette méthode consiste à sélectionner, parmi un large éventail de ligands, ceux présentant le meilleur positionnement et la meilleure probabilité d'interaction dans le site actif d'une protéine donnée. [670, 671]

Il faut garder à l'esprit que le *docking* ne fournit que des prédictions théoriques sur la formation de complexes protéine-ligand. Des approximations réalisées à différents stades du processus (flexibilité de la protéine ou du ligand, présence de molécules d'eau au sein du site actif, sélection des interactions entre le ligand et la protéine) sont à l'origine de la limite de la méthode de modélisation moléculaire. Le *docking* offre une première source d'information qui doit être associée à différentes techniques expérimentales pour évaluer de façon précise l'interaction réelle entre le ligand et la protéine cible. [670, 671]

### E.4.1 Le processus de docking

Afin de pouvoir réaliser le *docking*, la structure de la protéine doit être connue. Pour cela, des bibliothèques de structures protéiques obtenues par cristallographie aux rayons X existent. Parmi ces bases de données, la Protein Data Bank (PDB) [672], créée en 1971, met gratuitement à disposition plus de 200 000 structures de protéines ou de complexes protéine/ligand (juillet 2023). [670, 671]

Le processus de *docking* comporte deux étapes corrélées : l'échantillonnage des conformations du ligand dans le site actif de la protéine cible et le *scoring*, c'est-à-dire l'évaluation de l'affinité de liaison entre le ligand et la protéine dans les différentes configurations proposées par le programme.

Lors de l'échantillonnage, le programme de *docking* place le ligand au sein du site actif dans différentes positions permettant l'interaction entre la molécule et les différents acides aminés du site. Pour chaque configuration, il évalue l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine [673].

Afin de définir cette énergie d'interaction, considérons une solution contenant des protéines P et des ligands L. La liaison entre la protéine et ligand donne un complexe PL.



Lorsque l'équilibre de la réaction est atteint, les concentrations en ligands libres [L], protéines libres [P] et complexes [PL] sont constantes. On peut alors définir la constante d'association de la réaction  $K_a$  :

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}. \quad (\text{E.41})$$

La constante d'association quantifie l'affinité de liaison entre la protéine et le ligand. En effet, plus  $K_a$  est grand, plus la concentration en complexes est importante par rapport aux concentrations en protéines et ligands libres, donc plus grandes sont l'affinité et la stabilité du complexe. Cette constante peut être reliée à la variation d'énergie libre de la réaction entre le ligand et la protéine,  $\Delta G$  :

$$\Delta G = -RT \ln K_a. \quad (\text{E.42})$$

L'énergie libre  $\Delta G$  est égale à la différence d'énergie entre l'état du système où P et L sont liés et l'état du système où P et L sont libres. Elle correspond donc à l'énergie d'interaction entre la protéine et le ligand.[674, 675, 672]

La constante d'association peut être déterminée expérimentalement. Or, elle n'est généralement pas connue car le *docking* est utilisé comme technique théorique préliminaire pour l'étude de l'interaction entre la protéine et le ligand d'intérêt. C'est pourquoi, en pratique, l'énergie  $\Delta G$  est estimée grâce à un modèle mathématique, une somme d'énergies caractéristiques des différentes interactions possibles entre les atomes du ligand et les atomes des acides aminés présents dans le site actif. Ces interactions sont notamment : l'interaction de Van der Waals, l'interaction électrostatique, les liaisons hydrogène. Chaque programme utilise une sélection de ces interactions et permet donc d'obtenir une approximation de l'énergie de liaison du complexe protéine/ligand. [675, 673, 674]

$$\Delta G = E_{vdw} + E_{elec} + E_{pontsH} + \dots \quad (\text{E.43})$$

Afin de pouvoir minimiser l'énergie d'interaction et tendre vers un complexe le plus stable possible, le programme cherche pour chaque configuration les meilleures positions et orientations de la molécule afin de maximiser l'interaction du ligand avec différents acides aminés du site actif. C'est pourquoi il est essentiel de définir la flexibilité aussi bien du ligand que de la protéine avant de procéder à l'échantillonnage. Trois situations sont possibles : le *docking* rigide (la structure de la protéine et du ligand sont rigides), semi-rigide (la structure de la protéine est rigide mais celle du ligand est flexible) et flexible (la structure de la protéine et du ligand sont flexibles). Le *docking* semi-rigide est le plus couramment utilisé car il permet de prendre en compte au moins la flexibilité du ligand et de se rapprocher de la situation réelle d'interaction entre le ligand et la protéine. Tenir compte de la flexibilité de la protéine a longtemps représenté un challenge. C'est pourquoi elle n'était pas considérée. Malgré cela, le *docking* semi-flexible offre tout de même des résultats intéressants. En effet, pour beaucoup de protéines, le site actif est une région relativement rigide. Cependant, afin de pouvoir tenir compte de la flexibilité des acides aminés situés sur la partie extérieure du site actif, différents programmes permettent maintenant d'intégrer (dans une certaine mesure), la flexibilité de la protéine dans les calculs. [670, 671, 675, 673]

Le programme de *docking* fournit finalement un ensemble de solutions, c'est-à-dire de conformations optimisées du complexe. Le programme de modélisation associe à chacune d'entre elles un score grâce à une fonction de *scoring* afin de les classer en fonction de leur stabilité. Dans le cas du *scoring* le plus simple, l'énergie d'interaction estimée  $\Delta G$  est utilisée comme score. D'autres fonctions de *scoring* existent : empirique, à potentiels statistiques, par méthode d'apprentissage,... Le programme de *docking* GOLD utilisé dans le cadre de ce travail met à disposition quatre fonctions de *scoring* différentes. Celle utilisée ici est appelée Goldscore et est basée sur le champ de force suivant [675, 676] :

$$\Delta G = E_{vdw} + E_{elec} + E_{pontsH} + E_{metal} \quad (\text{E.44})$$

où  $E_{vdw}$  est l'énergie d'interaction de Van der Waals,  $E_{elec}$  l'énergie d'interaction électrostatique,  $E_{pontsH}$  l'énergie d'interaction par ponts hydrogène et  $E_{metal}$  l'énergie d'interaction avec un atome métallique. Dans le cas de protéines contenant dans leur site actif une structure porphyrique comme les peroxydases, ce terme permet de tenir compte des éventuelles interactions entre le ligand et le noyau de métal de transition se trouvant au centre de la porphyrine.

L'établissement d'un score est particulièrement intéressant lorsqu'on souhaite réaliser le *docking* d'une série de ligands dans une structure protéique définie et qu'on souhaite comparer leur affinité avec cette protéine afin de pouvoir sélectionner les plus intéressants et poursuivre leur étude via différentes techniques expérimentales.

## Annexe F

# Etude de l'interaction du dérivé quinone du propofol (PPFQ) avec le site actif de la myéloperoxydase par spectroscopie RPE basse température

Le métabolite du propofol, 2,6-diisopropyl-1,4-quinone (PPFQ), agit comme inhibiteur efficace des actions de peroxydase et de chloration de la MPO. L'association des différents résultats obtenus grâce au SIEFED (voir section 4.8.4) et au *docking* (voir section 4.8.1) permet de conclure à l'insertion de la molécule au sein du site actif de l'enzyme et à la formation d'un complexe stable. Afin d'obtenir des résultats complémentaires confirmant cette hypothèse, la spectroscopie RPE a été utilisée. L'étude a été réalisée au Laboratoire de Biophysique et Physique Biomédicale de l'Université d'Anvers sous la direction du Professeur Sabine Van Doorslaer.

Pour étudier la MPO et la formation d'un complexe par spectroscopie RPE, un système de refroidissement à l'hélium doit être associé au spectromètre pour pouvoir atteindre une température de 10 K permettant de refroidir suffisamment l'échantillon (voir annexe E).

Le spectre de l'enzyme native (figure F.1 gauche) est celui d'un système à symétrie rhombique contenant un noyau de fer à l'état *high spin*, caractérisé par les valeurs  $g_z = 6,87$ ,  $g_y = 5,05$  et  $g_x = 1,95$  [677]. Le petit pic observé directement après le pic  $g_y = 5,05$  est dû à la présence d'atomes de fer libres en solution. Ceux-ci peuvent provenir du tampon et/ou de l'enzyme.

L'étude par *docking* de l'interaction du PPFQ avec le site actif de la MPO propose la formation d'un complexe où le cycle du PPFQ est placé parallèlement à l'hème. Cette conformation rend possible la formation d'un pont hydrogène entre l'atome d'oxygène en position para du cycle phénolique de la molécule et le noyau de fer au centre de la porphyrine de l'enzyme. Ce type de complexe est similaire à celui formé par une autre molécule, l'acide salicylhydroxamique, dont l'interaction avec la MPO a été étudiée via *docking* et spectroscopie (RPE et absorption UV-visible) [41, 678, 587]. L'étude RPE a montré que l'interaction de la molécule en tant que ligand dans le site actif de l'enzyme provoque le passage du noyau de fer de l'état *high spin* à l'état *low spin* (voir annexe E). En réalité, le spectre RPE obtenu (figure F.1 droite), similaire à celui présenté dans l'étude de Hori et al. [678], est une combinaison d'un signal *high spin* ( $g_z = 6,84$ ,  $g_y = 5,04$  et  $g_x = 1,95$ ) et *low spin* ( $g_z = 2,66$ ,  $g_y = 2,22$  et  $g_x = 1,8$ ).

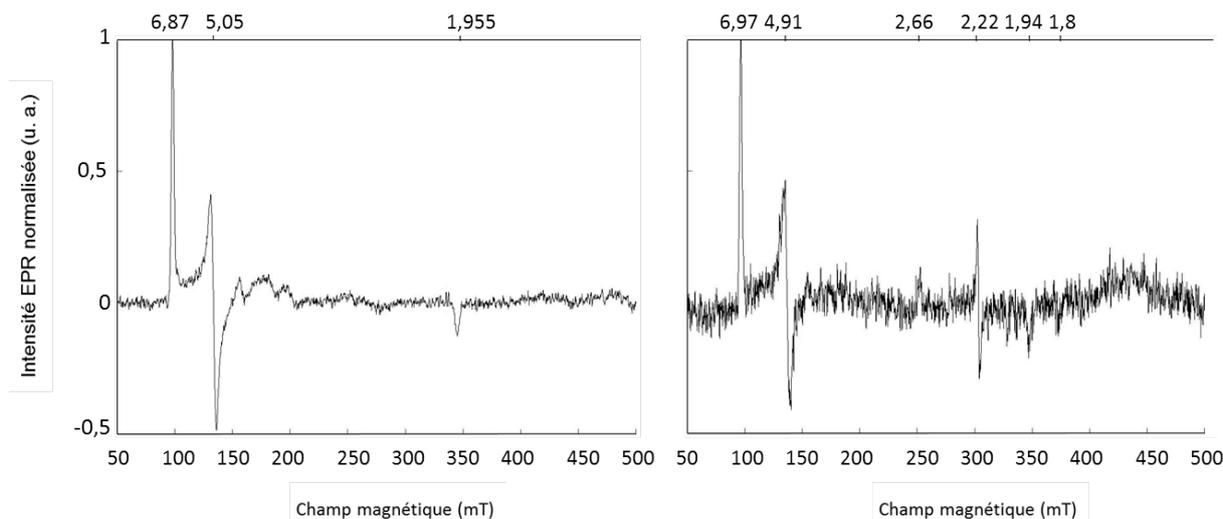


FIGURE F.1 – Gauche : spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,1 mW). Droite : spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) avec un excès d'acide salicylhydroxamique (2,1 mM) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,2 mW).

On peut supposer que l'interaction du PPFQ avec la MPO puisse provoquer le même phénomène sur le spectre RPE de l'enzyme. Cependant, l'ajout d'un excès (100x) de PPFQ n'engendre pas la formation d'un complexe avec un noyau de fer à l'état *low spin* (figure F.2). Cependant, un pic supplémentaire ( $g=2,031$ ) apparaît sur le spectre. Celui-ci n'est pas dû au solvant DMSO, utilisé pour diluer le PPFQ. L'augmentation de la concentration en PPFQ induit l'accroissement de l'intensité du pic, tout comme la diminution de la température (figure F.3 gauche). L'échantillon a ensuite été conservé pendant une semaine dans de l'azote liquide puis un nouveau spectre a été obtenu. Une augmentation très importante de l'intensité du pic à  $g= 2.029$  est observée (figure F.3 droite).

Sur la base de ces résultats, plusieurs hypothèses ont été étudiées pour essayer de comprendre le mécanisme d'action entre le PPFQ et la MPO et l'origine du pic apparaissant sur le spectre RPE. La première étant qu'il ne s'agirait pas d'une interaction directe avec l'enzyme mais bien entre le PPFQ et les atomes de fer libres de la solution. En effet, des quinones sont capables de former des complexes avec le fer [679]. De plus, des complexes mononucléaires de fer donnent des spectres RPE caractérisés par un seul pic situé dans la même gamme de champ magnétique [679, 680]. Un tel phénomène pourrait expliquer l'augmentation du pic observé avec le temps. En effet, la dégradation de l'enzyme au cours du temps provoque la libération du fer dans la solution et celui-ci pourrait interagir avec le PPFQ. La quinone est peut-être susceptible d'aider à l'extraction du fer hors de la porphyrine de la MPO.

Afin de confirmer cette hypothèse, le spectre du fer libre a été obtenu (figure F.4). Le pic observé à  $g=4,22$  correspond bien à celui illustré à la figure F.1 gauche. L'acide salicylique, connu pour former un complexe avec le fer [681], a ensuite été utilisé comme contrôle (figure F.5 gauche). L'augmentation du signal du pic à  $g=4,25$  ainsi que la coloration caractéristique de la solution en violet confirment la formation d'un complexe entre les deux espèces en solution.

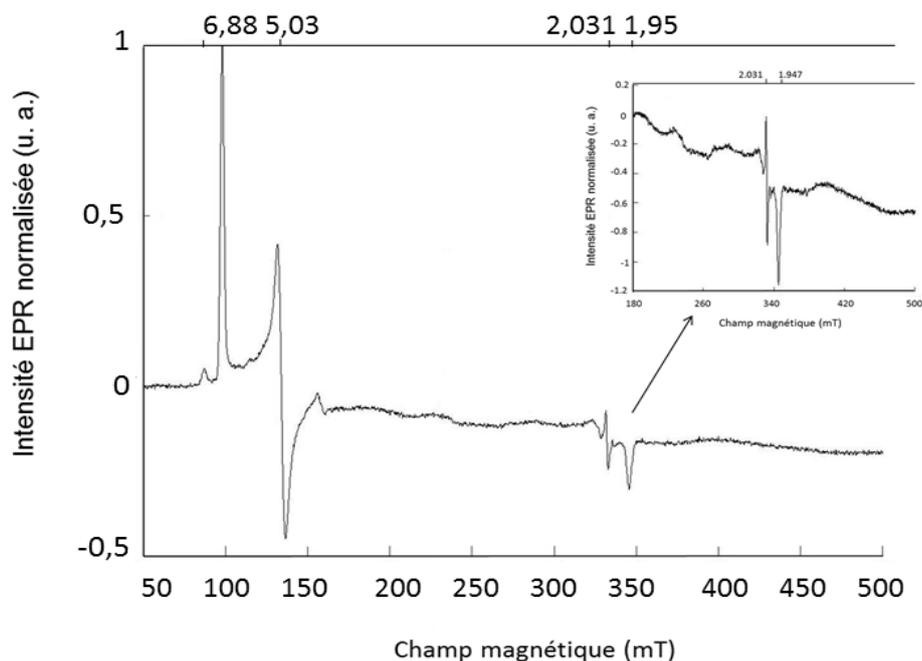


FIGURE F.2 – Spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) avec un excès de PPFQ ( $4,2 \text{ mM}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance :  $0,1 \text{ mW}$ ). Insert : zoom sur la région 180-500 mT.

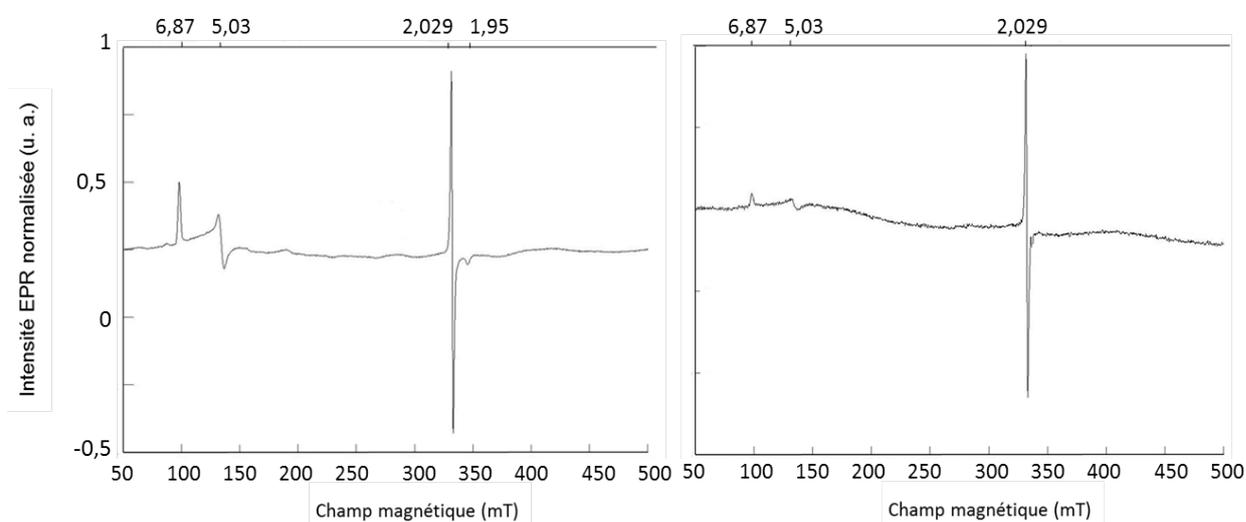


FIGURE F.3 – Gauche : spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) avec un excès de PPFQ ( $4,2 \text{ mM}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 5K (puissance :  $0,1 \text{ mW}$ ). Droite : spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) avec un excès de PPFQ ( $4,2 \text{ mM}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K après une semaine d'incubation dans de l'azote liquide (puissance :  $0,1 \text{ mW}$ ).

L'expérience a été répétée avec le PPFQ (figure F.5 droite). Cependant, aucun pic caractérisant la formation d'un complexe ne peut être observé autour de la valeur de  $g=2,031$ . Par conséquent, le PPFQ n'interagit pas avec les noyaux de fer libres dans la solution.

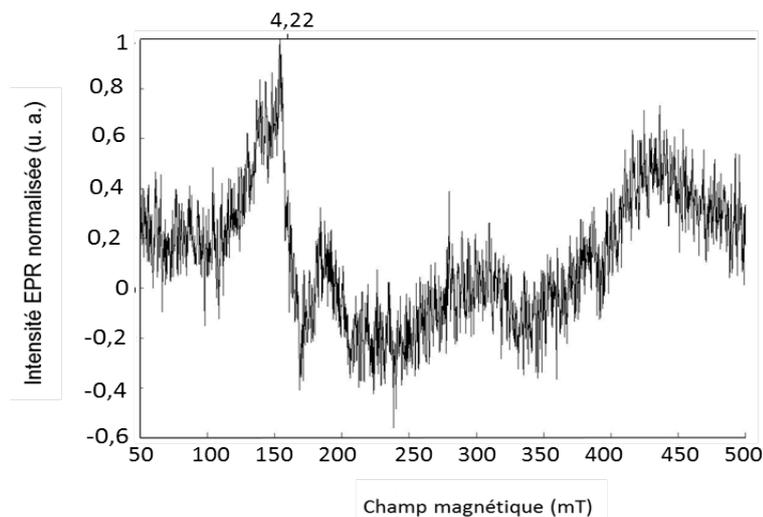


FIGURE F.4 – Spectre RPE du fer libre ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,2 mW).

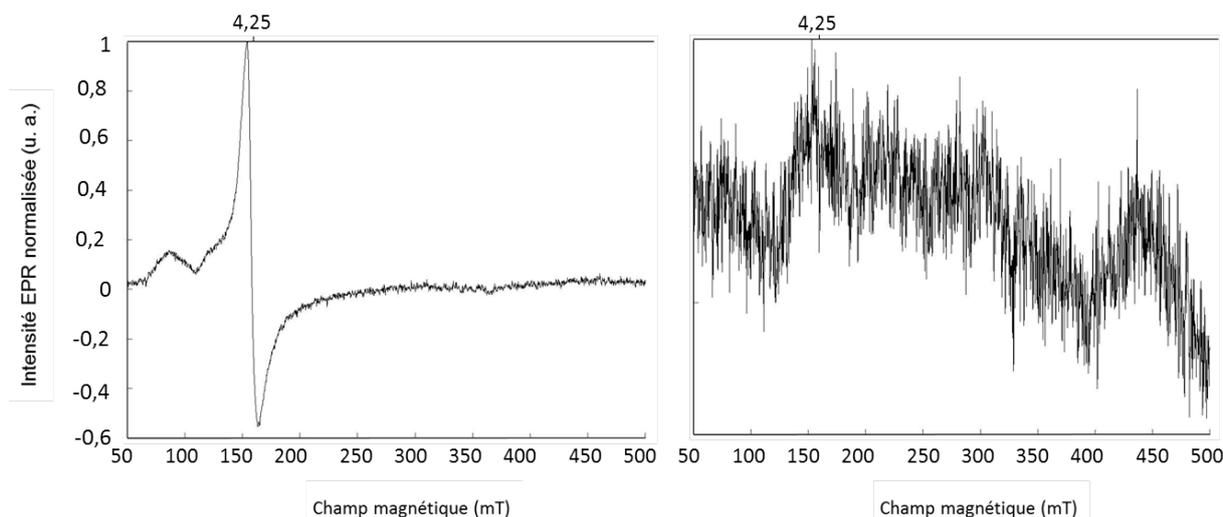


FIGURE F.5 – Gauche : spectre RPE du fer libre ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ ) avec de l'acide salicylique dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,2 mW). Droite : spectre RPE du fer libre ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ ) avec de le PPFQ dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,2 mW).

Une seconde hypothèse a dès lors été investiguée. Le PPFQ pourrait, via son interaction entre un de ses atomes d'oxygène et le fer, jouer le rôle du peroxyde d'hydrogène et former le composé I de l'enzyme. En effet, le spectre RPE du composé I de différents types de peroxydases montre un pic caractérisé par une valeur de  $g \approx 2$ , caractéristique de l'état radicalaire du composé [651, 682, 683]. Pour obtenir le spectre du composé I de la MPO, l'acide paracétic a été utilisé pour remplacer le peroxyde d'hydrogène [651, 684]. Malheureusement aucun signal caractéristique du composé I n'a été observé (figure F.6).

De nouvelles mesures ont été réalisées trois mois plus tard, avec un nouvel échantillon de MPO. Le spectre du mélange MPO-PPFQ a été acquis une nouvelle fois afin de confirmer l'apparition du pic à  $g=2,031$  (figure F.7). La structure apparaissant à  $g=2,057$  est caractéristique d'une contamination au cuivre (II). Celle-ci provient vraisemblablement du nouveau

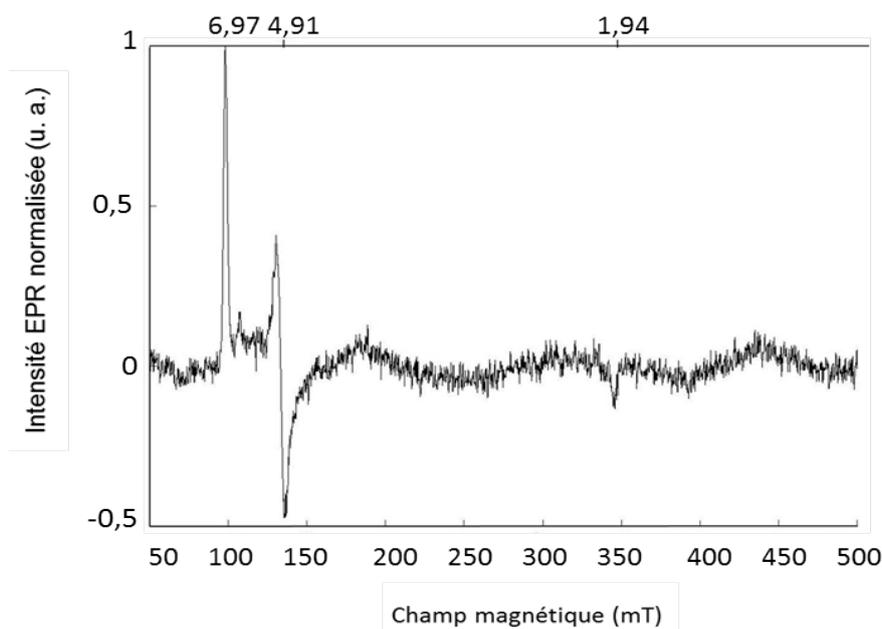


FIGURE F.6 – Spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) avec un excès d'acide paracétolique ( $420 \mu\text{M}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,2 mW).

lot de MPO. Contrairement au premier spectre obtenu (figure F.2), aucun pic à  $g=2,031$  n'est observé. La présence du cuivre interférerait-elle avec l'interaction entre le PPFQ et la MPO ? Le pic observé lors des premières mesures est-il réellement dû à cette interaction, ou correspond-il à un artefact non expliqué ?

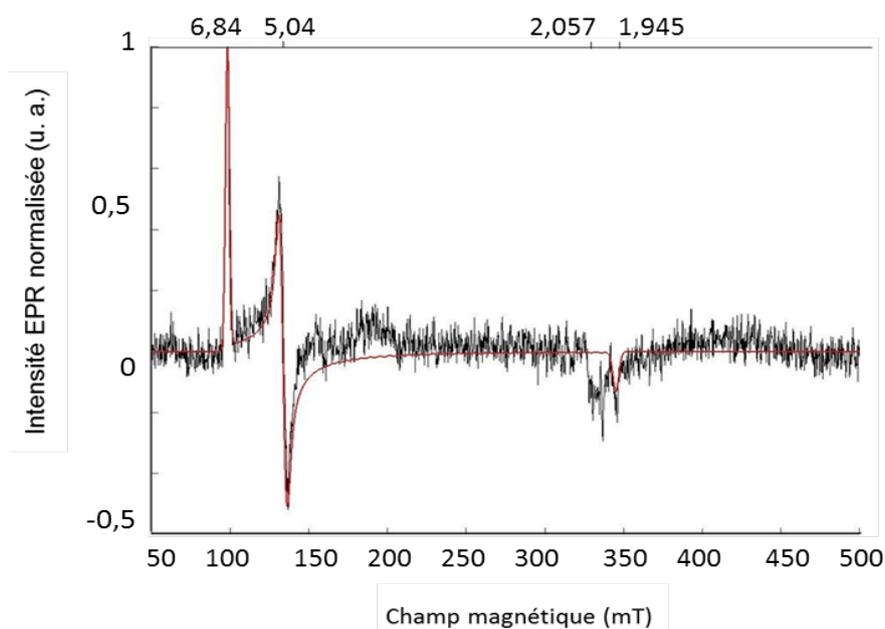


FIGURE F.7 – Spectre RPE de la MPO native ( $42 \mu\text{M}$ ) avec un excès de PPFQ ( $4,2 \text{ mM}$ ) dans du tampon HEPES- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,4 à 10K (puissance : 0,5 mW). La courbe rouge représente la simulation du spectre de l'enzyme native.

Malheureusement, les coûts élevés de l'enzyme et de l'hélium liquide ne nous ont pas permis d'acquérir un nouvel échantillon de MPO et de répéter à nouveau l'analyse du complexe MPO-PPFQ. Par conséquent, les résultats présentés ne permettent pas d'apporter des réponses précises sur le mécanisme d'interaction entre la quinone et l'enzyme ni de faire le lien avec les différents résultats expérimentaux repris dans le chapitre 4





# Bibliographie

- [1] B. Gierlikowska, A. Stachura, W. Gierlikowski, and U. Demkow. Phagocytosis, degranulation and extracellular traps release by neutrophils - the current knowledge, pharmacological modulation and future prospects. *Front. Pharmacol.*, 12 :1–21, 2021.
- [2] Laure Stiel. L’activation des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique. *Thèse de doctorat*, page Université de Strasbourg, 2019.
- [3] N. Borregaard. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33 :657–670, 2010.
- [4] L. Fingerhut, G. Dolz, and N. de Buhr. What is the evolutionary fingerprint in neutrophil granulocytes. *Int. J. Mol. Sc.*, 21 :1–37, 2020.
- [5] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. Neutrophils : molecules, function and pathophysiological aspects. *Biol. Disease*, 80 :617–653, 2000.
- [6] T. N. Mayadas, X. Cullere, and C. A. Lowell. The multifaced functions of neutrophils. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 9 :181–218, 2014.
- [7] H. Lehman and B. H. Segal. The role of neutrophils in host defense and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 145 :1535–1544, 2020.
- [8] S. Lakbakbi. Adhésion et activation des cellules sanguines par une membrane d’hémodialyse (an-69st) : conséquence sur l’expression de facteur tissulaire et la thrombogénicité de la membrane. *Thèse de doctorat*, pages Université de Reims Champagne–Ardenne, 2014.
- [9] V. Jaumouille and C. M. Waterman. Physical constraints and forces involved in phagocytosis. *Front. Immunol*, 12 :1–20, 2020.
- [10] J. Westman, S. Grinstein, and P. E. Marques. Phagocytosis of necrotic debris at sites of injury and inflammation. *Front. Immunol*, 10 :1–18, 2020.
- [11] K. B. M’Barek. Adhésion et phagocytose de gouttes d’émulsions fonctionnalisées. *Thèse de doctorat*, page Université Pierre et Marie Curie, 2015.
- [12] P. Lacy. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2 :98–108, 2006.
- [13] K. R. Eichelberger and W. E. Goldman. Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy. *PLoS Pathogens*, 16 :1–7, 2020.
- [14] M. Metzemaekers, M. Gouwy, and P. Proost. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease : double-edged swords. *Cellular and Molecular Immunology*, 17 :433–450, 2020.
- [15] H. L. Damascena, W. A. A. Silveira, M. S. Castro, and W. Fontes. Neutrophil activated by the famous and potent pma (phorbol myristate acetate). *Cells*, 11 :1–19, 2022.

- 
- [16] V. Granger, L. de Chaisemartin, and S. Chollet-Martin. La pêche miraculeuse des filets du neutrophile. *Médecine/Sciences*, 30 :544–549, 2014.
- [17] M. Gonzalez-Aparicio and C. Alfaro. Influence of interleukin-8 and neutrophil extracellular trap (net) formation in the tumor microenvironment : Is there a pathogenic role? *J. Immunol. Res.*, 2019 :1–7, 2019.
- [18] N. de buhr and M. von Köckritz-Blickwede. How neutrophil extracellular traps become visible. *J. Immun. Res.*, pages 1–13, 2016.
- [19] B. M. Babior, J. T. Curnutte, and B. J. McMurrich. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J. Clin. Invest.*, 58 :989–996, 1976.
- [20] S. Dupré-Crochet, M. Erard, and O. Nüsse. Ros production in phagocytes : why, when, and where? *J. Leuk. Biol.*, 94 :657–670, 2013.
- [21] J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli, J.-C. Marie, M.-A. Gougerot-Pocidalo, and P. M.-C. Dang. Priming of the neutrophil respiratory burst : role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.*, 273 :180–193, 2016.
- [22] M. T. Quinn and K. A. Gauss. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase : comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leuk. Biol.*, 76 :760–781, 2004.
- [23] A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S. M. E. Smith, and F. Fieschi. Nadph oxidases (nox) : an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. *Antioxidants*, 10 :1–55, 2021.
- [24] S. A. Belambri, L. Rolas, H. Raad, M. Hurtado-Nedelec, P. M.-C. Dang, and J. El-Benna. Nadph oxidase activation in neutrophils : Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.*, 48 :1–9, 2018.
- [25] P. V. Vignais. The superoxide-generating nadph oxidase : structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59 :1428–1459, 2002.
- [26] J. El-Benna, P. M.-C. Dang, and M.-A. Gougerot-Pocidalo. Priming of the neutrophil nadph oxidase activation : role of p47phox phosphorylation and nox2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol*, 30 :279–289, 2008.
- [27] C. Guichard, E. Pedruzzi, M. Fay, S. B. Mkaddem, N. Coant, F. Daniel, and E. Ogier-Denis. Les nox/duos : une nouvelle famille de nadph oxydases. *Med Sci (Paris)*, 22 :953–960, 2006.
- [28] E. Pick. Role of the rho gtpase rac in the activation of the phagocyte nadph oxidase - outsourcing a key task. *small GTPases*, 5 :1–23, 2014.
- [29] A. Ulfig and L. I. Leichert. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell. Mol. Life Sc.*, 78 :385–414, 2021.
- [30] J. Haleng, J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier, and J. P. Chapelle. Le stress oxydant. *Rev. Med. Liège*, 62 :628–638, 2007.
- [31] C. Migdal and M. Serres. Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Med. Sci. (Paris)*, 27 :405–412, 2011.
- [32] S. J. Klebanoff, A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn, and W. M. Nauseef. Myeloperoxidase : a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leuk. Biol.*, 93 :185–198, 2013.

- [33] M. J. Davies and C. L. Hawkins. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. *Antioxidants and redox signaling*, 32 :957–981, 2020.
- [34] D. Serteyn, S. Grulke, T. Franck, A. Mouithys-Mickalad, and G. Deby-Dupont. La myéloperoxydase des eutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét.*, 147 :79–93, 2003.
- [35] G. Deby and C. Deby. *Cours sur le métabolisme de l'Oxygène en situations normales et pathologiques*. Livre en cours de rédaction, 2023.
- [36] M. Zamocky, C. Jakopitsch, P. G. Furtmüller, C. Dunand, and C. Obinger. The peroxidase-cyclooxygenase superfamily : reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins*, 72 :589–605, 2008.
- [37] W. M. Nauseef. Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 642 :1–9, 2018.
- [38] L. V. Forbes, T. Sjögren, F. Auchère, D. W. Jenkins, B. Thong, D. Laughton, P. Hemsley, G. Pairaudeau, R. Turner, H. Eriksson, J. F. Unitt, and A. J. Kettle. Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. *J. Biol. Chem.*, 288 :36636–36647, 2013.
- [39] K. T. Yue, K. L. Taylor, J. M. Kinkade Jr., R. B. Sinclair, and L. S. Powers. X-ray absorption and resonance raman spectroscopy of human myeloperoxidase at neutral and acid pH. *Biochim. Biophys. Acta*, 1338 :282–294, 1997.
- [40] M. Zderbauer, W. Jantschko, K. Neugschwandtner, C. Jakopitsch, N. Moguevsky, C. Obinger, and P. G. Furtmüller. Role of the covalent glutamic acid-242-heme linkage in the formation and reactivity of redox intermediates of human myeloperoxidase. *Biochemistry*, 44 :6482–6491, 2005.
- [41] E. Malle, P. G. Furtmüller, W. Sattler, and C. Obinger. Myeloperoxidase ; a target for new drug development ? *Brit. J. Pharmacol.*, 152 :838–854, 2007.
- [42] D. R. Ramos, M. V. Garcia, M. Canle L., J. A. Santaballa, P. G. Furtmüller, and C. Obinger. Myeloperoxidase-catalyzed chlorination : The quest for the active species. *J. Inorg. Biochem.*, 102 :1300–1311, 2008.
- [43] S. Galijasevic. The development of myeloperoxidase inhibitors. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 29 :1–7, 2019.
- [44] J. Zeng and R. E. Fenna. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 226 :185–207, 1992.
- [45] M. C. M. Vissers, A. J. Kettle, and M. B. Hampton. Hydrogen peroxide metabolism in health and disease. *CRC Press, Taylor and Francis*, pages 281–303, 2018.
- [46] A. Nicolussi, M. Auer, B. Secnikar, M. Paumann-Page, V. Pfanzagl, M. Zamocky, S. Hofbauer, P. G. Furtmüller, and C. Obinger. Posttranslational modification of heme in peroxidases - impact on structure and catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 643 :14–23, 2018.
- [47] G. Battistuzzi, M. Bellei, M. Zderbauer, P. G. Furtmüller, M. Sola, and C. Obinger. Redox thermodynamics of the Fe(III)/Fe(II) couple of human myeloperoxidase in its high-spin and low-spin forms. *Biochemistry*, 45 :12750–12755, 2006.
- [48] P. G. Furtmüller, U. Burner, and C. Obinger. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry*, 37 :17923–17930, 1998.

- [49] A. R. J. Bakkenist, J. E. G. De Boer, H. Plat, and R. Wever. The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reactions. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymology*, 613 :337–348, 1980.
- [50] P. G. Furtmüller, C. Obinger, Y. Hsuanyu, and H. B. Dunford. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *Eur. J. Biochem.*, 267 :5858–5864, 2000.
- [51] T. J. Fielder, C. A. Davey, and R. E. Fenna. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 275 :11964–11971, 2000.
- [52] J. Arnold, P. G. Furtmüller, and C. Obinger. Redox properties of myeloperoxidase. *Redox Report*, 8 :179–186, 2003.
- [53] P. G. Furtmüller, J. Arnhold, W. Jantschko, H. Pichler, and C. Obinger. Redox properties of the couples compound i/compound ii and compound ii/native enzyme of human myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 301 :551–557, 2003.
- [54] I. I. Vlasova, J. Arnold, A. N. Osipov, and O. M. Panasencko. pH-dependent regulation of myeloperoxidase activity. *Biochemistry (Moscow)*, 71 :667–677, 2006.
- [55] J. M. Pullar, M. C. M. Vissers, and C. C. Winterbourn. Living with a killer : The effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *Life*, 50 :259–266, 2000.
- [56] D. I. Pattison and M. J. Davies. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem. Res. Toxicol.*, 14 :1453–1464, 2001.
- [57] C. L. Hawkins, D. I. Pattison, and M. J. Davies. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino acids*, 25 :259–274, 2003.
- [58] J. P. Henderson, J. Byun, J. Takeshita, and J. W. Heinecke. Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human inflammatory tissue. *J. Biol. Chem.*, 278 :23522–23528, 2003.
- [59] C. Badouard, M. Masuda, H. Nishino, J. Cadet, A. Favier, and J.-L. Ravanat. Detection of chlorinated dna and rna nucleoside by hplc coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *J. Chromato. B*, 827 :26–31, 2005.
- [60] J. B. Sampson, Y.Z. Ye, H. Rosen, and J. S. Beckman. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 356 :207–213, 1998.
- [61] F. Yamakura and K. Ikeda. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric oxide*, 14 :152–161, 2006.
- [62] M. Paumann-Page, P. G. Furtmüller, S. Hofbauer, L. N. Paton, C. Obinger, and A. J. Kettle. Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 539 :51–62, 2013.
- [63] L. A. Marquez and H. B. Dunford. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds i and ii. *J. Biol. Chem.*, 270 :30434–30440, 1995.
- [64] C. C. Winterbourn and A. J. Kettle. Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products. *Prot. Struct. Funct. Genet.*, 57 :31–33, 2004.
- [65] A. J. Kettle, R. F. Anderson, M. B. Hampton, and C. C. Winterbourn. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry*, 46 :4888–4897, 2007.

- [66] D. I. Pattison, C. L. Hawkins, and M. J. Davies. What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? a kinetic modeling approach. *Chem. Res. Toxicol.*, 22 :807–817, 2009.
- [67] E. Malle, G. Marsche, J. Arnold, and M. Davies. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids*, 1761 :392–415, 2006.
- [68] Y. Kato. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates : formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 58 :99–104, 2016.
- [69] L. Vanhamme, K. Z. Boudjeltia, P. Van Antwerpen, and C. Delporte. The other myeloperoxidase : Emerging functions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 649 :1–14, 2018.
- [70] J. P. Gaut, J. Byun, H. D. Tran, W. M. Lauber, J. A. Carrol, R. S. Hotchkiss, A. Be-laouaj, and J. W. Heinecke. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J. Clin. Invest.*, 109 :1311–1319, 2002.
- [71] C. J. van Dalen, C. C. Winterbourn, R. Senthilmohan, and A. J. Kettle. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 275 :11638–11644, 2000.
- [72] J. Soubhye, P. Van Antwerpen, and F. Dufrasne. A patent review of myeloperoxidase inhibitors for treating chronic inflammatory syndromes (focus on cardiovascular diseases, 2013-2019). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30 :595–608, 2020.
- [73] C. M. Spickett, A. Jerlich, O. M. Panasenko, J. Arnhold, A. R. Pitt, T. Stelmaszynska, and R. J. Schaur. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 47 :889–899, 2000.
- [74] A. C. Carr, J. J. M. van den Berg, and C. C. Winterbourn. Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 332 :63–69, 1996.
- [75] C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, J. H. Livesey, and A. J. Kettle. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome. *J. Biol. Chem.*, 281 :39860–39869, 2006.
- [76] A. J. Kettle and C. C. Winterbourn. Myeloperoxidase : a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Report*, 3 :3–15, 1997.
- [77] P. Cech and R. I. Lehrer. Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood*, 63 :88–95, 1984.
- [78] H. Parker, A. M. Albrett, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourne. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J. Leuk. Biol.*, 91 :369–376, 2012.
- [79] C. C. King, M. M. Jefferson, and E. L. Thomas. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leuc. Biol.*, 61 :293–302, 1997.
- [80] S. Baldus, J. P. Eiserich, A. Mani, L. Castro, M. Figueroa, P. Chumley, W. Ma, A. Tousse, C. R. White, D. C. Bullard, M.-L. Brennan, A. J. Lusis, K. P. Moore, and B. A. Freeman. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ecm proteins as targets of tyrosine nitration. *J. Clin. Invest.*, 108 :1759–1770, 2001.
- [81] E. Malle, G. Marsche, U. Panzenboeck, and W. Sattler. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins : fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 445 :245–255, 2006.

- [82] A. Hammer, G. Desoye, G. Dohr, W. Sattler, and E. Malle. Myeloperoxidase-dependent generation of hypochlorite-modified proteins in human placental tissues during normal pregnancy. *Lab. Invest.*, 81 :543–554, 2001.
- [83] H.-J. Gröne, E. F. Gröne, and E. Malle. Immunohistochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis. *Lab. Invest.*, 82 :5–14, 2002.
- [84] B. D’autréaux and M. B. Toledano. Ros as signalling molecules : mechanisms that generate specificity in ros homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 :813–824, 2007.
- [85] T. Fukai and M. Ushio-Fukai. cross-talk between nadph oxidase and mitochondria : role in ros signaling and angiogenesis. *Cells*, 9 :1–17, 2020.
- [86] J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux, and J.-O. Defraigne. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 :233–239, 2002.
- [87] X. Leverage. Stress oxydant et antioxydants? *Cahier de nutrition et de diététique*, 44 :219–224, 2009.
- [88] V. I. Lushchak. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem.-Biol. Inter.*, 224 :164–175, 2014.
- [89] L. K. Stamp, I. Khalilova, J. M. Tarr, R. Senthilmohan, R. Turner, R. C. Haigh, P. G. Winyard, and A. J. Kettle. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51 :1796–1803, 2012.
- [90] J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova, and K. D. Tew. Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, 38 :167–197, 2020.
- [91] A. J. Kattoor. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr. Athero. Reports*, 19 :1–11, 2017.
- [92] C. Pereira, D. Gracio, J. P. Trixeira, and F. Magro. Oxidative stress and dna damage : Implications in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21 :2403–2417, 2015.
- [93] R. P. Bowler and J. D. Crapo. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 110 :349–356, 2002.
- [94] P. Andrieux, C. Chevillard, E. Cunha-Neto, and J. P. Silva Nunes. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation. *Int. J. Mol. Sc.*, 22 :1–29, 2021.
- [95] T. Wang, D. Palucci, K. Law, B. Yanagawa, J. Yam, and J. Butany. Atherosclerosis : pathogenesis and pathology. *Diag. Histopathol.*, 18 :461–467, 2012.
- [96] C. Bergt, S. Pennathur, F. Xu, J. Byun, K. O’Brien, T. O. McDonald, P. Singh, G. M. Anantharamaiah, A. Chait, J. Brunzell, R. L. Geary, J. F. Oram, and J. W. Heinecke. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes hdl in the human artery wall and impairs abca1-dependent cholesterol transport. *PNAS*, 101 :13032–13037, 2004.
- [97] S. J. Nicholls and S. L. Hazen. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J. Lipid. Res.*, 50 :346–351, 2009.
- [98] S. J. Nicholls and S. L. Hazen. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Art. Thromb. Vasc. Biol.*, 25 :1102–1111, 2005.
- [99] L. Yvan-Charvet, N. Wang, and A. R. Tall. Role of hdl, abca1, and abcg1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Art. thromb. Vasc. Biol.*, 30 :139–143, 2010.
- [100] J. M. A. Delou, A. G. Lopes, and M. A. M. Capella. Role of abc transporters in cardiovascular diseases. *Valves and Chambers, The J. Card.*, 1 :1–10, 2009.

- [101] D. S. Leake. Does an acidic pH explain why low density lipoprotein is oxidised in atherosclerotic lesions? *Atherosclerosis*, 129 :149–157, 1997.
- [102] O. Gach, J. Magne, T. Franck, S. Derochette, G. Deby, D. Serteyn, J. O. Defraigne, P. Lancellotti, V. Legrand, and L. A. Pierard. Clinical significance of active myeloperoxidase in carotid atherosclerosis plaques. *Int. J. Cardio.*, 152 :149–151, 2011.
- [103] N. Teng, G. J. Maghzal, J. Talib, I. Rashid, A. K. Lau, and R. Stocker. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep.*, 22 :51–73, 2017.
- [104] R. K. Schindhelm, L. P. van der Zwan, T. Teerlink, and P. G. Scheffer. Myeloperoxidase : a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin. Chem.*, 55 :1462–1470, 2009.
- [105] C. G. B. Peterson, P. Sangfelt, M. Wagner, T. Hansson, H. Lettesjö, and M. Carlson. Fecal levels of leukocyte markers reflect disease activity in patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 67 :810–820, 2007.
- [106] B. Chami, N. J. J. Martin, J. M. Dennis, and P. K. Witting. Myeloperoxidase in the inflamed colon : A novel target for treating inflammatory bowel disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 645 :61–71, 2018.
- [107] F. A. Moura, K. Queiroz de Andrade, J. C. Farias dos Santos, O. R. Pimentel Araujo, and M. O. F. Goulart. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease : Does it work? *Redox. Biology*, 6 :617–639, 2015.
- [108] <https://www.erasme.ulb.ac.be/fr/services-de-soins/services-medicaux/rhumatologie/clinique-de-l-arthrite-precoce-et-de-la>. *Site internet de l'Hôpital Erasme ULB*, Juillet 2023.
- [109] H. L. Wright, M. Lyon, E. A. Chapman, R. J. Moots, and S. W. Edwards. Rheumatoid arthritis synovial fluid neutrophils drive inflammation through production of chemokines, reactive oxygen species, and neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 11 :1–14, 2021.
- [110] S. W. Edwards, V. Hughes, J. Barlow, and R. Bucknall. Immunological detection of myeloperoxidase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. J.*, 250 :81–85, 1988.
- [111] G. Multhoff, M. Molls, and J. Radons. Chronic inflammation in cancer development. *Front. Immunol.*, 2 :1–17, 2012.
- [112] B. B. Aggarwal, R. V. Vijayalekshmi, and B. Sung. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer : Short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res.*, 15 :425–430, 2009.
- [113] N. Singh, D. Baby, J. J. P. Rajguru, P. B. Patil, S. S. Thakkannavar, and V. B. Pujari. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.*, 18 :121–126, 2019.
- [114] D. Rubin, A. Shaker, and M. S. Levin. Chronic intestinal inflammation : inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front. Immunol.*, 3 :1–10, 2012.
- [115] B. B. Aggarwal, B. Sung, and S. C. Gupta. Inflammation and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 816 :Springer, 2014.
- [116] S. Suman, P. K. Sharma, G. Rai, S. Mishra, D. Arora, P. Gupta, and Y. Shukla. Current perspectives of molecular pathways involved in chronic inflammation-mediated breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 472 :401–409, 2016.

- [117] G. Lee, T. C. Walser, and S. M. Dubinett. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Curr. Op. Pulm. Med.*, 14 :303–307, 2009.
- [118] M. Karin, T. Lawrence, and V. Nizet. Innate immunity gone awry : Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124 :823–835, 2006.
- [119] T. Hagermann, F. Balkwill, and T. Lawrence. Inflammation and cancer : a double-edged sword. *Cancer Cell*, 12 :300–301, 2007.
- [120] S. Shalapour and M. Karin. Pas de deux : Control of anti-tumor immunity by cancer-associated inflammation. *Immunity*, 51 :15–26, 2019.
- [121] H. F. Dvorak. Tumors : wound that do not heal - redux. *Cancer Immunol. Res.*, 3 :1–11, 2015.
- [122] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140 :883–899, 2010.
- [123] S. B. Coffelt, M. D. Wellenstein, and K. E. de Visser. Neutrophils in cancer : neutral no more. *Nature Reviews cancer*, 16 :431–446, 2016.
- [124] T. Németh, M. Sperandio, and A. Mocsai. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature reviews drug discovery*, 19 :253–275, 2020.
- [125] P. Valadez-Cosmes, S. Raftopoulou, Z. N. Mihalic, G. Marsche, and J. Kargl. Myeloperoxidase : Growing importance in cancer pathogenesis and potential drug target. *Pharmacol. Therapeut.*, 236 :1–16, 2022.
- [126] U. S. Srinivas, B. W. Q. Tan, B. A. Vellayappan, and A. D. Jeyasekharan. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.*, 25 :1–9, 2019.
- [127] N. Güngör, A. M. Knaapen, A. Munnia, M. Peluso, G. R. Haenen, R. K. Chiu, R. W. L. Godschalk, and F. J. van Schooten. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 25 :149–154, 2010.
- [128] T. Nybo, S. Dietrich, L. Gamon, C. Y. Chuang, A. Hammer, G. Hoegler, E. Malle, A. Rogowska-Wrzesinska, and M. J. Davies. Chlorination and oxidation of the extracellular matrix protein laminin and basement membrane extracts by hypochlorous acid and myeloperoxidase. *Redox. Biol.*, 20 :496–513, 2019.
- [129] H. Cai, C. Y. Chuang, C. L. Hawkins, and M. J. Davies. Binding of myeloperoxidase to the extracellular matrix of smooth muscle cells and subsequent matrix modification. *Sci. Rep.*, 10 :1–13, 2020.
- [130] V. Panagopoulos, D. A. Leach, I. Zinonos, V. Ponomarev, G. Licari, V. Liapis, W. V. Ingman, P. Anderson, M. O. DeNichilo, and A. Evdokiou. Inflammatory peroxidases promote breast cancer progression in mice via regulation of the tumour microenvironment. *Int. J. Onc.*, 50 :1191–1200, 2017.
- [131] <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/sepsis-septicemie>. *Site internet de l'Institut Pasteur*, Septembre 2021.
- [132] K. A. Brown, S. D. Brain, J. D. Pearson, J. D. Edgeworth, S. M. Lewis, and D. F. Treacher. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*, 368 :157–169, 2006.
- [133] A. C. Carr, E. Spencer, T. S. Hoskin, P. Rosengrave, A. J. Kettle, and G. Shaw. Circulating myeloperoxidase is elevated in septic shock and is associated with systemic organ failure and mortality in critically ill patients. *Free Rad. Biol. Med.*, 152 :462–468, 2020.

- [134] I. T. Schrijver, H. Kemperman, M. Roest, J. Kesecioglu, and D. W. de Lange. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious sirs and predicts mortality in intensive care patients with sirs. *Int. Care Med. Exp.*, 5 :1–9, 2017.
- [135] Y. Maruchi, M. Tsuda, H. Hori, N. Takenada, T. Gocho, M. A. Huq, and N. Takeyama. Plasma myeloperoxidase-conjugated dna level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Critical Care*, 22 :2–10, 2018.
- [136] B. Rossi, G. Constantin, and E. Zenaro. The emerging role of neutrophils in neurodegeneration. *Immunobiology*, 225 :1–18, 2020.
- [137] D. L. Lefkowitz and S. S. Lefkowitz. Microglia and myeloperoxidase : a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free. Rad. Biol. Med.*, 45 :726–731, 2008.
- [138] R. S. Ray and A. Katyal. Myeloperoxidase : Bridging the gap in neurodegeneration. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 68 :611–620, 2016.
- [139] P. S. Green, A. J. Mendez, J. S. Jacod, J. R. Crowley, W. Growdon, B. T. Hyman, and J. W. Heinecke. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in alzheimer’s disease. *J. Neurochem.*, 90 :724–733, 2004.
- [140] D.-K. Choi, S. Pennathur, C. Perier, K. Tieu, P. Teismann, D.-C. Wu, V. Jackson-Lewis, M. Vila, J.-P. Vonsattel, J. W. Heinecke, and S. Przedborski. Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of parkinson’s disease in mice. *J. Neurosc.*, 25 :6594–6600, 2005.
- [141] E. Gray, T. L. Thomas, S. Betmouni, and N. Scolding S. Love. Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis. *Neurosc. Lett.*, 444 :195–198, 2008.
- [142] I. Astuti and Ysrafil. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2) : An overview of viral structure and host response. *Diab. Met. Synd. : Clin. Res. Rev.*, 14 :407–412, 2020.
- [143] B. Tomar, H.-J. Anders, J. Desai, and S. R. Mulay. Neutrophils and neutrophil extracellular traps drive necroinflammation in covid-19. *Cells*, 9 :1–8, 2020.
- [144] N. Reusch, E. De Domenico, L. Bonaguro, J. Schulte-Schrepping, K. Bassler, J. L. Schultze, and A. C. Aschenbrenner. Neutrophils in covid-19. *Front. Immunol.*, 12 :1–9, 2021.
- [145] P. T. Goud, D. Bai, and H. M. Abu-Soud. A multiple-hit hypothesis involving reactive oxygen species and myeloperoxidase explains clinical deterioration and fatality in covid-19. *Front. Immunol.*, 17 :62–72, 2021.
- [146] I. Aldib, J. Soubhye, K. Z. Boudjeltia, M. Vanhaeverbeek, A. Rousseau, P. G. Furtmüller, C. Obinger, F. Dufrasne, J. Nève, P. Van Antwerpen, and M. Prévost. Evaluation of new scaffolds of myeloperoxidase inhibitors by rational design combined with high-throughput virtual screening. *J. Med. Chem.*, 55 :7208–7218, 2012.
- [147] J. Nève, N. Parij, and N. Moguilevsky. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *Eur. J. Pharmacol.*, 417 :37–43, 2001.
- [148] T. Franck, I. Aldib, K. Z. Boudjeltia, P. G. Furtmüller, C. Obinger, P. Neven, M. Prévost, J. Soubhye, P. Van Antwerpen, A. Mouithys-Mickalad, and D. Serteyn. The soluble curcumin derivative nds27 inhibits superoxide anion production by neutrophils and acts as substrate and reversible inhibitor of myeloperoxidase. *Chem.-Biol. Interac.*, 297 :34–43, 2019.

- [149] U. Burner, W. Jantschko, and C. Obinger. Kinetics of oxidation of aliphatic and aromatic thiols by myeloperoxidase compounds i and ii. *FEBS Letters*, 443 :290–296, 1999.
- [150] C. Deby J. Pincemail, A. Thirion, M. de Bruyn-Dister, and R. Goutier. Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin. comparison with three related compounds. *Experientia*, 44 :450–453, 1988.
- [151] Y. shiba, T. Kinoshita, H. Chuman, Y. Taketani, E. Takeda, Y. Kato, M. Naito, K. Kawabata, A. Ishisaka, J. Terao, and Y. Kawai. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase : molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem. Res. Toxicol*, 21 :1600–1609, 2008.
- [152] I. Aldib, M. Gelbcke an J. Soubhye, M. Prévost, P. G. Furtmüller, C. Obinger, B. Elfving, I. Chikh Alard, G. Roos, C. Delporte, G. Berger, D. Dufour, K. Z. Boudjeltia, J. Nève, F. Dufrasne, , and P. Van Antwerpen. Novel bis-arylalkylamines as myeloperoxidase inhibitors : Design, synthesis, and structure-activity relationship study. *Eur. J. Med. Chem.*, 123 :746–762, 2016.
- [153] S. Bensalem, J. Soubhye, I. Aldib, L. Bournine, A. T. Nguyen, M. Vanhaeverbeek, A. Rousseau, K. Z. Boudjeltia, A. Sarakbi, J. M. Fauffmann, J. Nève, M. Prévost, C. Stévigny, F. Maiza-Benabdesselman, F. Bedjou, P. Van Antwerpen, and P. Duez. Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of peganum harmala l. (zygophyllaceae). *J. Ethnopharma.*, 154 :361–369, 2014.
- [154] N. Lu, Y. Sui, R. Tian, and Y.-Y. Peng. Inhibitive effects of quercetin on myeloperoxidase-dependent hypochlorous acid formation and vascular endothelial injury. *J. Agri. Food Chem.*, 66 :4933–4940, 2018.
- [155] A. Rivera-Antonio, M. C. Rosales-Hernandez, I. Balbuena-Rebolledo, J. M. Santiago-Quintana, J. E. Mendieta-Wejebe, J. Correa-Basurto, J. B. Garcia-Vasquez, E. V. Garcia-Baez, and I. I. Padilla-Martinez. Myeloperoxidase inhibitory and antioxidant activities of (e)-2-hydroxy-alpha-aminocinnamic acids obtained through microwave-assisted synthesis. *Pharmaceuticals*, 14 :1–19, 2021.
- [156] C. H. Hu, M. W. Neissel Valente, O. Scott Halpern, S. Jusuf, J. A. Khan, G. A. Locke, G. J. Duke, X. Liu, F. J. Duclos, R. R. Wexler, E. K. Kick, and J. M. Smallheer. Small molecule and macrocyclic pyrazole derived inhibitors of myeloperoxidase (mpo). *Bioorg. Medic. Chem. Lett.*, 42 :1–8, 2021.
- [157] J. Soubhye, F. Meyer annd P. Furtmümmer, C. Obinger, F. Dufrasne, and P. Van Antwerpen. Characterization of chemical features of potent myeloperoxidase inhibitors. *Fut. Med. Chem.*, 8 :1–19, 2016.
- [158] S. Galijasevic, I. Abdulhamid, and H. M. Abu-Soud. Potential role of tryptophan and chloride in the inhibition of human myeloperoxidase. *Free. Rad. Biol. Med.*, 44 :1570–1577, 2008.
- [159] S. Galijasevic, I. Abdulhamid, and H. M. Abu-Soud. Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase. *Biochemistry*, 47 :2668–2677, 2008.
- [160] W. Jantschko, P. G. Furtmüller, M. Zedebauer, K. Neugschwandtner, I. Lehner, C. Jakopitsch, J. Arnhold, and C. Obinger. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. *Biochem. Pharmacol.*, 69 :1149–1157, 2005.
- [161] T. Franck, A. Mouithys-Mickalad, T. Robert, G. Ghitti, G. Deby-Dupont, P. Neven, and D. Serteyn. Differentiation between stoichiometric and anticatalytic antioxidant

- properties of benzoic acid analogues : A structure/redox potential relationship study. *Chem.-Biol. Inter.*, 206 :194–203, 2013.
- [162] A. J. Kettle, C. A. Gedye, and C. C. Winterbourn. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochem. J.*, 321 :503–508, 1997.
- [163] A.-K. Tidén, T. Sjörgen, M. Svensson, A. Bernlind, R. Senthilmamohan, F. Auchère, H. Norman, P.-O. Markgren, S. Gustavsson, S. Schmidt, S. Lundquist, L. V. Forbes, N. J. Magon, L. N. Paton, G. N. L. Jameson, H. Eriksson, and A. J. Kettle. 2-thioxanthines are mechanism-based inactivators of myeloperoxidase that block oxidative stress during inflammation. *J. Biol. Chem.*, 286 :37578–37589, 2011.
- [164] J. Ward, S. N. Spath, B. Pabst, P. A. Carpino, R. B. Ruggeri, G. Xing, A. E. Speers, B. F. Cravatt, and K. Ahn. Mechanistic characterization of a 2-thioxanthine myeloperoxidase inhibitor and selectivity assessment utilizing click chemistry-activity-based protein profiling. *Biochem*, 52 :9187–9201, 2013.
- [165] P. Van Antwerpen and K. Z. Boudjeltia. Rational drug design applied to myeloperoxidase inhibition. *Free Rad. Res.*, 49 :711–720, 2015.
- [166] A study to evaluate the safety and effects on the body of an investigated drug using an endotoxin-induced inflammatory response model (POM). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/nct01965600?term=pf-06282999&draw=2&rank=3>. *Site internet ClinicalTrials.gov*, 2016.
- [167] A. Churg, C. V. Marshall, D. D. Sin, S. Bolton, S. Zhou, K. Thain, E. B. Cadogan, J. Maltby, M. G. Soars, P. R. Mallinder, and J. L. Wright. Late intervention with a myeloperoxidase inhibitor stops progression of experimental chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 185 :34–43, 2012.
- [168] <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/le-circuit-du-medicament/article/le-developpement-du-medicament>. *Site internet du Ministère de la santé et de la prévention*, Juillet 2023.
- [169] E. M. Espinoza, J. A. Clark, J. Soliman, J. B. Derr, M. Morales, and V. I. Vullev. Practical aspects of cyclic voltammetry : How to estimate reduction potentials when irreversibility prevails. *J. Electrochem. Soc.*, 166 :3175–3187, 2019.
- [170] S. Woonsoo, C. Hee-Yeon, and C. Nam-Seok. Screening of new mediators for lignin degradation based on their electrochemical properties and interactions with fungal laccase. *J. Korea TAPPI*, 38 :1–8, 2006.
- [171] <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/nox2-activation-measured-by-ros-production-using-l-012-chemiluminescent-probe/>. *Site internet de BMG Labtech*, Avril 2023.
- [172] H. Tatsuzawa, T. Maruyama, K. Hori, Y. Sano, and M. Nakano. Singlet oxygen as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 262 :647–650, 1999.
- [173] M. Hoebeke and X. Damoiseau. Determination of the singlet oxygen quantum yield of bacteriochlorin a : a comparative study in phosphate buffer and aqueous dispersion of dimiristoyl-l-alpha-phosphatidylcholine liposomes. *Photochem. Photobiol. Sc.*, 1 :283–287, 2002.
- [174] B. A. Lindig, M. A. J. Rodgers, and A. P. Schaap. Determination of the lifetime of singlet oxygen in d2o using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. *J. Am. Chem. Soc.*, 102 :5590–5593, 1980.

- [175] G. Deby-Dupont, C. Deby, A. Mouithys-Mickalad, M. Hoebeke, M. Mathy-Hartert, L. Jadoul, A. Vandenberghe, and M. Lamy. The antibiotic ceftazidime is a singlet oxygen quencher as demonstrated by ultra-weak chemiluminescence and by inhibition of aap consumption. *Biochim. Biophys. Acta*, 1379 :61–68, 1998.
- [176] R. A. Craig, C. P. McCoy, A. T. de Baroid, G. P. Andrews, S. P. Gorman, and D. S. Jones. Quantification of singlet oxygen generation from photodynamic hydrogels. *React. Funct. Poly.*, 87 :1–6, 2015.
- [177] K. Pierzchala, M. Pieta, M. Rola, M. Swierczynska, A. Artelska, K. Debowska, R. Podsiadly, J. Pieta, J. Zielonka, A. Sikora, A. Marcinek, and R. Michalski. Fluorescent probes for monitoring myeloperoxidase-derived hypochlorous acid : a comparative study. *Scientific Reports*, 12 :1–14, 2022.
- [178] K. U. Davis and M. K. Sheats. The role of neutrophils in the pathophysiology of asthma in humans and horses. *Inflammation*, 44 :450–465, 2021.
- [179] A. E. Karagianni, Z. M. Lisowski, D. A. Hume, and R. S. Pirie. The equine mononuclear phagocyte system : The relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Eq. Vet. J.*, 53 :231–249, 2021.
- [180] S. Capomaccio, K. Cappelli, G. Spinsanti, M. Mencarelli, M. Muscettola, M. Felicetti, A. V. Supplizi, and M. Bonifazi. Athletic humans and horses : Comparative analysis of interleukin-6 (il-6) and il-6 receptor (il-6r) expression in peripheral blood mononuclear cells in trained and untrained subjects at rest. *BMC Physio.*, 11 :1–9, 2011.
- [181] J. F. Pycock, W. E. Allen, and T. H. Morris. Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous percoll density gradient. *Res. Vet. Sci.*, 42 :411–412, 1987.
- [182] M. Nweze, T. Baker, G. A. Limb, and R. J. Shipley. Insights into the design of spray systems for cell therapies for retinal disease using computational modelling. *Math. Biosc. Eng.*, 17 :2741–2759, 2020.
- [183] W. Strober. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.*, 111, 2015.
- [184] J. R. Tennant. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *transplantation*, 2 :685–694, 1964.
- [185] R. L. Dean. Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *Biochem. Mol. Biol.*, 30 :401–407, 2002.
- [186] T. Franck, S. Kohnen, S. Grulke, P. Neven, Y. Goutman, F. Peters, B. Pirotte, and D. Serteyn. Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and myeloperoxidase activity. *Physiol. Res.*, 57 :577–587, 2008.
- [187] R. Ivanec-Goranina and J. Kulys. Kinetic study of peroxidase-catalyzed oxidation of 1-hydroxypyrene. development of a nanomolar hydrogen peroxide detection system. *Cent. Eur. J. Biol.*, 3 :224–232, 2008.
- [188] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, and R. Taylor. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, 267 :727–748, 1997.
- [189] I. I. Vlasova. Peroxidase activity of human hemoproteins : keeping the fire under control. *Molecules*, 23 :1–27, 2018.
- [190] C. Krishnamurti and SSC. Chakra Rao. The isolation of morphine by serturner. *Indian J. Anaesth.*, 60 :861–862, 2016.

- [191] <https://www.hug.ch/reseau-douleur/qu-est-ce-que-morphine-pourquoi-ce-traitement>. *Site internet des Hôpitaux Universitaire de Genève*, Avril 2023.
- [192] M. Ouzzine, S. Gulberti, N. Ramalanjaona, J. Magdalou, and S. Fournel-Gigleux. The udp-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier : their role in drug metabolism and detoxication. *Front. Cell. Neurosc.*, 8 :1–12, 2014.
- [193] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/morphine/3-proprietes-physico-chimiques/>. *Site internet de l'Encyclopédie Universalis*, Février 2023.
- [194] P. M. Dewick. *Essentials of organic chemistry : For students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry*. John Wiley and sons, 2006.
- [195] J. J. Galligan and C. Sternini. Insights into the role of opioid receptors in the gi tract : Experimental evidence and therapeutic relevance. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 239 :363–378, 2017.
- [196] J. T. Williams, M. J. Christie, and O. Manzoni. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.*, 81 :299–343, 2001.
- [197] E. J. Nestler. Historical review : Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25 :210–218, 2004.
- [198] P. A. Glare and T. D. Walsh. Clinical pharmacokinetics of morphine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 13 :1–23, 1991.
- [199] R. A. Lugo and S. E. Kern. Clinical pharmacokinetics of morphine. *J. of Pain and Palliative Care Pharmacol.*, 16 :5–18, 2002.
- [200] E. Sverrisdottir, T. M. Lund, A. E. Olesen, A. M. Drewes, L. L. Christrup, and M. Kreilgaard. A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *Europ. J. Pharmaceut. Sci.*, 74 :45–62, 2015.
- [201] R. Klimas and G. Mikus. Morphine-6-glucuronide is responsible for the analgesic effect after morphine administration : a quantitative review of morphine, morphine-6-glucuronide, and morphine-3-glucuronide. *Brit. J. Anaesth.*, 113 :935–944, 2014.
- [202] D. A. Graves, J. M. Arrigo, T. S. Foster, T. J. Baumann, and R. I. Batenhorst. Relationship between plasma morphine concentrations and pharmacologic effects in post-operative patients using patient-controlled analgesia. *Clin. Pharm.*, 4 :41–47, 1985.
- [203] H. J. McQuay, D. Carroll, C. C. Faura, D. J. Gavaghan, C. W. Hand, and R. A. Moore. Oral morphine in cancer pain : influences on morphine and metabolite concentration. *Clin. Pharm. Therap.*, 48 :236–244, 1990.
- [204] S. De Gregori, M. De Gregori, G. N. Ranzani, M. Allegri, C. Minella, and M. Regazzi. Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27 :1–5, 2011.
- [205] D. Projean, P. E. Morin, T. M. Tu, and J. Ducharme. Identification of cyp3a4 and cyp2c8 as the major cytochrome p450 as responsible for morphine n-demethylation in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 33 :841–854, 2003.
- [206] R. S. Borges, J. K. L. Vale, G. A. N. Pereira, A. A. S. Veiga, J. B. Junior, and A. B. F. de Silva. An antioxidant mechanism of morphine and related derivatives. *Med. Chem. Research*, 25 :852–857, 2016.
- [207] I. Gülçin, S. Beydemir, H. A. Alici, M. Elmastas, and M. E. Büyükköroğlu. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49 :59–66, 2004.

- [208] L. Elyasi, S. H. Eftakhar-Vaghefi, and S. Esmaeili-Mahani. Morphine protects sh-sy5y human neuroblastoma cells against 6-hydroxydopamine-induced cell damage : involvement of anti-oxidant, calcium blocking, and anti-apoptotic properties. *Rejuvenation Research*, 17, 2014.
- [209] L. Elyasi, S. H. Eftakhar-Vaghefi, M. Asadi-Shekaari, and S. Esmaeili-Mahani. Induction of cross-tolerance between protective effect of morphine and nicotine in 6-hydroxydopamine-induce neurotoxicity in sh-sy5y human dopaminergic neuroblastoma cells. *Int. J. Neurosci.*, 129 :131–140, 2019.
- [210] M. B. Almeida, A. Costa-Malaquias, J. L. M. Nascimento, K. R. Oliveira, A. M. Herculano, and M. E. Crespo-Lopez. Therapeutic concentration of morphine reduces oxidative stress in glioma cell line. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 47 :398–402, 2014.
- [211] S. Lu, L. Liao, B. Zhang, W. Yan, L. Chen, H. Yan, L. Guo, S. Lu, K. Xiong, and J. Yan. Antioxidant cascades confer neuroprotection in ethanol, morphine, and methamphetamine preconditioning. *Neurochem. Int.*, 131 :1–10, 2019.
- [212] T. Kanasaki, S. Maeda, M. Saeki Y. Ooi, K. Matsumoto, M. Sakuda, and K. Saito. Morphine prevents peroxynitrite-induced apoptosis. *Neuroscience Research*, 28 :108, 1997.
- [213] T. Kanasaki, M. Saeki, Y. Ooi, M. Suematsu, K. Matsumoto, M. Sakuda, and S. Maeda. Morphine prevents peroxynitrite-induced death of human neuroblastoma sh-sy5y cells through a direct scavenging action. *Eur. J. Pharmacol*, 372 :319–324, 1999.
- [214] E. Shi, X. Jiang, H. Bai, T. Gu, Y. Chang, and J. Wang. Cardioprotective effects of morphine on rat heart suffering from ischemia and reperfusion. *Chin. Med. J.*, 116 :1059–1062, 2003.
- [215] W.-L. Chang, S.-S. Lee, and M.-J. Su. Attenuation of post-ischemia reperfusion injury by thaliporphine and morphine in rat hearts. *J. Biomed. Sc.*, 12 :611–619, 2005.
- [216] J. Blaszczyk, J. Kedziora, M. Luciak, E. Sibinska, K. Trznadel, and L. Pawlicki. Effect of morphine and naloxone on oxidative metabolism during experimental renal ischemia and reperfusion. *Exp. Nephro.*, 2 :364–370, 1994.
- [217] R. Habibey and H. Pazoki-Toroudi. Morphine dependence protects rat kidney against ischaemia-reperfusion injury. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 35 :1209–1214, 2008.
- [218] C. Lindegaard, K. B. Glerup, M. H. Thomsen, T. Martinussen, S. Jacobsen, and P. H. Andersen. Anti-inflammatory effects of intra-articular administration of morphine in horses with experimentally induced synovitis. *Am. J. Vet. Res.*, 71, 2010.
- [219] A. Stein, A. Yassouridis, C. Szopko, K. Helmke, and C. Stein. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain*, 83 :525–532, 1999.
- [220] G. Minguet, T. Franck, A. Mouithys-Mickalad, J. Joris, C. Sandersen, and D. Serteyn. International human peroxidase meeting. *Cologne*, 14-17 septembre :Communication orale, 2015.
- [221] S.-Y. Chen, Q.-L. Huo, J.-B. Huang, Z.-L. Chen, X.-H. Shi, and X.-L. Liao. Morphine inhibited respiratory burst of neutrophils and scavenged oxygen free radicals. *Acta Pharmacol.Sin.*, 16 :445–448, 1995.
- [222] B. Hudzik, J. Nowak, and B. Zubelewicz-Szkodzinska. Consideration of immunomodulatory actions of morphine in covid-19 - short report. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 24 :13062–13064, 2020.

- [223] B. Afsharimani, P. Cabot, and M.-O. Parat. Morphine and tumor growth and metastasis. *Canc. Metast. Rev.*, 30 :225–238, 2011.
- [224] A. Hatzoglou, E. Bakogeorgou, and E. Castanas. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the t47d human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Europ. J. Pharmacol.*, 296 :199–207, 1996.
- [225] Y. Chen, Y. Qin, L. Li, J. Chen, X. Zhang, and Y. Xie. Morphine can inhibit the growth of breast cancer mcf-7 cells by arresting the cell cycle and inducing apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.*, 40 :1686–1692, 2017.
- [226] M. Kampa, E. Bakogeorgou, A. Hatzoglou, A. Damianaki, P.-M. Martin, and E. Castanas. Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (Incap, pc3 and du145) through a partial interaction with opioid receptors. *Europ. J. Pharmacol.*, 335 :255–265, 1997.
- [227] I. Hatsukari, N. Hitosugi, I. Matsumoto, H. Nagasaka, and H. Sakagami. Induction of early apoptosis marker by morphine in human lung and breast carcinoma cell lines. *Anticanc. Res.*, 23 :2413–2417, 2003.
- [228] I. Özmen, M. Naziroglu, H. Ahmet Alici, F. Sahin, M. Cengiz, and I. Eren. Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochem. Res.*, 32 :19–25, 2007.
- [229] C.-F. Lam, Y.C. Liu, F.-L. Tseng, Y.-H. Sung, C.-C. Huang, M. J. Jiang, and Y.-C. Tsai. High-dose morphine impairs vascular endothelial function by increased production of superoxide anions. *Anesthesiology*, 106 :532–537, 2007.
- [230] S. Payabvash, A. Beheshtian, A. H. Salmasi, S. Kiumehr, M. H. Ghahremani, S. M. Tavangar, O. Sabzevari, and A. R. Dehpour. Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sciences*, 79 :972–980, 2006.
- [231] S. Roy, J. Ninkovic, S. Banerjee, R. G. Charboneau, S. Das, R. Dutta, V. A. Kirchner, L. Koodie, J. Ma, J. Meng, and R. A. Barke. Opioid drug abuse and modulation of immune function : Consequences in the susceptibility of opportunistic infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 6 :442–465, 2011.
- [232] L. M. Plein and H. L. Rittner. Opioids and the immune system - friend or foe. *Brit. J. Pharmacol.*, 175 :2717–2725, 2018.
- [233] J. Ninkovic and S. Roy. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino acids*, 45 :9–24, 2013.
- [234] S. Bimonte, A. Barbieri, D. Rea, G. Palma, A. Luciano, A. Cuomo, C. Arra, and F. Izzo. Morphine promotes tumor angiogenesis and increases breast cancer progression. *Biomed. Res. Inter.*, 2015 :1–8, 2015.
- [235] P. J. Wiffen, B. Wee, and R. A. Moore. Oral morphine for cancer pain. *Cochrane Database of Systemic Reviews*, pages 1–103, 2016.
- [236] S. Donnelly, M. P. Davis, D. alsh, and M. Naughton. Morphine in cancer pain management : a practical guide. *Supportive Care in Cancer*, 10 :13–35, 2002.
- [237] R. Likar, M. Schafer, F. Paulak, R. Sittl, W. Pipam, H. Schalk, D. Geissler, and G. Bernatzky. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. *Anesth. and Analg.*, 84 :1313–1317, 1997.

- [238] K. Huehne, S. Leis, T. Muenster, A. Wehrfritz, S. Winter, C. Maihöfner, T. Foertsch, R. Croner, A. Reis, A. Winterpacht, and B. Rautenstrauss. High post surgical opioid requirements in crohn's disease are not due to a general change in pain sensitivity. *Europ. J. Pain*, 13 :1036–1042, 2009.
- [239] J. P. Buckley, S. F. Cook, J. K. Allen, and M. D. Kappelman. Prevalence of chronic narcotic use among children with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroent. Hepato.*, 13 :310–315, 2015.
- [240] A. Mokhtari, H. Karimi-Maleh, A. A. Ensafi, and H. Beitollahi. Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples. *Sens. Act. B Chem.*, 169 :96–105, 2012.
- [241] J. M. P. J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T. R. A. Mavedo, and A. M. Oliveira-Brett. Voltammetric oxidation of drugs of abuse i. morphine and metabolites. *Electroanalysis*, 16 :1419–1426, 2004.
- [242] C. Liu, J.-K. Liu, L. Gao M.-J. Kan, H.-Y. Fu, H. Zhou, and M. Hong. Morphine enhances purine nucleotide catabolism in vivo and in vitro. *Acta Pharmaco. Sin.*, 28 :1105–1115, 2007.
- [243] P. Enrico, G. Esposito, M. A. Mura, R. Migheli, P. A. Serra, M. S. Desole, E. Miele, G. de Natale, and M. Miele. Effects of allopurinol on striatal dopamine, ascorbate and uric acid during an acute morphine challenge : ex vivo and in vivo studies. *Pharmacological Research*, 35 :577–585, 1997.
- [244] S.-Y. Kishioka, T. Takekawa, and A. Yamada. Electrochemical determination of the superoxide ion concentration from ko<sub>2</sub> dissolved in dimethyl sulfoxide. *Anat. Sc.*, 20 :1465–1466, 2004.
- [245] M. Bancirova. Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and cypridina luciferin analogues. *Luminescence*, 26 :685–688, 2011.
- [246] L. Huang, T. G. St. Denis, Y. Xuan, Y.-Y. Huang, M. Tanaka, A. Zadlo, T. Sarna, and M. R. Hamblin. Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide : Role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Rad. biol. Med.*, 53 :2062–2071, 2012.
- [247] R. D. Hall and C. F. Chignell. Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen : a stern-volmer quenching experiment with sodium azide. *Photochem. Photobiol.*, 45 :459–464, 1987.
- [248] M. V. Tzvetkov, J. N. dos Santos Pereira, I. Meineke, A. R. Saadatmand, J. C. Stingl, and J. Brockmöller. Morphine is a substrate of the organic cation transporter oct1 and polymorphisms in oct1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochemical Pharmacology*, 86 :666–678, 2013.
- [249] M. Stoeber, D. Jullié, B. T. Lobingier, T. Laeremans, J. Steyaert, P. W. Schiller, A. Manglik, and M. von Zastrow. A genetically encoded biosensor reveals location bias of opioid drug action. *Neuron*, 98 :963–976, 2018.
- [250] <https://www.ucsf.edu/news/2018/05/410376/bodys-natural-opioids-affect-brain-cells-much-differently-morphine>. *Site internet de l'Université de californie San Francisco*, Avril 2023.

- [251] Ch. Le Guellec and I. Benz. Rôle des transporteurs dans l'élimination des médicaments et leurs effets indésirables. *La Lettre du Pharmacologue*, 25 :130–137, 2011.
- [252] N. Brosseau and D. Ramotar. The human organic cation transporter oct1 and its role as a target for drug responses. *Drug. Metab. Rev.*, 51 :389–407, 2019.
- [253] J. R. Engler, A. C. W. Zannettino, C. G. Bailey, J. E. J. Rasko, T. P. Hughes, and D. L. White. Oct-1 function varies with cell lineage but is not influenced by bcr-abl. *Haematologica*, 96 :213–220, 2011.
- [254] J. Brejchova, V. Holan, and P. Svoboda. Expression of opioid receptors in cells of the immune system. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 :1–13, 2021.
- [255] T. K. Chuang, K. F. Killam, L. F. Chuang, H. F. Kung, W. S. Sheng, C. C. Chao, L. Yu, and R. Y. Chuang. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 216 :922–930, 1995.
- [256] P. H. C. Leliefeld, J. Pillay, N. Vrisekoop, M. Heeres, T. Tak, M. Kox, S. H. M. Rooijackers, T. W. Kuijpers, P. Pickkers, L. P. H. Leenen, and L. Koenderman. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv.*, 2 :1344–1355, 2018.
- [257] R.-J. Zhang, Y.-F. Yin, X.-J. Xie, and H.-F. Gu. Acid-sensing ion channels : linking extracellular acidification with atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta*, 502 :183–190, 2020.
- [258] K. Öörni, K. Rajamäki, S. D. Nguyen, K. Lähdemäski, R. Plihtari, M. Lee-Rueckert, and P. T. Kovanen. Acidification of the intimal fluid : the perfect storm for atherogenesis. *J. Lip. Res.*, 56 :203–214, 2015.
- [259] K. i. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, and T. Nagano. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.*, 31 :3170–3175, 2003.
- [260] B. Halliwell and M. Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142 :231–255, 2004.
- [261] P. Nyssen, A. Mouithys-Mickalad, G. Minguet, E. Sauvage, J. Wouters, T. Franck, and M. Hoebeke. Morphine, a potential inhibitor of myeloperoxidase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1862 :2236–2244, 2018.
- [262] B. Heyne. Etude des potentialités antioxydantes du propofol vis-à-vis de l'oxygène singulet. *Thèse de doctorat*, page Université de Liège, 2004.
- [263] <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichegedoc.php?specid=65407232typedoc=r>. *Site internet de la base de données publique des médicaments*, Mars 2023.
- [264] A. M. Durantini, P. P. Mohapatra, M. Ashaque, M. E. Zatoulovski, M. M. Kim, K. A. Cengel, T. M. Busch, T. C. Zhu, and A. Greer. Photooxidative vulnerability to intralipid in photodynamic therapy. *Photochemistry*, 48 :411–422, 2021.
- [265] R. W. Olsen and T. M. DeLorey. *GABA Receptor Physiology and Pharmacology*. Basic Neurochemistry : Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6 edition, 1999.
- [266] T. B. folino, E. Muco, A. O. Safadi, and L. J. Parks. Propofol. *StatPearls [Internet]*, 2022.
- [267] J. Kanto and E. Gepts. Pharmacokinetic implications for the clinical use of propofol. *Clinical Pharmacokinetics*, 17 :308–326, 1989.

- [268] W. S. Al-Jahdari, K. Yamamoto, H. Hiraoka, K. Nakamura, F. Goto, and R. Horiuchi. Prediction of total propofol clearance based on enzyme activities in microsomes from human kidney and liver. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62 :527–533, 2006.
- [269] M. Mukai, S. Tanaka, K. Yamamoto, M. Murata, K. Okada, T. Isobe, M. Shigeyama, H. Hichiya, and N. Hanioka. In vitro glucuronidation of propofol in microsomal fractions from human liver, intestine and kidney : tissue distribution and physiological role of ugt1a9. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 :829–832, 2014.
- [270] A. L. Dawidowicz, E. Fornal, M. Mardarowicz, and A. Fijalkowska. The role of human lungs in the biotransformation of propofol. *Anesthesiology*, 93 :992–997, 2000.
- [271] A. A. Raoof, L. J. Obbergh, J. Ville de Goyet, and R. K. Verbeeck. Extrahepatic glucuronidation of propofol in man : possible contribution of gut wall and kidney. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 50 :91–96, 1996.
- [272] M. M. Sahinovic, M. M. R. F. Struys, and A. R. Absalom. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol. *Clinical Pharmacokinetics*, 57 :1539–1558, 2018.
- [273] P. Favetta, C. S. Degoute, J.-P. Perdrix, C. Dufresne, R. Boulieu, and J. Guitton. Propofol metabolites in man following propofol induction and maintenance. *British Journal of Anaesthesia*, 88 :653–658, 2002.
- [274] J. Guitton, T. Buronfosse, M. Desage, J.-P. Flinois, J.-P. Perdrix, J.-L. Brazier, and P. Beaune. Possible involvement of multiple human cytochrome p450 isoforms in the liver metabolism of propofol. *British Journal of Anaesthesia*, 80 :788–795, 1998.
- [275] Y. Oda, N. Hamaoka, T. Hiroi, S. Imaoka, I. Hase, K. Tanaka, Y. Funae, T. Ishizaki, and A. Asada. Involvement of human liver cytochrome p4502b6 in the metabolism of propofol. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51 :281–285, 2008.
- [276] S. Campos, J. Monteiro, L. Antunes, P. S. Branco, L. M. Ferreira, L. Félix, and P. G. de Pinho. Simultaneous quantification for propofol and its non-conjugated metabolites in several biological matrices using gas chromatography/ion trap - ass spectrometry method. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, 5 :1–9, 2014.
- [277] A. R. Absalom, V. Mani, T. De Smet, and M. M. R. F. Struys. Pharmacokinetic models for propofol - defining and illuminating the devil in the detail. *British Journal of Anaesthesia*, 103 :26–37, 2009.
- [278] A. F. Nimmo, A. R. Absalom, O. Bagshaw, A. Biswas, T. M. Cook, A. Costello, S. Grimes, D. Mulvey, S. Shinde, T. Whitehouse, and M. D. Wiles. Guidelines for the safe practice of total intravenous anaesthesia (tiva). *Anaesthesia*, 74 :211–224, 2019.
- [279] Z. Al-Rifai and D. Mulvey. Principles of total intravenous anaesthesia : practical aspects of using total intravenous anaesthesia. *BJA Education*, 16 :276–280, 2016.
- [280] H. Iwakiri, N. Nishihara, O. Nagata, T. Matsukawa, M. Ozaki, and D. I. Sessler. Individual effect-site concentrations of propofol are similar at loss of consciousness and at awakening. *Anesthesia & Analgesia*, 100 :107–110, 2005.
- [281] T. B. Vree, A. J. Lagerwerf, C. P. Bleeker, and P. M. R. M. de Grood. Direct high-performance liquid chromatography determination of propofol and its metabolite quinol with their glucuronide conjugates and preliminary pharmacokinetics in plasma and urine of man. *Journal of Chromatography B*, 721 :217–228, 1999.
- [282] S. Boisset, J.-P. Steghens, P. Favetta, R. Terreux, and J. Guitton. Relative antioxidant capacities of propofol and its main metabolites. *Arch. Toxicol.*, 78 :635–642, 2004.

- [283] J. Guitton, M. Desage, A. Lepape, C. S. Degoute, M. Manchon, and J. L. Brazier. Quantitation of propofol in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromat. B*, 669 :358–365, 1995.
- [284] I. Budic, T. J. Stoimenov, D. Pavlovic, V. Marjanovic, I. Djordjevic, M. Stevic, and D. Simic. Clinical importance of potential genetic determinants affecting propofol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Front. Med.*, 9 :1–8, 2022.
- [285] J. R. Sneyd, P. J. Simons, and B. Wright. Use of proton nmr spectroscopy to measure propofol metabolites in the urine of the female caucasian patient. *Xenobiotica*, 24 :1021–1028, 1994.
- [286] A. Mouithys-Mickalad, P. Hans, G. Deby-Dupont, M. Hoebeke, C. Deby, and M. Lamy. Propofol reacts with peroxy-nitrite to form a phenoxy radical : Demonstration by electron spin resonance. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 249 :833–837, 1998.
- [287] B. Heyne, S. Kohnen, D. Brault, A. Mouithys-Mickalad, F. Tfibel, P. Hans, M.-P. Fontaine-Aupart, and M. Hoebeke. Investigation of singlet oxygen reactivity towards propofol. *Photochem. Photobiol. Sc.*, 2 :939–945, 2003.
- [288] M. Mathy-Hartert, G. Deby-Dupont, P. Hans, C. Deby, and M. Lamy. Protective activity of propofol, diprivan and intralipid against active oxygen species. *Mediators of Inflammation*, 7 :327–333, 1998.
- [289] D. A. Eastmond, M. T. Smith, L. O. Ruzo, and D. Ross. Metabolic activation of phenol by human myeloperoxidase and horseradish peroxidase. *Mol. Pharmacol.*, 30 :674–679, 1986.
- [290] V. V. Subrahmanyam, P. Kolachana, and M. T. Smith. Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex : Possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Rad. Res. Comm.*, 15 :285–296, 1991.
- [291] A. J. Kettle and C. C. Winterbourn. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 269 :17146–17151, 1994.
- [292] G. Zaloga and P. Marik. Sulfite-induced propofol oxidation : A cause for radical concern. *Crit. Care Med.*, 31 :981–983, 2003.
- [293] M. T. Baker, M. S. Gregerson, S. M. Martin, and G. R. Buettner. Free radical and drug oxidation products in an intensive care unit sedative : Propofol with sulfite. *Crit. Care Med.*, 31 :787–792, 2003.
- [294] M. T. Baker and M. Naguib. Propofol the challenges of formulation. *Anesthesiology*, 103 :860–876, 2005.
- [295] F. Stradolini, T. Kilic, I. Taurino, G. De Micheli, and S. Carrara. Cleaning strategy for carbon-based electrodes : Long-term propofol monitoring in human serum. *Sensors and Actuators B*, 269 :304–313, 2018.
- [296] M. Ferreira, H. Varela, R. M. Torresi, and G. Tremiliosi-Filho. Electrode passivation caused by polymerization phenolic compounds. *Electrochimica Acta*, 52 :434–442, 2006.
- [297] L. Aarts, R. van der Hee, I. Dekker, J. de Jong, H. Langemeijer, and A. Bast. The widely used anesthetic agent propofol can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Letters*, 357 :83–85, 1995.
- [298] I. Gülçin, H. A. Alici, and M. Cesur. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem. Pharm. Bull.*, 53 :281–285, 2005.

- [299] T. R. Green, S. R. Bennett, and V. M. Nelson. Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. *Tox. Appl. Pharmacol.*, 129 :163–169, 1994.
- [300] W. Li, Y. Zhang, Y. Liu, F. Yue, Y. Lu, H. Qiu, D. Gao, Y. Gao, Y. Wu, Z. Wang, R. Huang, and C. Zhang. In vitro kinetic evaluation of the free radical scavenging ability of propofol. *Anesthesiology*, 116 :1258–1266, 2012.
- [301] S. Kahraman and A. Demiryurek. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth. Analg.*, 84 :1127–1129, 1997.
- [302] A. T. Demiryürek, I. Cinel, S. Kahraman, M. Tecder-Unal, N. Göğüs, U. Aypar, and I. Kanzik. Propofol and intralipid interact with reactive oxygen species : a chemiluminescence study. *Brit. J. Anaesth.*, 80 :649–654, 1998.
- [303] P. G. Murphy, D. S. Myers, M. J. Davies, N. R. Webster, and J. G. Jones. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Brit. J. Anaesth.*, 68 :613–618, 1992.
- [304] M. Tsuchiya, A. Asada, K. Maeda, Y. Ueda E. F. Sato, M. Shindo, and M. Inoue. Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activities. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 163 :26–31, 2001.
- [305] M. Mathy-Hartert, A. Mouithys-Mickalad, S. Kohnen, G. Deby-Dupont, M. Lamy, and P. Hans. Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxynitrite donor (sin-1). *Anaesthesia*, 55 :1066–1071, 2000.
- [306] P. G. Murphy, J. R. Bennett, D. S. Myers, M. J. Davies, and J. G. Jones. The effect of propofol anaesthesia on free radical-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Eur. J. Anaesth.*, 10 :261–266, 1993.
- [307] Y.-P. Bao, G. Williamson, D. Tew, G. W. Plumb, N. Lambert, J. G. Jones, and D. K. Menon. Antioxidant effects of propofol in human hepatic microsomes : concentration effects and clinical relevance. *Brit. J. Anaesth.*, 81 :584–589, 1998.
- [308] O. Eriksson, P. Polleselo, and N.-E. L. Saris. Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anaesthetic propofol. *Biochem. Pharmacol.*, 44 :391–393, 1992.
- [309] J. P. De La Cruz, G. Sedeno, J. A. Carmona, and F. Sanchez De La Cuesta. The in vitro effects of propofol on tissular oxidative stress in the rat. *Anesth. Analg.*, 87 :1141–1146, 1998.
- [310] P. Hans, G. Deby-Dupont, C. Deby, F. Pieron, R. Verbesselt, C. Franssen, and M. Lamy. Increase in antioxidant capacity of plasma during propofol anesthesia. *J. Neurosurg. Anesth.*, 9 :234–236, 1997.
- [311] J. P. De La Cruz, A. Zanca, J. A. Carmona, and F. Sanchez De La Cuesta. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. *Anesth. Analg.*, 88 :1050–1055, 1999.
- [312] J. P. De La Cruz, M. A. Villalobos, G. Sedeno, and F. Sanchez De La Cuesta. Effect of propofol on oxidative stress in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. *Brain Res.*, 800 :136–144, 1998.
- [313] Y. Young, D. K. Menon, N. Tisavipat, B. F. Matta, and J. G. Jones. Propofol neuroprotection in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Europ. J. Anaesth.*, 14 :320–326, 1997.

- [314] R. Ergün, G. Akdemir, S. Sen, A. Tasci, and F. Ergüngör. Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats. *Neurosurg. Rev.*, 25 :95–98, 2002.
- [315] M. A. Hausburg, K. L. Banton, P. E. Roman, F. Salgado, P. Baek, M. J. Waxman, A. Tanner II, J. Yoder, and D. Bar-Or. Effects of propofol on ischemia-reperfusion and traumatic brain injury. *J. Crit. Care*, 56 :281–287, 2020.
- [316] J. Han, W. Tao, W. Cui, and J. Chen. Propofol via antioxidant property attenuated hypoxia-mediated mitochondrial dynamic imbalance and malfunction in primary rat hippocampal neurons. *Oxid. Med. Cell. Long.*, 2022 :1–16, 2022.
- [317] A. Sebastiani, M. Granold, A. Ditter, P. Sebastiani, C. Gözl, B. Pöttker, C. Luh, E.-V. Schaible an K. Radyushkin, R. Timaru-Kast, C. Werner, M. K. Schäfer, K. Engelhard, B. Moosmann, and S. C. Thal. Posttraumatic propofol neurotoxicity is mediated via the pro-brain-derived neurotrophic factor-p75 neurotrophin receptor pathway in adult mice. *Crit. Care Med.*, 44 :70–82, 2016.
- [318] N. Kokita, A. Hara, Y. Abiko, J. Arakawa, H. Hashizume, and A. Namiki. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth. Analg.*, 86 :252–258, 1998.
- [319] S. Yang, W.-P. Chou, and L. Pei. Effects of propofol on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *exp. Therap. Med.*, 6 :1177–1183, 2013.
- [320] Z. Xu, J. Yu, J. Wu, F. Qi, H. Wang, Z. Wang, and Z. Wang. The effects of two anesthetics, propofol and sevoflurane, on liver ischemia/rperfusion injury. *Cell. Physiol. Biochem.*, 38 :1631–1642, 2016.
- [321] M.-S. Chen, W.-C. Lin, H.-T. Yeh, C.-L.-Hu, and S.-M. Sheu. Propofol specifically reduces pma-induced neutrophil extracellular trap formation through inhibition of p-erk and hocl. *Life. Sc.*, 221 :178–186, 2019.
- [322] A. Meier, J. Chien, L. Hobohm, K. A. Patras, V. Nizet, and R. Corriden. Inhibition of human neutrophil extracellular trap (net) production by propofol and lipid emulsion. *Front. Pharmacol.*, 10 :1–6, 2019.
- [323] H. F. Galley, A. M. Dubbels, and N. R. Webster. The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth. Analg.*, 86 :1289–1293, 1998.
- [324] T. Kochiyama, X. Li, H. Nakayama, M. Kage, Y. Yamane, K. Takamori, K. Iwabuchi, and E. Inada. Effect of propofol on the production of inflammatory cytokines by human polarized macrophages. *Med. Inflamm.*, 2019 :1–13, 2019.
- [325] R. Hofbauer, M. frass, H. Salfinger, D. Moser, S. Hornykewycz, B. Gmeiner, and S. Kapiotis. Propofol reduces the migration of human leukocytes through endothelial cell monolayers. *Crit. Care Med.*, 27 :1843–1847, 1999.
- [326] K. Mikawa, H. Akamatsu, K. Nishina, M. Shiga, N. Maekawa, H. Obara, and Y. Niwa. Propofol inhibits human neutrophil functions. *Anesth. Analgesia*, 87 :697–700, 1998.
- [327] W. Krumholz, J. endrass, and G. Hempelmann. Propofol inhibits phagocytosis and killing of staphylococcus aureus and escherichia coli by polymorphonuclear lleukocytes in vitro. *Can. J. Anaesth.*, 41 :446–449, 1994.
- [328] J. Gao, B. Zeng, and L. Zhou. The protective effects of early treatment with propofol on endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Midd. East J. Anaesth.*, 17 :379–401, 2003.

- [329] A. Piazzon, U. Vrhovsek, D. Masuero, F. Mattivi, F. Mandoj, and M. Nardini. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites : synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *J. Agr. Food Chem.*, 60 :12312–12323, 2012.
- [330] T. Masuda, Y. Inaba, T. Maekawa, Y. Takeda, H. Tamura, and H. Yamaguchi. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *J. Agr. Food Chem.*, 50 :5863–5869, 2002.
- [331] D. Siegel, E. M. Bolton, J. A. Burr, D. C. Liebler, and D. Ross. The reduction of alpha-tocopherolquinone by human nad(p)h :quinone oxidoreductase : The role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol.*, 52 :300–305, 1997.
- [332] Y. Song and G. R. Buettner. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 49 :919–962, 2010.
- [333] R. I. Samoilova, A. R. Crofts, and S. A. Dikanov. Reaction of superoxide radical with quinone molecules. *J. Phys. Chem. A*, 115 :11589–11593, 2011.
- [334] F. Mas-Celis, J. Olea-Lopez, and J. A. Parroquin-Maldonado. Sepsis in trauma : A deadly complication. *Arch. Med. Res.*, 52 :808–816, 2021.
- [335] D. M. Griffith, S. Lewis, A. G. Rossi, J. Rennie, L. Salisbury, J. L. Merriweather, K. Templeton, and T. S. Walsh. Systemic inflammation after critical illness : relationship with physical recovery and exploration of potential mechanisms. *Thorax*, 71 :820–829, 2016.
- [336] G. Lenaz, R. Fato, G. Formiggini, and M. L. Genova. The role of coenzyme q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7S :S8–S33, 2007.
- [337] M. V. C. Nguyen, B. Lardy, F. Rousset, F. Hazane-Puch, L. Zhang, C. Trocmé, L. Serander, K.-H. Krause, and F. Morel. Quinone compounds regulate the level of ros production by the nadph oxidase nox4. *Biochem. Pharmacol.*, 85 :1644–1654, 2013.
- [338] J. Langmaier, F. Garay, F. Kivlehan, E. Chaum, and E. Lindner. Electrochemical quantification of 2,6-diisopropylphenol (propofol). *Analytica Chimica Acta*, 704 :63–67, 2011.
- [339] D. E. Pissinis and J. M. Marioli. Electrochemical detection of 2,6-diisopropylphenol (propofol) in reversed phase hplc at high ph. *J. Liq. Chromatogr. Relat.*, 30 :1787–1795, 2007.
- [340] A. Simic, D. Manojlovic, D. Segan, and M. Todorovic. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12 :2327–2340, 2007.
- [341] H. R. Zare, M. Namazian, and N. Nasirizadeh. Electrochemical behavior of quercetin : Experimental and theoretical studies. *J. Electroanal. Chem.*, 584 :77–83, 2005.
- [342] R. Abdel-Hamid and E. F. Newair. Electrochemical behavior of antioxidants : I. mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 657 :107–112, 2011.
- [343] P. H. Jordan and J. P. Hart. Voltammetric behaviour of morphine at a glassy carbon electrode and its determination in human serum by liquid chromatography with electrochemical detection under basic conditions. *Analyst*, 116 :991–996, 1991.

- [344] M. Quan, D. Sanchez, M. F. Wasylkiw, and D. K. Smith. Voltammetry of quinones in unbuffered aqueous solution : Reassessing the roles of proton transfer and hydrogen bonding in the aqueous electrochemistry of quinones. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 :12847–12856, 2007.
- [345] P. S. Guin, S. Das, and P. C. Mandal. Electrochemical reduction of sodium 1,4-dihydroxy-9,10- anthraquinone-2-sulphonate in aqueous and aqueous dimethyl formamide mixed solvent : A cyclic voltammetric study. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 3 :1016–1028, 2008.
- [346] D. C. Ferrier, J. Kiely, and R. Luxton. Cytochrome p450 2b6 amperometric biosensor for continuous monitoring of propofol. *IEEE Sens. J.*, 21 :23730–23736, 2021.
- [347] E. Nkhili. Polyphénols de l'alimentation : Extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir oxydant. *Thèse de doctorat*, page Université d'Avignon, 2009.
- [348] T. Miura, S. Muraoka, and Y. Fujimoto. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide : pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. *Food Chem. Toxicol.*, 41 :751–765, 2003.
- [349] A. René, M.-L. Abasq, D. Hauchard, and P. Hapiot. How do phenolic compounds react toward superoxide ion ? a simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. *Anal. Chem.*, 82 :8703–8710, 2010.
- [350] M. Hayyan, M. A. Hashim, and I. M. AlNashef. Superoxide ion : Generation and chemical implications. *Chem. Rev.*, 116 :3029–3085, 2016.
- [351] M. T. Huynh, C. W. Anson, A. C. Cavell, S. S. Stahl, and A. Hammes-Schiffer. Quinone 1 e<sup>-</sup> and 2 e<sup>-</sup>/2 h<sup>+</sup> reduction potentials : Identification and analysis of deviations from systematic scaling relationships. *J. Am. Chem. Soc.*, 138 :15903–15910, 2016.
- [352] P. M. Wood. The potential digram for oxygen at ph 7. *Biochem. J.*, 253 :287–289, 1988.
- [353] B. Heyne, D. Brault, M.-P. Fontaine-Aupart, S. Kohnen, F. Tfibel, A. Mouithys-Mickalad, and M. Hoebeke. Reactivity towards singlet oxygen of propofol inside liposomes and neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1724 :100–107, 2005.
- [354] C. Senda, Y. Nishinaka, T. Arai, H. Sagawa, H. Mori, M. Nonogawa, N. Endo, T. Miyoshi, K. Yamashita, and M. Sasada. Effects of injectable propofol emulsion on singlet oxygen released from activated human neutrophils and that chemically generated. *J. Pharmacol. Sc.*, 107 :460–464, 2008.
- [355] D. A. Ford. Lipid oxidation by hypochlorous acid : chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia. *Clin. Lipidol.*, 5 :835–852, 2010.
- [356] S. A. Weiss and L. J. C. Jeuken. Lipid-membrane modified electrode to study quinone oxidoreductases. *Biochem. Soc. Trans.*, 37 :1–11, 2009.
- [357] P. Kaurola, V. Sharma, A. Vonk, I. Vattulainen, and T. Rog. Distribution and dynamics of quinones in the lipid bilayer mimicking the inner membrane of mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 1858 :2116–2122, 2016.
- [358] I. L. Sun, E. E. Sun, F. L. Crane, D. J. Morré, A. Lindgren, and H. Low. Requirement for coenzyme q in plasma membrane electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :11126–11130, 1992.

- [359] S. Derochette, T. Franck, A. Mouithys-Mickalad, J. Ceusters, G. Deby-Dupont, J.-P. Lejeune, P. Neven, and D. Serteyn. Curcumin and resveratrol act by different ways on nadph oxidase activity and reactive oxygen species produces by equine neutrophils. *Chem. Biol. Inter.*, 206 :186–193, 2013.
- [360] M. A. Tocilescu, V. Zickermann and K. Zwicker, and U. Brandt. Quinone binding and reduction by respiratory complex i. *Biochim. Biophys. Acta*, 1797 :1883–1890, 2010.
- [361] H. Tsuchiya. Structure-specific membrane-fluidizing effect of propofol. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28 :292–299, 2001.
- [362] M. A. Bahri, A. Seret, P. Hans, J. Piette, G. Deby-Dupont, and M. Hoebeke. Does propofol alter membrane fluidity at clinically relevant concentrations? an esr spin label study. *Biophys. Chem.*, 129 :82–91, 2007.
- [363] M. A. Bahri. Etude quantitative de la microviscosité membranaire de l'in-vitro aux membranes cellulaires. *Thèse de doctorat*, page Université de Liège, 2009.
- [364] W. Jin, M. Zucker, and A. Pralle. Membrane nanodomains homeostasis during propofol anesthesia as function of dosage and temperature. *Biochem. Biophys. Acta - Biomembranes*, 1863 :1–7, 2021.
- [365] J. Heine, K. Jaeger, A. Osthaus, N. Weingaertner, S. Münte, S. Piepenbrock, and M. Leuwer. Anaesthesia with propofol decreases fmlp-induced neutrophil respiratory burst but not phagocytosis compared with isoflurane. *Brit. J. Anaesth.*, 85 :424–430, 2000.
- [366] C.-Y. Chen, Y.-F. Tsai, W.-J. Huang, S.-H. Chang, and T.-L. Hwang. Propofol inhibits endogenous formyl peptide-induced neutrophil activation and alleviates lung injury. *Free Rad. Biol. Med.*, 129 :372–382, 2018.
- [367] S.-C. Yang, P.-J. Chung, C.-M. Ho, C.-Y. Kuo, M.-F. Hung, Y.-T. Huang, W.-Y. Chang, Y.-W. Chang, K.-H. Chan, and T.-L. Hwang. Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1. *J. Immunol.*, 190 :6511–6519, 2013.
- [368] J. Nordenström, C. Jarstrand, and A. Wiernik. Decreased chemotactic and random migration of leukocytes during intralipid infusion. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32 :2416–2422, 1979.
- [369] J. Heine, M. Leuwer, D. Scheinichen, L. Arseniev, K. Jaeger, and S. Piepenbrock. Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils. *Brit. J. Anaesth.*, 77 :387–392, 1996.
- [370] J.-C. Lien, L.-J. Huang, J.-P. Wang, C.-M. Teng, K.-H. Lee, and S-C. Kuo. Synthesis and antiplatelet, anti-inflammatory and antiallergic activities of 2,3-disubstituted 1,4-naphthoquinones. *Chem. Pharm. Bull.*, 44 :1181–1187, 1996.
- [371] J.-C. Lien, L.-J. Huang, C.-M. Teng, J.-P. Wang, and S-C. Kuo. Synthesis of 2-alkyl 1,4-naphthoquinone derivatives as antiplatelet, anti-inflammatory and antiallergic agents. *Chem. Pharm. Bull.*, 50 :672–674, 2002.
- [372] M. Tordera, M. L. Ferrandiz, and M. J. Alcaraz. Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 49 :235–240, 1994.
- [373] W. F. Stenson, J. Mehta, and I. Spilberg. Sulfasalazine inhibition of binding of n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp) to its receptor on human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.*, 33 :4007–4012, 1984.

- [374] T.-L. Hwang, C.-C. Wang, Y.-H. Kuo, H.-C. Huang, Y.-C. Wu, L.-M. Kuo, and Y.-H. Wu. The hederagenin saponin smg-1 is a natural fmlp receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation. *Biochem. Pharmacol.*, 80 :1190–1200, 2010.
- [375] J. Arnhold. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochem.*, 69 :8–15, 2004.
- [376] A. Song, J. Zhang, M. Zhang, T. Shen, and J. Tang. Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles. *Coll. Surf. A : Physiochem. Eng. Asp.*, 167 :253–262, 2000.
- [377] R. M. M. Brito and W. L. C. Vaz. Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe n-phenyl-1-naphthylamine. *Anal. Biochem.*, 152 :250–255, 1986.
- [378] A. Nag and K. Bhattacharyya. Fluorescence enhancement of p-toluidino naphthalene-sulphonate in a micellar environment. *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.*, 47 :97–102, 1989.
- [379] C.-L. Liu, X. Zhang, J. Liu, Y. Wang, G. K. Sukhova, G. R. Wojtkiewicz, T. Liu, R. Tang, S. Achilefu, M. Nahrendorf, P. Libby, J. Guo, J.-Y. Zhang, and G.-P. Shi. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 1 determines atherosclerotic lesion acidification and promotes atherogenesis. *Nature Comm.*, 10 :1–14, 2019.
- [380] M. Price, J. J. Reiners, A. M. Santiago, and D. Kessel. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 85 :1177–1181, 2009.
- [381] W. Jantschko, P. G. Furtmüller, M. Allegra, M. A. Livrea, C. Jakopitsch, G. Regelsberger, and C. Obinger. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases : a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, 398 :12–22, 2002.
- [382] P. Nyssen, A. Maho, R. Malempré, A. Matagne, A. Mouithys-Mickalad, and M. Hoebeke. Propofol inhibits the myeloperoxidase activity by acting as substrate through a redox process. *Biochim. Biophys. Acta*, 1866, 2022.
- [383] P. Nyssen, T. Franck, D. Serteyn, , A. Mouithys-Mickalad, and M. Hoebeke. Propofol metabolites and derivatives inhibit the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *Free Rad. Biol. Med.*, 191 :164–175, 2022.
- [384] D. Bazalinski, J. Przybek-Mita, B. Baranska, and P. Wiech. Marjolin’s ulcer in chronic wounds - review of available literature. *Contemp. Oncol.*, 21 :197–202, 2017.
- [385] I. Piotrowski, K. Kulcenty, and W. Suchorska. Interplay between inflammation and cancer. *Reports Prat. Onc. Radioth.*, 25 :422–427, 2020.
- [386] A. Korniluk, O. Koper, H. Kemonia, and V. Dymicka-Piekarska. From inflammation to cancer. *Ir. J. Med. Sci.*, 186 :57–62, 2017.
- [387] L. M. Coussens and Z. Werb. Inflammation and cancer. *Nature*, 420 :860–867, 2002.
- [388] E. Shacter and S. A. Weitzman. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*, 16 :217–226, 2002.
- [389] P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, and A. Mantovani. Cancer-related inflammation : Common themes and therapeutic opportunities. *Sem. Canc. Biol.*, 22 :33–40, 2012.

- [390] A. J. Greenstein. Cancer in inflammatory bowel disease. *Mount Sinai J. Med.*, 67 :227–240, 2000.
- [391] J. Kay, E. Thadhani, M. Samson, and B. Engelward. Inflammation-induced dna damage, mutations and cancer. *DNA Repair*, 83 :1–21, 2019.
- [392] P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, and A. Mantovani. The inflammatory micro-environment in tumor progression : The role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol./Hemato.*, 66 :1–9, 2008.
- [393] S. Zappavigna, A. M. Cossu, A. Grimaldi, M. Bocchetti, G. A. Ferraro, G. F. Nicoletti, R. Filoase, and M. Caraglia. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 :1–29, 2020.
- [394] L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. Chiara Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.-P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Turse, G. Kroemer, and L. Zitvogel. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.*, 13 :1050–1059, 2007.
- [395] I. Kimiz-Gabologlu, S. Gulce-Iz, and C. Biray-Avci. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol. Biol. Rep.*, 45 :2935–2940, 2018.
- [396] <https://www.chuliege.be/jcms/c2-17434338/fr/institut-de-cancerologie-arseneburny/quelques-mots-sur-l-immunotherapie>. *Site internet du CHU de l'Université de Liège*, Novembre 2022.
- [397] S. Farkona, E. P. Diamandis, and I. M. Blasutig. Cancer immunotherapy : the beginning of the end of cancer ? *BMC Medicine*, 14 :1–18, 2016.
- [398] Z. Zhu, A. J. R. McGray, W. Jiang, B. Lu, P. Kalinski, and Z. S. Guo. Improving cancer immunotherapy by rationally combining oncolytic virus with modulators targeting key signaling pathways. *Mol. Cancer*, 21 :1–29, 2022.
- [399] S. G. Downey, J. A. Klapper, F. O. Smith, J. C. Yang, R. M. Sherry, R. E. Royal, U. S. Kammula, M. S. Hughes, T. E. Allen, C. L. Levy, M. Yellin, G. Nichol, D. E. White, S. M. Steinberg, and S. A. Rosenberg. Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by ctl-associated antigen-4 blockade. *Canc. Ther. Clin.*, 13 :6681–6688, 2007.
- [400] I. Mellman, G. Coukos, and G. Dranoff. Cancer immunotherapy comes of ages. *Nature*, 480 :480–489, 2011.
- [401] U. Lewandowska, S. Górlach, K. Owczarek, E. Hrabec, and K. Szewczyk. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anti-cancer synergy between polyphenols. *Postepy. High. Med. Dosw.*, 68 :528–540, 2014.
- [402] A. W. Chung, K. Anand, A. C. Anselme, A. A. Chan, N. Gupta, L. A. Venta, M. R. Schwartz, W. Qian, Y. Xu, L. Zhang, J. Kuhn, T. Patel, A. A. Rodriguez, A. Belcheva, J. Darcourt, J. Ensor, E. Bernicker, P.-Y. Pan, S. H. Chen, D. J. Lee, P. A. Naravath, and J. C. Chang. A phase 1/2 clinical trial of the nitric oxide synthase inhibitor l-nmma and taxane for treating chemoresistant triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.*, 13 :–, 2021.
- [403] <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2022/reducing-inflammation-to-treat-cancer>. *Site internet du National Cancer Institute*, Novembre 2022.

- [404] G. J. Tsioulis, M. F. Go, and B. Rigas. Nsaids and colorectal cancer control : promise and challenges. *Curr. Pharmacol. Rep.*, 1 :295–301, 2015.
- [405] A. Lanas and A. Ferrandez. Nsaids and the colon. *Curr. Op. Gastroentero.*, 25 :44–49, 2009.
- [406] D. Wang and R. N. Dubois. The role of anti-inflammatory rugs in colorectal cancer. *Annu. Rev. Med.*, 64 :131–144, 2013.
- [407] S. J. Shiff, M. I. Koutsos, L. Qiao, and B. Rigas. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma celles : Effects on cell cycle and apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 222 :179–188, 1996.
- [408] F. M. Giardiello, V. W. Yang, L. M. Hyland, A. J. Krush, G. M. Petersen, J. D. Trimbath, S. Piantadosi, E. Garrett, D. E. Geiman, W. Hubbard, G. J. Offerhaus, and S. R. Hamilton. Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N. Engl. J. Med.*, 346 :1054–1059, 2002.
- [409] P. Ghanghas, S. Jain, C. Rana, and S. N. Sanyal. Chemoprevention of colon cancer through inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Env. Path. Toxicol. Onc.*, 35 :273–289, 2016.
- [410] H. Gungor adn N. Ilhan and H. Eroksuz. The effectiveness of cyclooxygenase–2 inhibitors and evaluaion of angiogenesis in the model of experimental colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 102 :221–229, 2018.
- [411] M. J. Karjalainen, P. J. Neuvonen, and J. T. Backman. In vitro inhibition of cyp1a2 by model inhibitors, anti-inflammatory analgesics and female sex steroids : predictability of in vivo interactions. *BCPT*, 103 :157–165, 2008.
- [412] L.-C. S. Wang, L.-M. Ching, J. W. Paxton, P. Kestell, R. Sutherland, S. Zhuang, and B. C. Baguley. Enhancement of the action of the antivascular drug 5,6-dimethylxanthene-4-acetic acid (dmxaa ; asa4o4) by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Invest. New Drugs*, 27 :280–284, 2009.
- [413] B. Albouy, J.-M. Tourani, P. Allain, F. Rolland, F. Staerman, P. Eschwege, and C. Pfister. Preliminary results of the prostacox phase ii trial in hormonal refractory prostate cancer. *BJUI International*, 100 :770–774, 2007.
- [414] M. M. Javle, S. Cao, F. A. Durrani, L. Pendyala, D. D. Lawrence, P. F. Smith, P. J. Creaven, D. C. Noel, R. V. Iyer, and Y. M. Rustum. Celecoxib and mucosal protection : translation from an animal model to a phase i clinical trial of celecoxib, irinotecan, and 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.*, 13 :965–971, 2007.
- [415] O. H. Nielsen, B. Vainer, and J. Rask-Madsen. Review article : the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15 :1699–1708, 2001.
- [416] J. Afonso M. M. Estavinho, I. Rosa, P. Lago, E. Trindade, L. Correia, C. C. Dias, and F. Magro. A systematic review and meta-analysis of 6-thioguanine nucleotide levels and clinical remission in inflammatory bowel disease. *J. Crohn's and Colitis*, 11 :1381–1392, 2017.
- [417] C. Casanova Sorni, M. L. Moreno Sancho, M. Miranda Sanz, I. Almansa Frias, A. Falco Montesinos, A. Navarro Moreno, S. Fustero Lardies, S. Merida Donoso, and V. M. Villar Amigo. Antioxidant capacity of 5-fluorouracile and new fluorinated uricil derivatives. <https://revistas.ucv.es/nereis/index.php/Nereis/article/download/384/340?inline=1>, 2018.

- [418] Y.-H. Liu, W.-C. Wu, Y.-L. Lu, Y.-J. Lai, and W.-C. Hou. Antioxidant and amine oxidase inhibitory activities of hydroxyurea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 :1256–1260, 2010.
- [419] Virginie Pasquet. Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. *Thèse de doctorat*, Université de La Rochelle, 2012.
- [420] P. Banstola. Study of anti-inflammatory activity of crizotinib in microglia model of neuroinflammation. *Thèse de doctorat*, North Carolina Central University, 2019.
- [421] M. K. Goftar, N. M. Kor, and Z. M. Kor. Dna intercalators and using them as anticancer drugs. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, 2 :811–822, 2014.
- [422] M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, and A. Ramos. Intercalators as anticancer drugs. *Curr. Pharmaceut. Design*, 7 :1745–1780, 2001.
- [423] <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antimetabolites>. *Site internet du Collège National de Pharmacologie Médicale*, 2022.
- [424] M. K. Paul and A. K. Mukhopadhyay. Tyrosine kinase - role and significance in cancer. *Int. J. Med. Sci.*, 1 :101–115, 2004.
- [425] R. J. Thomson, M. Moshirfar, and Y. Ronquillo. Tyrosine kinase inhibitors. *StatPearls [Internet]*, pages 1–26, 2022.
- [426] W. F. C. Dresler and R. Stein. Ueber den hydroxylharnstoff. *Eur. J. Org. Chem.*, 150 :242–252, 1869.
- [427] C. C. Stock, D. A. Clarke, F. S. Philips, R. K. Barclay, and S. A. Myron. Sarcoma 180 screening data. *Cancer Res.*, 20 Pt 2 :193–381, 1960.
- [428] B. Stearns, K. A. Losee, and J. Bernstein. Hydroxyurea. a new type of potential anti-tumor agent. *J. Med. Chem.*, 6 :201, 1963.
- [429] B. J. Kennedy and J. W. Yarbro. Metabolic and therapeutic effects of hydroxyurea in chronic myeloid leukemia. *JAMA*, 195 :1038–1043, 1966.
- [430] A. Singh and Y.-J. Xu. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*, 7 :1–15, 2016.
- [431] V. De Stafano, E. Rossi, A. Carobbio, A. Ghirardi, S. Betti, G. Finazzi, A. M. Vannucchi, and T. Barbui. Hydroxyurea prevents arterial and late venous thrombotic recurrences in patients with myeloproliferative neoplasms but fails in the splanchnic venous district. pooled analysis of 1500 cases. *Blood Cancer J.*, 8 :1–7, 2018.
- [432] G. I. Rodriguez, J. G. Kuhn, G. R. Weiss, S. G. Hilsenbeck, J. R. Eckardt, A. Thurman, D. A. Rinaldi, S. Hodges, D. D. Von Hoff, and E. K. Rowinsky. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood*, 91 :1533–1541, 1998.
- [433] P. R. Gwilt and W. G. Tracewell. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. *Clin. Pharmacokinet.*, 34 :347–358, 1998.
- [434] P. Villani, R. Maserati, M. B. Regazzi, R. Giacchino, and F. Lori. Pharmacokinetics of hydroxyurea in patients infected with human immunodeficiency virus type i. *J. Clin. Pharmacol.*, 36 :117–121, 1996.
- [435] F. C. M. Lopes, R. Ferreira, D. M. Albuquerque, A. A. A. silveira, R. Costa, R. Soares, F. F. Costa, and N. Conran. In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea. *Microvasc. Res.*, 94 :106–113, 2014.

- [436] N. Saban and M. Bujak. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Canc. Chemoth. Pharmacol.*, 64 :213–221, 2009.
- [437] J. Huang, M. Yakubu, D. B. Kim-Shapiro, and S. B. King. Rat liver-mediated metabolism of hydroxyurea to nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 40 :1675–1681, 2006.
- [438] S. S. Santana, T. N. Pitanga, J. M. de Santana, D. L. Zanette, J. J. Vieira, S. C. M. A. Yahouédéhou, C. S. A. Adanho, S. M. Viana, N. F. Luz, V. M. Borges, and M. S. Goncalves. Hydroxyurea scavenges free radicals and induces the expression of antioxidant genes in human cell cultures treated with hemin. *Font. Immunol.*, 11 :1–12, 2020.
- [439] L. de Souza Torres, D. G. H. da Silva, E. Belini Junior, E. Alves de Almeida, C. Lopes de Castro Lobo, R. Delfini Cançado, M. A. Ruiz, and C. R. Bonini-Domingos. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 34 :421–425, 2012.
- [440] J. Huang, E. M. Sommers, D. B. Kim-Shapiro, and S. B. King. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 :3473–3480, 2002.
- [441] S. B. King. Mechanisms and novel directions in the biological applications of nitric oxide donors : Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Rad. Biol. Med.*, 37 :737–744, 2004.
- [442] S. L. Maiocchi, J. C. Morris, M. D. Rees, and S. R. Thomas. Regulation of the nitric oxide oxidase activity of myeloperoxidase by pharmacological agents. *Biochem. Pharmacol.*, 135 :90–115, 2017.
- [443] H. S. Rosenkranz, B. Gutter, and Y. Becker. Studies on the developmental cycle of chlamydia trachomatis : Selective inhibition by hydroxyurea. *J. Bact.*, 115 :682–690, 1973.
- [444] R. R. Feiner, J. E. Coward, and H. S. Rosenkranz. Effect of hydroxyurea on staphylococcus epidermidis and micrococcus lysodeikticus : Thickening of the cell wall. *Antimicro. Ag. Chemoth.*, 3 :432–435, 1973.
- [445] G. R. Gale, S. M. Kendall, H. H. Mclain, and S. Dubois. Effect of hydroxyurea on pseudomonas aeruginosa. *Cancer Res.*, 24 :1012–1019, 1964.
- [446] W.-Y. Gao, A. Cara, R. C. Gallo, and F. Lori. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes : A strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90 :8925–8928, 1993.
- [447] J. Lisziewicz, A. Foli, M. Wainberg, and F. Lori. Hydroxyurea in treatment of hiv infection. *Drug Safety*, 26 :605–624, 2003.
- [448] A. Nozaki, K. Numata, M. Morimoto, M. Kondo, K. Sugimori, S. Morita, E. Miyajima, M. Ikeda, N. Kato, S. Maeda, and K. Tanaka. Hydroxyurea suppresses hcv replication in humans : a phase i trial of oral hydroxyurea in chronic hepatitis c patients. *Antivir. Therap.*, 15 :1179–1183, 2010.
- [449] N. Maugeri, G. Giordano, M. P. Petrilli, V. Fraticelli, G. De Gaetano, C. Cerletti S. Storti, and M. B. Donati. Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders : a new effect for an old drug? *J. Thromb. Haemost.*, 4 :2593–2598, 2006.
- [450] S. L. Gerson, P. F. Caimi, B. M. William, and R. J. Creger. Hematology : Basic principles and practice, chapter 57 pharmacology and molecular mechanisms of antineoplastic agent for hematologic malignancies. *Seventh Edition*, Elsevier :849–912, 2018.

- [451] A. Vora, C. D. Mitchell, L. Lennard, T. O. B. Eden, S. E. Kinsey, J. Lilleyman, and S. M. Richards. Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia : a randomised trial. *Lancet*, 368 :1339–1348, 2006.
- [452] M. S. Ebbesen, J. Nersting, J. H. Jacobsen, T. L. Frandsen, K. Vettenranta, J. Abramsson, F. Wesenber, and K. Schmiegelow. Incorporation of 6-thioguanine nucleotides into dna during maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia - the influence of thiopurine methyltransferase genotypes. *J. Clin. Pharmacol.*, 53 :670–674, 2013.
- [453] L. W. Brox, L. Birkett, and A. Belch. Clinical pharmacology of oral thioguanine in acute myelogenous leukemia. *Canc. Chemo. Pharmacol.*, 6 :35–38, 1981.
- [454] H. Karimi-Maleh, A. F. Shojaei, F. Karimi, K. Tabatabaeian, and S. Shakeri. Au nanoparticle loaded with 6-thioguanine anticancer drug as a new strategy for drug delivery. *J. Nanostruct.*, 8 :417–424, 2018.
- [455] M. Stanulla, E. Schaeffeler, A. Möricke, d M. Zimmermann . Buchmann a, S. Igel, K. Schmiegelow, C. Flotho, H. Hartmann, S. Illsinger, A. Sauerbrey, S. V. Junk, P. Schütte, L. Hinze, M. Lauten, S. Modlich, R. Kolb, C. Rossig, G. Schwabe, A. K. Gnekow, G. Fleischhack, P. G. Schlegel, H. J. Schünemann, C. P. Kratz, G. Cario, M. Schrappe, and M. Schwab. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome and short-term application of 6-thioguanine in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 35 :2650–2657, 2021.
- [456] P. N. Munshi, M. Lubin, and J. R. Bertino. 6-thioguanine : A drug with unrealized potential for cancer therapy. *The Oncologist*, 19 :760–765, 2014.
- [457] L. Laera, N. Guaragnella, S. Giannattasio, and L. Moro. 6-thioguanine and its analogs promote apoptosis of castration-resistant prostate cancer cells in a brca2-dependent manner. *Cancers*, 11 :1–15, 2019.
- [458] H.-C. Lin, Y. Kuan, H.-F. Chu, S.-C. Cheng, H.-C. Pan, W.-Y. Chen, C.-Y. Sun, and T.-H. Lin. Disulfiram and 6-thioguanine synergistically inhibit the enzymatic activities of usp2 and usp21. *Int. J. Biol. Macromol.*, 176 :490–497, 2021.
- [459] K. R. Herrlinger, W. Kreisel, M. Schwab, J. Schoelerich, W. R. Fleig, A. Ruhl, M. Reinshagen, P. Deibert, K. Fellermann, R. Greinwald, and E. F. Stange. 6-thioguanine - efficacy and safety in chronic active crohn’s disease. *Aliment. Pharmacol. Therap.*, 17 :503–508, 2003.
- [460] A. Ansari, T. Elliott, F. Fong, M. Arenas-Hernandez, G. Rottenberg, B. Portmann, S. Lucas, A. Marinaki, and J. Sanderson. Further experience with the use of 6-thioguanine in patients with crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 14 :1399–1405, 2008.
- [461] F. Crouwel, M. Simsek, C. J. J. Mulder, H. J. C. Buiter, and N. K. de Boer. Thioguanine therapy in inflammatory bowel diseases. a practical guide. *J. Gastrointestin Liver Dis.*, 29 :1–9, 2020.
- [462] C. Legué, L. Legros, S. Kammerer-Jacquet, C. Jézequel, P. Housel-Debry, T. Uguen, C. Le Lan, A. Guillygomarc’h, R. Moirand, B. Turlin, D. Guyader, and E. Bardou-Jacquet. Safety and efficacy of 6-thioguanine as a second-line treatment for autoimmune hepatitis. *Clin. Gastroent. Hepatol.*, 16 :290–291, 2018.
- [463] G. A. Lepage and J. P. Whitecar Jr. Pharmacology of 6-thioguanine in man. *Cancer Research*, 31 :1627–1631, 1971.

- [464] P. H. Konits, M. J. Egorin, D. A. Van Echo, J. Aisner, P. A. Andrews, M. E. May, N. R. Bachur, and P. H. Wiernik. Phase ii evaluation and plasma pharmacokinetics of high-dose intravenous 6-thioguanine in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 8 :199–203, 1982.
- [465] K. R. Hande. Purine antimetabolites - encyclopedia of cancer. *Second Edition*, Academic Press :515–525, 2002.
- [466] W. A. High and S. E. Wolwerton. Comprehensive dermatologic drug therapy - 19 cytotoxic agents. *Fourth Edition*, Elsevier :209–221, 2021.
- [467] B. Jharap, N. K. H. de Boer, R. M. Vos, K. Smid, A. Zwiers, G. J. Peters, C. J. J. Mulder, A. J. Wilhelm, and A. A. van Bodegraven. Biotransformation of 6-thioguanine in inflammatory bowel disease patients : a comparison of oral and intravenous administration of 6-thioguanine. *Brit. J. Pharmacol.*, 163 :722–731, 2011.
- [468] D. H. Present, B. I. Korelitz, N. Wisch, J. L. Glass, D. B. Sachar, and B. S. Pasternack. Treatment of crohn’s disease with 6-mercaptopurine - a long-term, randomized, double-blind study. *N. Eng. J. Med.*, 302 :981–987, 1980.
- [469] A. Timmer, P. H. Patton, N. Chande, J. W. D. McDonald, and J. K. McDonald. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Coch. Datab. System. Rev.*, Issue 5 :1–39, 2016.
- [470] B. Jharap, M. L. Seinen, J. R. van Ginkel N. K. H. de Boer, R. K. Linskens, J. C. Kneppelhout, C. J. J. Mulder, and A. A. van Bodegraven. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients : Analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm. Bowel Dis.*, 16 :1541–1549, 2010.
- [471] O. A. Shaye, M. Yadegari, M. T. Abreu, F. Poordad, K. Simon, P. Martin, K. A. Papadakis, A. Ippoliti, E. Vasiliauskas, and T. T. Tran. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine (6-mp) and azathioprine (aza) in adult ibd patients. *Am. J. Gastroenterol.*, 102 :2488–2494, 2007.
- [472] B. Bonaz, J. Boitard, P. Marteau, M. Lémann, B. coffin, B. Flourié, J. Belaiche, G. Cadot, E.-H. Metman, a. Cortot, J.-F. Colombel, and Getaid. Thioguanine in patients with crohn’s disease intolerant or resistant to azathioprine/mercaptopurine. *Alim. Pharm. Therap.*, 18 :401–408, 2003.
- [473] N. K. H. de boer, A. A. van Bodegraven, B. Jharap, P. de Graaf, and C. J. J. Mulder. Drug insight : pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with ibd. *Nature Clin. Prat. Gastroent. Hepat.*, 4 :686–694, 2007.
- [474] M. T. Osterman, R. Kundu, G. R. Lichtenstein, and J. D. Lewis. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity : A meta-analysis. *Gastroenterology*, 130 :1047–1053, 2006.
- [475] L. J. J. Derijks, L. P. L. Gilissen, L. G. J. B. Engels, L. P. Bos, P. J. Bus, J. J. H. M. Lohman, S. J. H. van Deventer, D. W. Hommes, and P. M. Hooymans. Pharmacokinetics of 6-thioguanine in patients with inflammatory bowel disease. *Ther. Drug Monit.*, 28 :123–132, 2006.
- [476] N. K. H. de Boer, W. Reinisch, A. Teml, A. A. van Bodegraven, M. Schwab, M. Lukas, T. Ochsenkühn, W. Petritsch, P. Knoflach, S. Almer, S. W. van der Merwe, K. R. Herrlinger, J. Seiderer, H. Vogelsang, and C. J. J. Mulder. 6-thioguanine treatment in inflammatory bowel disease : A critical appraisal by a european 6-tg working party. *Digestion*, 73 :25–31, 2006.

- [477] M. L. Seinen, D. P. van Asseldonk, C. J. J. Mulder, and N. K. H de Boer. Dosing 6-thioguanine in inflammatory bowel disease : Expert-based guidelines for daily practice. *J. Gastrointestin Liver Dis.*, 19 :291–294, 2010.
- [478] S. E. Berends, A. S. Strik, M. Lowenberg, G. R. D’Haens, and R. A. A. Mathot. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the treatment of ulcerative colitis. *Clin. Pharmacokinet.*, 58 :15–37, 2019.
- [479] L. N. Toksvang, M. S. Schmidt, S. Arup, R. H. Larsen, T. L. Frandsen, K. Schmiegelow, and C. U. Rank. Hepatotoxicity during 6-thioguanine treatment in inflammatory bowel disease and childhood acute lymphoblastic leukaemia : A systematic review. *PLoS ONE*, 14 :1–17, 2019.
- [480] J. A. Duley and T. H. J. Florin. Thiopurine therapies - problems, complexities, and progress with monitoring thioguanine nucleotides. *Ther. Drug Monit.*, 27 :647–654, 2005.
- [481] K.-M. Olesen, S. H. Hansen, U. Sidenius, and K. Schmiegelow. Determination of leukocyte dna 6-thioguanine nucleotide levels by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromato. B*, 864 :149–155, 2008.
- [482] S. Cattan, M. Lemann, F. Thuillier, D. Bengoufa, C. Rabian, Y. Ngo, Y. Bohnik, B. Messing, J. C. Rambaud, and R. Modigliani. 6-mercaptopurine levels and study of blood lymphocyte subsets during azathioprine treatment of crohn’s disease. *Gastroent. Clin. Biol.*, 22 :160–167, 1998.
- [483] I. Tiede, G. Fritz, S. Strand, D. Poppe, R. Dvorsky, D. Strand, H. A. Lehr, S. Wirtz, C. Becker, R. Atreya, J. Mudter, K. Hildner, B. Bartsch, M. Holtmann, R. Blumberg, H. Walczak, H. Iven, P. R. Galle, M. R. Ahmadian, and M. F. Neurath. Cd28-dependent rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human cd4+ t lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 111 :1133–1145, 2003.
- [484] M. Neurath. Thiopurines in ibd : What is their mechanism of action? *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*, 6 :435–436, 2010.
- [485] C. Heidelberger, N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin, and J. Scheiner. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179 :663–666, 1957.
- [486] R. J. Rutman, A. Cantarow, and K. E. Paschkis. The catabolism of uracil in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, 210 :321–329, 1954.
- [487] F. Valeriote and G. Santelli. 5-fluorouracil (fura). *Pharmac. Ther.*, 24 :107–132, 1984.
- [488] E. Chu and C. J. Allegra. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Novel Approaches to Selective Treatments of Human Solid Tumors. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 339 :143–151, 1993.
- [489] N. K. Chaudhuri, B. J. Montag, and C. Heidelberger. Studies on fluorinated pyrimidines iii. the metabolism of 5-fluorouracil-2-c14 and 5-fluoroorotic-2-c14 acid in vivo. *Cancer Res.*, 18 :318–328, 1958.
- [490] P. B. Danneberg, B. J. Montag, and C. Heidelberger. Studies on fluorinated pyrimidines iv. effects on nucleic acid metabolism in vivo. *Cancer Res.*, 18 :329–334, 1958.
- [491] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston. 5-fluorouracil : mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, 3 :330–338, 2003.

- [492] D. A. Cameron, H. Gabra, and R. C. F. Leonard. Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Brit. J. Cancer*, 70 :120–124, 1994.
- [493] B. Arica, S. Calis, H. S. Kas, M. F. Sargon, and A. A. Hincal. 5-fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. *Int. J. Pharmaceut.*, 242 :267–269, 2002.
- [494] D. Kelsen. The use of chemotherapy in the treatment of advanced gastric and pancreas cancer. *Sem. Oncol.*, 21 :58–66, 1994.
- [495] J. D. Berlin, S. Adak, D. J. Vaughn, D. Flinker, L. Blaszkowsky, J. E. Harris, and A. B. Al Bowen Benson. A phase ii study of gemcitabine and 5-fluorouracil in metastatic pancreatic cancer : An eastern cooperative oncology group study (e3296). *Oncology*, 58 :215–218, 2000.
- [496] P. Anothra, D. Pradhan, P. K. Naik, G. Ghosh, and G. Rath. Development and characterization of 5-fluorouracil nanofibrous film for the treatment of stomach cancer. *J. Drug Deliv. Sc. Technol.*, 61 :1–9, 2021.
- [497] M. Sabitha, N. Sanoj, Rejinold, A. Nair, V.-K. Lakshmanan, S. V. Nair, and R. Jayakumar. Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. *Carbohydr. Pol.*, 91 :48–57, 2013.
- [498] L. Metterle, C. Nelson, and N. Patel. Intralesional 5-fluorouracil (fu) as a treatment for nonmelanoma skin cancer (nm-sc) : A review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 74 :552–557, 2016.
- [499] S. Vodenkova, T. Buchler, K. Cervena, V. Veskrnova, P. Vodicka, and V. Vymetalkova. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer : Past, present and future. *Pharma. Therap.*, 206 :1–19, 2020.
- [500] C. Terret, E. Erdociain, R. Guimbaud, M. Boisdron-Celle, H. L. McLoed, R. Féty-Deporte, T. Lafont, E. Gamelin, R. Bugat, P. Canal, and E. Chatelut. Dose and time dependencies of 5-fluorouracil pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 68 :270–279, 2000.
- [501] <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/afficheDoc.php?specid=65502207&typedoc=r>. *Site internet de la Base de Données Publique des Médicaments*, Novembre 2022.
- [502] G. D. Heggie, J.-P. Sommadossi, D. S. Cross, W. J. Huster, and R. B. Diasio. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Can. Res.*, 47 :2203–2206, 1987.
- [503] G. Milano and A.-L. Chamorey. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *J. Biol. Med. Rhythm Res.*, 19 :177–189, 2002.
- [504] P. M. G. Soarses, J. M. S. C. Mota, E. P. Souza, P. F. C. Justino, A. X. Franco, F. Q. Cunha, R. A. Ribeiro, and M. H. L. P. Souza. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires il-4. *Cytokine*, 61 :46–49, 2013.
- [505] P. M. G. Soarses, J. M. S. C. Mota, A. S. Gomes, R. B. Oliveira, A. M. S. Assreuy, G. A. C. Brito, A. A. Santos, R. A. Ribeiro, and M. H. L. P. Souza. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Canc. Chemother. Pharmacol.*, 63 :91–98, 2008.
- [506] J. B. Johnston. Mechanism of action of pentostatin and cladribine in hairy cell leukemia. *Leuk. Lymph.*, 52 :43–45, 2011.

- [507] L. Pagano, M. Criscuolo, A. Broccoli, A. Piciocchi, M. Varettoni, E. Galli, A. Anastasia, M. Cantonetti, L. Trentin, S. Kovalchuk, L. Orsucci, A. Frustaci, A. Spolzino, S. Volpetti, O. Annibali, S. Storti, C. Stelitano, F. Marchesi, M. Offidani, B. Casadei, M. E. Nizzoli, M. L. De Luca, L. Fianchi, M. Motta, L. Guarnera, E. Simonetti, A. Visentin, F. Vassallo, M. Deodato, C. Sarlo, A. Olivieri, B. Falini, A. Pulsoni, E. Tiacci, and P. L. Zinzani. Long-term follow-up of cladribine treatment in hairy cell leukemia : 30-year experience in a multicentric italian study. *Blood Cancer J.*, 12 :1–8, 2022.
- [508] L. F. Christensen, A. D. Broom, M. J. Robins, and A. Bloch. Synthesis and biological activity of selected 2,6-disubstituted(2-deoxy-.alpha.-and.beta.-d-erythropentofuranosyl)purines. *J. Med. Chem.*, 15 :735–739, 1972.
- [509] H. M. Bryson and E. M. Sorkin. Cladribine - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in haematological malignancies. *Drugs*, 46 :872–894, 1993.
- [510] G. Jäger, P. Neumeister, R. Brezinschek, T. Hinterleitner, W. Fiebiger, M. Penz, H. J. Neumann, B. Mlineritsch, M. DeSantis, F. Quehenberger, A. Chott, C. Beham-Schmid, G. Höfler, W. Linkesch, and M. Raderer. Treatment of extranodal marginal zone b-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type with cladribine : a phase ii study. *J. Clin. Onc.*, 20 :3872–3877, 2002.
- [511] D. J. Inwards, P. A. S. Fishkin, D. W. Hillman, D. W. Brown, S. M. Ansell, P. J. Kurtin, R. Fonseca, R. F. Morton, M. H. Veeder, and T. E. Witzig. Long-term results of the treatment of patients with mantle cell lymphoma with cladribine (2-cda) alone (95-80-53) or 2-cda and rituximab (n0189) in the north central cancer treatment group. *Cancer*, 113 :108–116, 2008.
- [512] B. M. Jacobs, F. Ammoscato, G. Giovannoni, D. Baker, and K. Schmierer. Cladribine : mechanisms and mysteries in multiple sclerosis. *Neuro-Infl.*, 89 :1266–1271, 2018.
- [513] T. Robak. Cladribine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymph.*, 40 :551–564, 2001.
- [514] J. Liliemark and G. Juliusson. On the pharmacokinetics of 2-chloro-2'-deoxyadenosine in humans. *Canc. Res.*, 51 :5570–5572, 1991.
- [515] J. Liliemark. The clinical pharmacokinetics of cladribine. *Clin. Pharmacokinet.*, 32 :120–131, 1997.
- [516] F. Albertioni J. Liliemark, M. Hassan, and G. Juliusson. On the bioavailability of oral and subcutaneous 2-chloro-2'-deoxyadenosine in humans : alternative routes of administration. *J. Clin. Onc.*, 10 :1514–1518, 1992.
- [517] Z. Stelmasiak, J. Solski, J. Nowicki, B. Jakubowska, M. Ryba, and P. Grieb. Effect of parenteral cladribine on relapse rates in patients with relapsing forms of multiple sclerosis : results of a 2-year, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Mult. Scler. J.*, 15 :767–770, 2009.
- [518] G. Giovannoni, G. Comi, S. Cook, K. Rammohan, P. Rieckmann, P. S. Sorensen, P. Vermersch, P. Chang, A. Hamlett, B. Musch, and S. J. Greenberg. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N. Eng. J. Med.*, 362 :416–426, 2010.
- [519] G. Comi, T. Leist, M. Freedman, B. Cree, P. Coyle, H.-P. Hartung, P. Vermersch, D. Damian, and F. Dangond. Cladribine tablets in the oracle-ms study open-label maintenance period : analysis of efficacy in patients after conversion to clinically definite multiple sclerosis (cdms) (p6.349). *Neurology*, 88, 2017.

- [520] N. De Stefano, A. Giorgio, M. Battaglini, A. De Leucio, C. Hicking, and F. Dangond. Reduced brain atrophy rates are associated with lower risk of disability progression in patients with relapsing multiple sclerosis treated with cladribine tablets. *Mult. Scler. J.*, 24 :222–226, 2017.
- [521] C. B. K. Mathiesen, A. M. Rudjord-Levann, M. Gad, J. Larsen, F. Sellebjerg, and A. E. Pedersen. Cladribine inhibits secretion of pro-inflammatory cytokines and phagocytosis in human monocyte-derived m1 macrophages in-vitro. *Int. Immunopharm.*, 91 :1–6, 2021.
- [522] F. Ayabr, M. J. Perez, M. S. Marcora, M. E. Samman, M. Marrodan, J. M. Pasquini, and J. Correale. 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine) preferentially inhibits the biological activity of microglial cells. *Int. Immunopharm.*, 105 :1–12, 2022.
- [523] R. Balasa, S. Maier, A. Hutanu, S. Voidazan, S. Andone, M. Oiaga, and D. Manu. Cytokine secretion dynamics of isolated pbmc after cladribine exposure in rrms patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 :1–16, 2022.
- [524] A. Jamrzo-Wisniewska, J. Beltowski, G. Wojcicka, H. Bartosik-Psujek, and K. Rejdak. Cladribine treatment improved homocysteine metabolism and increased total serum antioxidant activity in secondary progressive multiple sclerosis patients. *Ox. Med. Cell. Long.*, 2020 :1–7, 2020.
- [525] A. Al-Toma, M. S. Goerres, J. W. R. Meijer, B. M. E. Von Blomberg, P. J. Wahab, J. O. A. M. Kerckhaert, and C. J. J. Mulder. Cladribine therapy in refractory celiac disease with aberrant t cells. *Clin. Gastroent. Hepat.*, 4 :1322–1327, 2006.
- [526] G. J. Tack, W. H. M. Verbeek, A. Al-Toma, D. J. Kuik, M. W. J. Schreurs, O. Visser, and C. J. J. Mulder. Evaluation of cladribine treatment in refractory celiac disease type ii. *World J. Gastroenterol.*, 17 :506–513, 2011.
- [527] R. Alexanian, A. Haut, A. U. Khan, M. Lane, E. M. McKelvey, P. J. Migliore, W. J. Stuckey, and H. E. Wilson. Treatment for multiple myeloma. combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*, 208 :1680–1685, 1969.
- [528] P. Falco, S. Beinghen, I. Avonto, F. Gay, F. Morabito and M. Boccadoro, and A. Palumbo. Melphalan and its role in the management of patients with multiple myeloma. *Exp. Rev. Anticanc. Therap.*, 7 :945–957, 2007.
- [529] F. Maura, N. Weinhold, B. Diamond, D. Kazandjian, L. Rasche, G. Morgan, and O. Landgren. The mutagenic impact of melphalan in multiple myeloma. *Leukemia*, 32 :2145–2150, 2021.
- [530] V. Conteduca, E. Scarpi, A. Farolfi, N. Brighi, L. Rossi, G. Gurioli, C. Lolli, G. Schepisi, S. Bleve, C. Gianni, A. Virga, A. Altavilla, S. L. Burgio, and C. Menna U. De Giorgi. Melphalan as a promising treatment for brca-related ovarian carcinoma. *Front. Oncol.*, 11 :1–8, 2021.
- [531] K. Bielawski, A. Bielawska, K. Sosnowska, W. Milyk, K. Winnicka, and J. Palka. Novel amidine analogue of melphalan as a specific multifunctional inhibitor of growth and metabolism of human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, 72 :320–331, 2006.
- [532] A. Mirkou, B. Vignal, S. Cohen, M. Guillaumont, O. Glehen, and J. Guitton. Assays for the quantification of melphalan and its hydrolysis products in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromat. B*, 877 :3089–3096, 2009.
- [533] T. Loftsson, S. Björnsdóttir, G. Palsdóttir, and N. Bodor. The effects of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the solubility and stability of chlorambucil and melphalan in aqueous solution. *Int. J. Pharmaceut.*, 57 :63–72, 1989.

- [534] M. Koltun, J. Morizzi, K. Katneni, S. A. Charman, D. M. Shackelford, and M. P. McIntosh. Preclinical comparison of intravenous melphalan pharmacokinetics administered in formulations containing either (sbe)7 m-b-cyclodextrin or a co-solvent system. *Bio-pharmaceut. Drug Disp.*, 31 :454–454, 2010.
- [535] W. Mohammed-Saeid, A. H. Karoyo, R. E. Verrall, L. D. Wilson, and I. Badea. Inclusion complexes of melphalan with gemini-conjugated b-cyclodextrin : physicochemical properties and chemotherapeutic efficacy in in-vitro tumor models. *Pharmaceutics*, 11 :1–15, 2019.
- [536] C. A. Celaya, L. F. Hernandez-Ayala, F. B. Zamudio, J. A. Vargas, and M. Reina. Adsorption of melphalan anticancer drug on c24, b12n12, b12c6n6, b6c12n12 and b6c6n12 nanocages : A comparative dft study. *J. Mol. Liquids*, 329 :1–9, 2021.
- [537] K. E. Choi, M. J. Ratain, S. F. Williams, J. A. Golick, J. C. Beschorner, L. J. Fullem, and J. D. Bitran. Plasma pharmacokinetics of high-dose oral melphalan in patients treated with trialkylator chemotherapy and autologous bone marrow reinfusion. *Cancer Res.*, 49 :1318–1321, 1989.
- [538] D. S. Alberts, S. Y. Chang, H.-S. G. Chen, T. L. Evans, and T. E. Moon. Oral melphalan kinetics. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 26 :737–745, 1979.
- [539] A.-K. Taha, R. A. Ahmad, H. Graya nd C. I. Roberts, and H. J. Rogers. Plasma melphalan and prednisolone concentrations during oral therapy for multiple myeloma. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 9 :57–60, 1982.
- [540] E. Sinitsyn, K. Zykov, and A. Rvacheva. The new method of severe covid-19 treatment with inhalations of ultra-low doses of alkylating drug. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 205 :Poster Abstract, 2022.
- [541] E. A. Sinitsyn, A. A. Zykova, R. V. Shamin, A. V. Rvacheva, A. O. Bogatyreva, T. V. Shapovalenko, G. G. Maryin, and K. A. Zykov. Efficacy and safety of ultra-low dose inhaled melphalan in the treatment of hospitalized patients with covid-19. *Acta Biomed. Scient.*, 7 :12–23, 2022.
- [542] A. M. Dudk-Peric, G. B. Ferreira, A. Muchowicz, J. Wouters, N. Prada, S. Martin, S Kiviluoto, M. Winiarska, L. Boon, C. Mathieu, J. van den Oord, M. Stas, M.-L. Gougeon, J. Golab, A. D. Garg, and P. Agostinis. Antitumor immunity triggered by melphalan is potentiated by melanoma cell surface-associated calreticulin. *Cancer Res.*, 75 :1603–1614, 2015.
- [543] A. Showalter, A. Limaye, J. L. Oyer, R. Igarashi, C. Kittipatarin A. J. Copik, and A. R. Khaled. Cytokines in immunogenic cell death : Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine*, 97 :123–132, 2017.
- [544] S.-H. I. Ou, E. L. Kwak, C. Siwak-Tapp, J. Dy, K. Bergethon, J. W. Clark, R. Camidge, B. J. Solomon, R. G. Maki, Y.-J. Bang, D.-W. Kim, J. Christensen, W. Tan, K. D. Wilner, R. Salgia, and A. J. Iafrate. Activity of crizotinib (pf0234166), a dual mesenchymal-epithelial transition (met) and anaplastic lymphoma kinase (alk) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo met amplification. *J. Thor. Oncol.*, 6 :942–946, 2011.
- [545] A. Sahu, K. Prabhash, V. Noronha, A. Joshi, and S. Desai. Crizotinib : A comprehensive review. *South Asian J. Canc.*, 2 :91–97, 2013.
- [546] J. T. Hartmann, M. Haap, H.-G. Kopp, and H.-P. Lipp. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr. Drug Met.*, 10 :470–481, 2009.

- [547] C. Pottier, M. Fresnais, M. Gilon, G. Jérusalem, R. Longuespée, and N. E. Sounni. Tyrosine kinase inhibitors in cancer : breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers*, 12 :1–17, 2020.
- [548] D. F. Heigener and M. Reck. Small molecules in oncology - third edition. *Recent Results in cancer research*, Springer :57–65, 2018.
- [549] J. J. Cui, M. Tran-Dubé, H. Shen, M. Nambu, P.-P. Kung, M. Pairish, L. Jia, J. Meng, L. Funk, I. Botrous, M. McTigue, N. Grodsky, K. Ryan, E. Padrique, G. Alton, S. Timofeevski, S. Yamazaki, Q. Li, H. Zou, J. Christensen, B. Mroczkowski, S. Bender, R. S. Kania, and M. P. Edwards. Structure based drug design of crizotinib (pf-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-met) kinase and anaplastic lymphoma kinase (alk). *J. Med. Chem.*, 54 :6342–6363, 2011.
- [550] W. Okamoto and I. Okamoto, T. Arao, K. Kuwata, E. Hatashita, H. Yamaguchi, K. Sakai, K. Yanagihara, K. Nishio, and K. Nakagawa. Antitumor action of the met tyrosine kinase inhibitor crizotinib (pf-02341066) in gastric cancer positive for met amplification. *Mol. Cancer Ther.*, 11 :1557–1564, 2012.
- [551] J. Ji, W. Chen, W. Lian, R. Chen, J. Yang, Q. Zhang, Q. Weng, Z. Khan, J. Hu, X. Chen, P. Zou, X. Chen, and G. Liang. (s)-crizotinib reduces gastric cancer growth through oxidative dna damage and triggers pro-survival akt signal. *Cell Death Dis.*, 9 :1–15, 2018.
- [552] J. C. Boulos, M. E. M. Saeed, M. Chatterjee, Y. Bulbul, F. Crudo, D. Marko, M. Munder, S. M. Klauck, and T. Efferth. Repurposing of the alk inhibitor crizotinib for acute leukemia and multiple myeloma cells. *Pharmaceuticals*, 14 :1–29, 2021.
- [553] Y. P. Mossé, S. D. Voss, M. S. Lim, D. Rolland C. G. Minard, E. Fox, P. Adamson, K. Wilner, S. M. Blaney, and B. J. Weigel. Targeting alk with crizotinib in pediatric anaplastic large cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor : A children's oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, 35 :3215–3221, 2017.
- [554] J. Kwon and A. Meagher. Crizotinib, a breakthrough for targeted therapies in lung cancer. *J. Adv. Prat. Oncol.*, 3 :267–272, 2012.
- [555] [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xalkori-epar-product-information\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xalkori-epar-product-information_fr.pdf). *Site internet de l'European Medicines Agency*, Janvier 2023.
- [556] Y. Kurata, N. Miyauchi, M. Suno, T. Ito, T. Sendo, and K. Kiura. Correlation of plasma crizotinib trough concentration with adverse events in patients with anaplastic lymphoma kinase positive non-small-cell lung cancer. *J. Pharmaceut. Health Care Sc.*, 1 :1–5, 2015.
- [557] J. H. Foster, S. D. Voss, D. C. Hall, C. G. Minard, F. M. Balis, K. Wilner, S. L. Berg, E. Fox, P. C. Adamson, S. M. Blaney, B. J. Weigel, and Y. P. Mossé. Activity of crizotinib in patients with alk-aberrant relapsed/refractory neuroblastoma : A children's oncology group study (advl0912). *Clin. Cancer. Res.*, 27 :3543–3548, 2021.
- [558] H. Yan, J. Du, X. Chen, B. Yang, Q. He, X. Yang, and P. Luo. Ros-dependent dna damage contributes to crizotinib-induced hepatotoxicity via the apoptotic pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 383 :1–8, 2019.
- [559] P. J. Kraske and A. Brajter-Toth. Electrochemical oxidation of 6-thioguanine. *J. Electroanal. Chem.*, 207 :101–116, 1986.

- [560] J. Zima, J. Barek, and H. Patel. A determination of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine by anodic differential pulse voltammetry. *Analytical Letters*, 22 :435–443, 1989.
- [561] A. A. Ensafi and H. Karimi-Maleh. Modified multiwall carbon nanotubes paste electrode as a sensor for simultaneous determination of 6-thioguanine and folic acid using ferrocenedicarboxylic acid as a mediator. *J. Electroanal. Chem.*, 640 :75–83, 2010.
- [562] H. Beitollahi, S. G. Ivvari, and M. Torkzadeh-Mahani. Voltammetric determination of 6-thioguanine and folic acid using a carbon paste electrode modified with znO-cuO nanoplates and modifier. *Mat. Sc. Eng. C*, 69 :128–133, 2016.
- [563] S. Mohammadi, M. A. Taher, H. Beitollahi, and R. Hosseinzadeh. Voltammetric mixture analysis of 6-thioguanine and folic acid using ionic liquid-carbon paste electrode modified by nano petal-like mows2 and n-(ferrocenylmethylidene)fluoren-2-amine. *J. Electrocheml. Soc.*, 167 :1–9, 2020.
- [564] D. N. Unal, E. Eksin, and A. Erdem. Electrochemical determination of 6-thioguanine and its interaction with dna oligonucleotides using disposable graphite pencil. *Anal. Lett.*, 51 :265–278, 2018.
- [565] N. de-los Santos-alvarez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres, and P. Tunon-Blanco. Catalytic voltammetric determination of cladribine in biological samples. *Electroanalysis*, 15 :441–446, 2003.
- [566] A. D. R. Pontinha, H. E. Satana, V. C. Diculescu, and A. M. Oliveira-Brett. Anodic oxidation of cladribine and in situ evaluation of dna-cladribine interaction. *Electroanalysis*, 23 :2651–2657, 2011.
- [567] S. D. Bukkitgar and N. P. Shetti. Electrochemical behavior of an anticancer drug 5-fluorouracil at methylene blue modified carbon paste electrode. *Mat. Sci. Eng. C*, 65 :262–268, 2016.
- [568] B. Mutharani, P. Ranganathan, and S.-M. Chen. Temperature-reversible switched antineoplastic drug 5-fluorouracil electrochemical sensor based on adaptable thermo-sensitive microgel encapsulated pedot. *Sens. Actu. B Chem.*, 304 :1–12, 2020.
- [569] K. M. Naik, C. R. Ashi, and S. T. Nandibewoor. Anodic voltammetric behavior of hydroxyurea and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine. *J. Electroan. Chem.*, 755 :109–114, 2015.
- [570] J. Barek, J. Matejka, and J. Zima. Polarographic and voltammetric determination of chlorobenzene, benzyl chloride and melphalan. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 57 :450–456, 1992.
- [571] J. Barek, A. Berka, and J. Zima. Determination of melphalan using differential pulse voltammetry. *Anal. Lett.*, 18 :2581–2589, 1985.
- [572] N. F. Atta, A. Galal, and S. M. Azab. Electrochemical morphine sensing using gold nanoparticles modified carbon paste electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 :5066–5081, 2011.
- [573] N. Ermis, L. Uzun, and A. Denizli. Preparation of molecular imprinted electrochemical sensor for l-phenylalanine detection and its application. *J. Electroanal. Chem.*, 807 :244–252, 2017.
- [574] M. Z. Koncic, M. Barbaric, I. Perkovic, and B. Zorc. Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. *Molecules*, 16 :6232–6242, 2011.

- [575] D.-Z. Liu, Y.-S. Lin, and W.-C. Hou. Monohydroxamates of aspartic acid and glutamic acid exhibit antioxidant and aniotensin converting enzyme inhibitory activites. *J. Agric. Food. Chem.*, 52 :2386–2390, 2004.
- [576] S.-S. Yang, K.-T. Cheng, Y.-S. Lin, Y.-W. Liu, and W.-C. Hou. Pectin hydroxamic acids exhibit antioixdant activites in vitro. *J. Agric. Food. Chem.*, 52 :4270–4273, 2004.
- [577] M. Simunovic, I. Perkovic, B. Zorc, K. Ester, M. Kralj, D. Hadjipavlou-Litina, and E. Pontiki. Urea and carbamate derivatives of primaquine : Synthesis, cytostatic and antioxidant activities. *Bioorg. Med. Chem.*, 17 :5605–5613, 2009.
- [578] M.-L. Jelacic, E. Brusac, D. Amidzic Klaric, B. Nigovic, N. Turk, Z. Krznaric, and A. Mornar. Evaluation of dpph free radical scavenging activity by hplc technique : a screening method for drugs and nutrients used in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and colitis*, 13 :Poster Abstract, 2019.
- [579] X. Zou, H. Zhao, Y. Yu, and H. Su. Formation of guanine-6-sulfonate from 6-thioguanine and singlet oxygen : A combined theoretical and experimental study. *J. A. Chem. Soc.*, 135 :4509–4515, 2013.
- [580] T. A. Wani and I. A. Darwish. A novel 96-microwell-based high-throughput spectrophotometric assay for pharmaceutical quality control of crizotinib, a novel potent drug for the treatment of non-small cell lung cancer. *Braz. J. Pharmaceut. Sci.*, 51 :439–449, 2015.
- [581] G. Villarroel-Lecourt, J. Carrasco-Carvajal, F. Andrade-Villalobos, F. Solis-Egana, I. MErino-San Martin, J. Robinson-Duggon, and D. Fuentealba. Encapsulation of chemotherapeutic drug melphalan in cucurbit[7]uril : Effects on its alkylating activity, hydrolysis, and cytotoxicity. *ACS Omega*, 3 :8337–8343, 2018.
- [582] L. M. Kabeya, M. F. Andrade, F. Piatesi, A. E. C. S. Azzolini, A. C. M. Polizello, and Y. M. Lucisano-Valim. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in hypochlorous acid and taurine chloramine scavenging assays : interference of dimethyl sulfoxide and other vehicles. *Anal. Biochem.*, 437 :130–132, 2013.
- [583] U. Burner, P. G. Furtmüller, A. J. Kettle, W. H. Koppenol, and C. Obinger. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J. Biol. Chem.*, 275 :20597–20601, 2000.
- [584] H. B. Dunford and Y. Hsuanyu. Kinetics of oxidation of serotonin by myeloperoxidase compounds i and ii. *Biochem. Cell. Bio.*, 77 :449–457, 1999.
- [585] T. Sato, T. Hongu, M. Sakamoto, Y. Funakoshi, and Y. Kanaho. Molecular mechanisms of n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils : Phospholipase d is dispensable. *Mol. Cell. Biol.*, 33 :136–146, 2013.
- [586] R. Wever and H. Plat. Spectral properties of myeloperoxidase and its ligand complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 661 :235–239, 1981.
- [587] M. Ikeda-Saito, D. A. Shelley, L. Lu, K. S. Booth, W. S. Caughey, and S. Kimura. Salicylhydroxamic acid inhibits myeloperoxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 266 :3611–3616, 1991.
- [588] H. M. Abu-Soud and S. L. Hazen. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 275 :5425–5430, 2000.
- [589] B. Zelent, T. Yano, P.-I. Ohlsson, M. L. Smith, J. Paul, and J. M. Vanderkooi. Optical spectra of lactoperoxidase as a function of solvent. *Biochem.*, 44 :15953–15959, 2005.

- [590] C. J. van Dalen and A. J. Kettle. Substrates and products of eosinophil peroxidase. *Biochem. J.*, 358 :233–239, 2001.
- [591] C. Stancu and A. Sima. Statins : mechanism of action and effects. *J Cell. Mol. Med.*, 5 :378–387, 2001.
- [592] E. Istvan. Statin inhibition of hmg-coa reductase : a 3-dimensial view. *Atheroscl. Suppl.*, 4 :3–8, 2003.
- [593] A. Endo. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc. Jpn. Acad. Scr. B*, 86 :484–493, 2010.
- [594] E. Delavallée. Effets pléiotropiques et perspectives thérapeutiques des statines dans le domaine cardiovasculaire. *Thèse de doctorat*, Université de Lorraine, 2012.
- [595] M. Kuroda, Y. Tsujita, K. Tanzawa, and A. Endo. Hypolipidemic effects in monkeys of ml-236b, a competitive inhibitor of 3-hydrox-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Lipids*, 14 :585–589, 1979.
- [596] Y. Tsujita, M. Kuroda, K. Tanzawa, N. Kitano, and A. Endo. Hypolipidemic effects in dogs of ml-236b, a competitive inhibitor of 3-hydrox-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Atheroscl.*, 32 :307–313, 1979.
- [597] H. Mabuchi, T. Haba, R. Tatami, S. Miyamoto, Y. Sakai, T. Wakasugi, A. Watanabe, J. Koizumi, and R. Takeda. Effects of an inhibitor of 3-hydrox-3-methylglutaryl coenzyme a reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hypercholesterolemia. *N. Eng. J. Med.*, 305 :478–482, 1981.
- [598] A. W. Alberts. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am. J. Cardiol.*, 62 :j10–j15, 1988.
- [599] R. Bakri, J. Wang, A. S. Wierzbicki, and D. Goldsmith. Cerivastatin monotherapy-induced muscle weakness, rhabdomyolysis and acute renal failure. *Int. J. Cardiol.*, 91 :107–109, 2003.
- [600] M. J. Blaha and S. S. Martin. How do statins work? changing paradigms with implications for statin allocation. *J. Am. Coll. Cardio.*, 62 :2392–2394, 2013.
- [601] <https://kce.fgov.be/fr/does-je-prendre-des-m> Site internet du Centre Fédéral d'expertise, Avril 2022.
- [602] R. Kaspera, S. B. Naraharisetti, B. Tamraz, T. Sahele, M. J. Cheesman, P.-Y. Kwok, K. Marcianite, S. R. Heckbert, B. M. Psaty, and R. A. Totah. Cerivastatin in vitro metabolism by cyp2c8 variants found in patients experiencing rhabdomyolysis. *Pharmacogenet. Genomics*, 20 :619–629, 2010.
- [603] Y. Saito. Pitavastatin : An overview. *Atheroscler. Suppl.*, 12 :271–276, 2011.
- [604] A. Luvai, W. Mbagaya, A. S. Hall, and J. H. Barth. Rosuvastatin : A review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. *Clin. Med. Insights Cardiol.*, 6 :17–33, 2012.
- [605] T. Prueksaritanont, B. Ma, and N. Yu. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by cyp34, and not cyp2d6. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 56 :120–124, 2003.
- [606] <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/statines>. Site internet du Collège National de Pharmacologie Médicale, Mars 2023.

- [607] K. J. Cooper, P. D. Martin, A. L. Dane, M. J. Warwick, D. W. Schneck, and M. V. Cantarini. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 73 :322–329, 2003.
- [608] D. W. Schneck, B. K. Birmingham, J. A. Zalikowski, P. D. Mitchell, Y. Wang, P. D. Martin, K. C. Lasseter, C. D. A. Brown, A. S. Windass, and A. Raza. Effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 75 :455–463, 2004.
- [609] C. Kyrklund, J. T. Backman, M. Neuvonen, and P. J. Neuvonen. Gemfibrozil increases plasma pravastatin concentrations and reduces pravastatin renal clearance. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 73 :538–544, 2003.
- [610] C. Kyrklund, J. T. Backman, K. T. Kivisto, M. Neuvonen, J. Laitila, and P. J. Neuvonen. Rifampin greatly reduces plasma simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 68 :592–597, 2000.
- [611] J. T. Backman, H. Luurila, M. Neuvonen, and P. J. Neuvonen. Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 78 :154–167, 2005.
- [612] R. S. Rosenson. Statins in atherosclerosis : lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis*, 173 :1–12, 2004.
- [613] C. L. Grines. The role of statins in reversing atherosclerosis : What the latest regression studies show. *J. Interv. Cardio.*, 19 :3–9, 2006.
- [614] M. A. Albert, E. Danielson, N. Rifai, and P. M. Ridker. Effect of statin therapy on c-reactive protein levels - the pravastatin inflammation/crp evaluation (prince) : a randomized trial and cohort study. *JAMA*, 286 :1–11, 2001.
- [615] K. A. Eccles, H. Sowden, K. E. Porter, S. M. Parkin, S. Homer-Vanniasinkam, and A. M. Graham. Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow. *Atheroscl.*, 200 :69–79, 2008.
- [616] F. Franzoni, A. Quinones-Galvan, F. Regoli, E. Ferrannini, and F. Galetta. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *Int. J. Cardiol.*, 90 :317–321, 2003.
- [617] M. N. A. Rahman and A. A. M. Abdelmotelb. Study of atorvastatin in experimental allergic airway inflammation in mice. *Int. Immunopharmacol.*, 11 :1090–1094, 2011.
- [618] S. Wassmann, U. Laufs, K. Müller, C. Konkol, K. Ahlbory, A. T. Bäumer, W. Linz, M. Böhm, and G. Nickening. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22 :300–305, 2002.
- [619] F. K. Alanazi. Pravastatin provides antioxidant activity and protection of erythrocytes loaded primaquine. *Int. J. Med. Sci.*, 7 :358–365, 2010.
- [620] M. Kassan, M. J. Montero, and M. A. Sevilla. In vitro antioxidant activity of pravastatin provides vascular protection. *Europ. J. Pharmacol.*, 630 :107–111, 2010.
- [621] H. Bagheri, F. Ghasemi, G. E. Barreto, T. Sathyapalan, T. Jamialahmadi, and A. Sahabkar. The effects of statins on microglial cells to protect against neurodegenerative disorders : A mechanistic review. *BioFactors*, 46 :309–325, 2020.
- [622] X. Xu, W. Gao, S. Cheng, D. Yin, F. Li, Y. Wu, D. Sun, S. Zhou, D. Wang, Y. Zhang, R. Jiang, and J. Zhang. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.*, 14 :1–15, 2017.

- [623] J. Zhang, X. Shi, Z. Chen, L. Wei, L. Tan, Y. Chen, H. Feng, Q. Chen, and G. Zhu. Simvastatin reduces neutrophils infiltration into brain parenchyma after intracerebral hemorrhage via regulating peripheral neutrophils apoptosis. *Front. Neurosci.*, 12 :1–13, 2018.
- [624] H. Zhang, S. Sang, H. Xu, L. Piao, and X. Liu. Lovastatin supresses bacterial therapy-induced neutrophils recruitment to the tumor by promotin neutrophil apoptosis. *J. Funct. Foods*, 86 :1–9, 2021.
- [625] A. R. Afshari, H. Mollazadeh, N. C. Henney, T. Jamialahmad, and A. Sahebkar. Effects of statins on brain tumors : a review. *Sem. Canc. Biol.*, 73 :116–133, 2021.
- [626] U. K. Khanzada, O. E. Pardo, C. Meier, J. Downward, M. J. Seckl, and A. Arcaro. Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective functions of ras isoforms in growth factor signalling. *Oncogene*, 25 :877–887, 2006.
- [627] K. Kozar, R. Kaminski, M. Legat, M. Kopec, D. Nowis, J. S. Skierski, M. Koronkiewicz, M. Jakobisiak, and J. Golab. Cerivastatin demonstrates enhanced antitumor activity against human breast cancer cell lines when used in combination with doxorubicin or cisplatin. *Int. J. Oncol.*, 24 :1149–1157, 2004.
- [628] C. Müller, A. G. Bockhorn, S. Klusmeier, M. Kiehl, C. Roeder, H. Kalthoff, and O. M. Koch. Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type k-ras oncogene but has different effects on protein phospharylation and induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.*, 12 :717–740, 1998.
- [629] S. Komorsky-Lovric and B. Nigovic. Electrochemical characterization of simvastatin by abrasive stripping and square-wave voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, 593 :125–130, 2006.
- [630] P. T. Pinar, T. Tuluk, and Z. Sentürk. Determination of pravastatin drug formulation by square-wave voltammetry on glassy carbon electrode. *DEU FMD*, 22 :29–35, 2020.
- [631] J. C. Abbar and S. T. Nandibewoor. Voltammetric oxidation and determination of atorvastatin based on the enhancement effect of cetyltrimethyl ammonium bromide at carbon paste electrode. *Coll. Surf. B Biointerf.*, 106 :158–164, 2013.
- [632] N. Erk. Development of electrochemical methods for determination of atorvastatin and analytical application to pharmaceutical products and spiked human plasma. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 34 :1–7, 2004.
- [633] L. Karadurmus, S. Kurbanoglu, B. Uslu, and S. A. Ozkan. Differential pulse voltammetric determination of rosuvastatin via glassy carbon electrode. *Rev. Roum. Chim.*, 62 :579–586, 2017.
- [634] B. Razavi, S. B. Abdelmelek, W. Song, K. E. O’Shea, and W. J. Cooper. Photochemical fate of atorvastatin (lipitor) in simulated natural waters. *Wat. Res.*, 45 :625–631, 2011.
- [635] M.-C. Marguery, N. Chouini-Lalanne, C. Drugeon, A. Gadroy, P. Bayle, F. Journe, J. Bazex, and M. D’Incan. Uv-b phototoxic effects induced by atorvastatin. *Arch. Dermatol.*, 142 :1065–1086, 2006.
- [636] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, and B. A. El-Zeiny. Three different spectrophotometric methods manipulating ratio spectra for determination of binary mixture of amlodipine and atorvastatin. *Spectrochim. Acta Part A*, 83 :140–148, 2011.
- [637] M. Wang, J. Li, H. Shi, D. Miao, Y. Yang, L. Qian, and S. Gao. Photolysis of atorvastatin in aquatic environment : Influencing factors, products, and pathways. *Chemosphere*, 212 :467–475, 2018.

- [638] M. Wang, X. Xiang, Y. Zuo, J. Peng, K. Lu, C. Dempsey, P. Liu, and S. Gao. Singlet oxygen production abilities of oxidated aromatic compounds in natural water. *Chemosphere*, 258 :1–9, 2020.
- [639] E. Climent, D. Benaiges, and J. Pedro-Botet. Hydrophilic or lipophilic statins? *Front. Cardiovasc. Med.*, 8 :1–11, 2021.
- [640] S. Delbosc, M. Morena, F. Djouad, C. Ledoucen, B. Descomps, and J.P. Cristol. Effects of statins on brain tumors : a review. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 40 :611–617, 2002.
- [641] J. Bouitbir, G. M. Sanvee, M. V. Panajatovic, F. Singh, and S. Krähenbühl. Mechanisms of statin-associated skeletal muscle-associated symptoms. *Pharmacol. Res.*, 154 :1–12, 2020.
- [642] K. Omura. Rapid conversion of phenols to p-benzoquinones under acidic conditions with lead dioxide. *Synthesis*, 8 :1145–1148, 1998.
- [643] F. M. Menger and D. Carnahan. Comparison of phenolic couplings on  $\text{kmno}_4$  and  $\text{k}_2\text{mno}_4$ . *J. Organ. Chem.*, 50 :3927–3928, 1985.
- [644] Y. Nishinaka, Y. Aramaki, H. Yoshida, H. Masuya, T. Sugawara, and Y. Ichimori. A new sensitive chemiluminescence probe, l-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochem Biophys. Res. Comm.*, 193 :554–559, 1993.
- [645] T. Franck, S. Kohlen, G. Deby-Dupont, S. Grulke, C. Deby, and D. Serteyn. A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in vitro test. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18 :326–334, 2006.
- [646] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, and A.J. Olson. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 19 :1639–1662, 1998.
- [647] W. L. DeLano. Pymol. *DeLanoScientific*, pages San Carlos, CA, 700, 2002.
- [648] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, and J.M. Thornton. Ligplot : a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng. Des. And Selec.*, 8 :127–134, 1995.
- [649] F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, and R. Méallet-Renault. *Electrochimie - Des concepts aux applications*. Dunod, Paris, 2005.
- [650] H. H. Jaffé and M. Orchin. *Theory and applications of Ultraviolet Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Paris, 1962.
- [651] J. Colin. Mise en évidence, par spectroscopies de résonance paramagnétique électronique et d'absorption électronique uv-visible, de la formation de radicaux tryptophanyles et tyrosyles par transfert d'électron intramoléculaire vers l'hème dans les catalases monofonctionnelles et peroxydases bifonctionnelles. *Thèse de doctorat*, page Université Pierre et Marie Curie, 2010.
- [652] C. N. R. Rao. *Ultra-violet and visible spectroscopy Chemical applications*. Butterworths, 1961.
- [653] M. Rubio, B. O. Roos, L. Serrano-Andrés, and M. Merchan. Theoretical study of the electronic spectrum of magnesium-porphyrin. *J. Chem. Physics*, 110 :7202–7209, 1999.
- [654] V. A. Mashenkov, K. N. Solov'ev, and G. D. Egorova. Influence of structural factors on the spectral and luminescence properties of metalloporphyrins. *J. Appl. Spectrosc. (Zhurnal Prikladnoi spektroskopii)*, 5 :202, 1966.

- [655] <http://www1.lasalle.edu/prushan/absJuillet> 2023.
- [656] B. Zelent, A. D. Kaposi, N. V. Nucci, K. A. Sharp, S. D. Salosto, W. W. Wright, and J. M. Vanderkooi. Water channel of horseradish peroxidase studied by the charge-transfer absorption band of ferric heme. *J. Phys. Chem. B.*, 108 :10317, 2004.
- [657] L. A. Marquez, J. T. Huang, and H. B. Dunford. Spectral and kinetic studies on the formation of myeloperoxidase compounds i and ii : roles of hydrogen peroxide and superoxide. *Biochemistry*, 33 :1447–1454, 1994.
- [658] T. V. Vakhrusheva, A. V. Sokolov, G. D. Moroz, V. A. Kostevich, N. P. Gorbunov, I. P. Smirnov, E. N. Grafkaia, I. A. Latsis, O. M. Panasencko, and V. N. Lazarev. Effects of synthetic short cationic antimicrobial peptides on the catalytic activity of the myeloperoxidase, reducing its oxidative capacity. *Antioxidants*, 11 :1–22, 2022.
- [659] N. M. Atherton. *Principles of electron spin resonance*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall - Physical Chemistry Series, 1993.
- [660] M. Hoebeke. La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. *Cours de master en sciences physiques, Université de Liège*, 2022.
- [661] P. Bertrand. *La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique - Fondements*. EDP Sciences, 2014.
- [662] W. R. Hagen. *Biomolecular EPR Spectroscopy*. CRC Press, Boca Raton, 2009.
- [663] J. N. Junk. *Assessing the functional structure of molecular transporters by EPR spectroscopy*. Springer, 2012.
- [664] J. Peisach, W. E. blumberg, S. Ogawa, E. A. Rachmilewitz, and R. Oltzik. The effects of protein conformation on the heme symmetry in high spin ferric heme proteins as studied by electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.*, 246 :3342–3355, 1971.
- [665] K. M. Nash, A. Rockenbauer, and F. A. Villamena. Reactive nitrogen species reactivities with nitrones : Theoretical and experimental studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 :1816, 2004.
- [666] A. Samouilov, V. Roubaud, P. Kuppusamy, and J. L. Zweier. Kinetic analysis-based quantitation of free radical generation in epr spin trapping. *Anal. Biochem.*, 34 :145, 2004.
- [667] E. G. Janzen. Spin trapping. *Acc. Chem. Res.*, 4 :31–40, 1971.
- [668] K. Rangelova and R. P. Mason. The fidelity of spin trapping with dmpo in biological systems. *Magn. Reson. Chem.*, 49 :152, 2011.
- [669] L.-Y. Zang and H. P. Misra. Epr kinetic studies of superoxide radicals generated during the autoxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium, a bioactivated intermediate of parkinsonian-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Biol. Chem.*, 267 :23601–23608, 1992.
- [670] A. Arrault. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques cox-2 et ppar gamma. *Thèse de doctorat*, page Université d'Orléans, 2007.
- [671] T. Pantsar and A. Poso. Binding affinity in docking : fact and fiction. *Molecules*, 23 :1–11, 2018.
- [672] <https://www.rcsb.org/>. *Site de la protéine data bank*, Juillet 2023.

- [673] N. Férey, G. Bouyer, C. Martin, A. Drif, P. Bourdot, M. Ammi, J. Nelson, J.-M. Burkhart, and L. Autin. Docking de protéines en réalité virtuelle. une approche hybride et multimodale. *Techniques et Sciences informatiques*, 28 :983–1015, 2009.
- [674] S. Ziada. Prédiction des constantes cinétiques de complexes protéine-ligand. *Thèse de doctorat*, page Université d'Orléans, 2019.
- [675] N. Chevrolier. Développement et application d'une approche de docking par fragments pour modéliser les interactions entre protéines at arn simple-brin. *Thèse de doctorat*, pages Université de Paris–Saclay, 2019.
- [676] F. Martz. Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques. *Thèse de doctorat*, page Université Paris Sud, 2014.
- [677] C. E. Cooper and E. Odell. Interaction of human myeloperoxidase with nitrite. *FEBS*, 314 :58–60, 1992.
- [678] H. Hori, R. E. Fenna, S. Kimura, and M. Ikeda-Saito. Aromatic substrate molecules bind at the distal heme pocket of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 269 :8388–8392, 1994.
- [679] J. Moussa, D. A. Lev, K. Boubekeur, M. Noelle Rager, and H. Amouri. A n-dithio-para-benzoquinone metal complex. *Ang. Chem.*, 45 :3854–3858, 2006.
- [680] C. Diaz. Observation of stable 17 e iron (iii) cyclopentadienyl radical complexes. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 44, 1999.
- [681] A. Campanile, K. Morral, M. K. Aljammal, F. Owusu-Kwarteng, E. Tillotson, M. Shabbir, I. Beadham, and J. Morral. Development of a versatile laboratory experiment to teach the metabolic transformation of hydrolysis. *Brit. J. Pharm.*, 1 :106–114, 2016.
- [682] A. Khindaria and S. D. Aust. Epr detection and characterization of lignin peroxidase porphyrin pi-cation radical. *Biochemistry*, 35 :13107–13111, 1996.
- [683] C. Jakopitsch, M. Auer, A. Ivencich, F. Rüker, P. G. furtmüller, and C. Obnger. Total conversion of bifunctional catalase-peroxidase (katg) to monofunctional peroxidase by exchange of a conserved distal side tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 278 :20185–20191, 2003.
- [684] T. Araiso, R. Rutter, M. M. Palcic, L. P. Hager, and H. B. Dunford. Kinetic analysis of compound i formation and the catalatic activity of chloroperoxidase. *Can. J. Biochem.*, 59 :233–236, 1981.