



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude pharmacologique in vitro et ex vivo d'agents vasoactifs

Belle, Ludovic

Award date:
2009

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Etude pharmacologique *in vitro* et *ex vivo* d'agents vasoactifs

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Ludovic BELLE

Janvier 2009

Etude pharmacologique *in vitro* et *ex vivo* d'agents vasoactifs

BELLE Ludovic

Résumé

La thrombose et la claudication intermittente sont deux pathologies cardiovasculaires responsables d'une ischémie. Elles sont caractérisées par une augmentation de la concentration plasmatique en thromboxane A₂, en 8-iso-prostaglandine F_{2α} et en sérotonine responsables, entre autres, d'une vasoconstriction. Des travaux antérieurs à notre étude ont montré que le naftidrofuryl (Praxilène®), antagoniste des récepteur 5-HT₂, est capable d'interférer avec une contraction induite par le thromboxane A₂. Cet effet n'a cependant pas été étudié en détail. L'objectif de ce travail est d'étudier le comportement pharmacologique du naftidrofuryl vis-à-vis du récepteur du thromboxane A₂ (TP)

Dans un premier temps, les effets du naftidrofuryl ont été évalués *ex vivo* dans un modèle de contractions de la musculature lisse d'aortes de rats, riches en récepteur TP et 5-HT_{2A}, induites par le U-46619, le 8-iso-prostaglandine F_{2α} et la sérotonine. Ces effets ont été comparés à des antagonistes de références du récepteur TP. Les effets des quatre diastéréoisomères du naftidrofuryl ont également été évalués *ex vivo* sur un même modèle de contraction d'aortes isolées.

Les effets du naftidrofuryl ont été évalués *in vitro* sur le récepteur TP après la mise au point d'une méthode standard permettant d'évaluer l'effet de drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite par l'activation de récepteurs couplés à une protéine G_{αq/11}. Ainsi, l'étude des effets du naftidrofuryl sur des cellules surexprimant l'une ou l'autre isoforme du récepteur TP (HEK 293) a permis d'étudier une éventuelle sélectivité de la drogue. Une étude sur des cellules issues de la musculature lisse d'une aorte humaine (HVSMC) a également été réalisée.

Les résultats obtenus montrent que le naftidrofuryl prévient la vasoconstriction en se liant à la fois aux récepteurs TP et 5-HT_{2A}, avec néanmoins une intensité moindre vis-à-vis des récepteurs TP. Le BM-520 et le SQ-29548, deux antagonistes puissants des récepteurs TP, sont les plus actifs. Les 4 diastéréoisomères du naftidrofuryl possèdent par ailleurs une activité myorelâchante semblable l'un par rapport à l'autre dans ce modèle. Enfin, l'effet antagoniste des récepteurs TP du naftidrofuryl est néanmoins responsable à forte dose d'une diminution de la mobilisation de calcium intracellulaire. En conclusion, les effets vasoactifs du naftidrofuryl sont principalement médiés par ses propriétés antisérotoninergiques et, dans une moindre mesure par ses propriétés antagonistes du récepteur TP.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: J-M. Dogné **Co-Promoteur:** N. Caron

Remerciements

Au terme de ce mémoire, j'ai le plaisir d'adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail de fin d'études. Je tiens, tout d'abord à remercier le professeur Jean-Michel Dogné pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire. Je le remercie pour son accueil, ses précieux conseils, ses commentaires enrichissants et constructifs ainsi que pour son enthousiasme et son optimisme. Encore merci !

Je tiens également à remercier le Docteur Stéphanie Rolin qui a su me guider au mieux tout au long de ce projet. Je tiens également à la remercier pour son encadrement, son optimisme, sa disponibilité et ses nombreuses corrections.

Je tiens également à remercier Séverine Robert. Ses conseils et ses remarques avisés m'ont été d'une aide précieuse dans la réalisation de travail. Je la remercie également pour toutes ses corrections tout au long de la partie rédactionnelle. Merci également pour ton enthousiasme et ton optimisme.

Je remercie également le Département de Pharmacie pour le matériel et l'aide qu'ils m'ont fournis mais également pour l'atmosphère de travail agréable.

Ma gratitude va également à Christophe pour toutes nos heures de discussion passées à s'entre-aider, se rassurer et se motiver. Je tiens également remercier d'autres mémorants qui se reconnaîtront pour leur soutien et leur bonne humeur tout au long de cinq années d'études.

A mes parents qui m'ont permis de réaliser ces études et qui m'ont toujours encouragés et fait confiance. Je remercie également toute ma famille pour son soutien moral et son réconfort omniprésent tout au long de ces études.

Enfin, je tiens également à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail. D'emblée, je vous souhaite à tous une lecture agréable.

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

[]F : concentration finale

8-iso-PGF_{2α} : 8-isoprostaglandine F_{2α}

ADNc : ADN complémentaire

ADP : Adénosine diphosphate

AM : Acétoxyméthylester

AMP : Adénosine monophosphate

COX : Cyclooxygénase

DAG : Diacylglycérol

EC₅₀ : concentration en agoniste requise pour atteindre 50% du tonus maximal de l'aorte contractée

EC'₅₀ : concentration en agoniste induisant 50% de la mobilisation du calcium intracellulaire maximale

F_{basal} : Fluorescence basale

F_{max} : Fluorescence maximale

F_{min} : Fluorescence minimale

F_{stimulé} : Fluorescence stimulée

HEK 293 : *Human Embryonic Kidney Cells*

HVSMC : *Human Vascular Smooth Muscle Cells*

IC₅₀ : concentration en drogue inhibant 50% de la libération de calcium maximale induite par les différents inducteurs

IC'₅₀ : défini comme la concentration en drogue réduisant de 50% de la tension maximale de l'aorte induite par le 5-HT 2 μM

IC₉₅ : Intervalle de confiance à 95%

ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule*

IP₃ : Inositol triphosphate

ISRS: Inhibiteur Spécifique de la Recapture de la Sérotonine

JAK: Janus Kinase

MAO: Monoamine oxydase

MAP Kinase: *Mitogen activated protein Kinase*

NO: *Nitric oxide*

PAD: *Peripheral arterial disease*

PG: Prostaglandine

PGG₂: Prostaglandine G₂

PGH₂: Prostaglandine H₂

PGI₂: Prostacycline

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

PKC: Protéine Kinase C

PLA₂ : Phospholipase A₂

PLC : Phospholipase C

R_{max} : Ratio des fluorescences maximales

R_{\min} : Ratio des fluorescences minimales
ROS : *Reactive Oxygen Species*
 $R_{\text{stimulé}}$: Ratio des fluorescences stimulées
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α*
TPH: Tryptophane hydroxylase
TXA₂: Thromboxane A₂
TXB₂: Thromboxane B₂
TXRA: *Thromboxane Receptor Antagonist*
TXS: Thromboxane synthétase
TXSI: *Thromboxane Synthase Inhibitor*
VCAM : *Vascular Cell Adhesion Molecule*

Tables des matières

I. Introduction	12
<i>I.1. Médiateurs dérivés de l'acide arachidonique</i>	12
I.1.1. L'acide arachidonique.....	12
I.1.2. Métabolisme de l'acide arachidonique	12
I.1.2.1. La voie des cyclooxygénases	12
I.1.3. Le thromboxane A ₂	13
I.1.3.1. Dégradation du TXA ₂	13
I.1.3.2. Rôles physiologiques et physiopathologiques du TXA ₂	13
I.1.3.3. Le récepteur au TXA ₂	14
I.1.4. Les isoprostanes	15
I.1.4.1. Formation des isoprostanes.....	15
I.1.4.2. L'isoprostane 8-iso-PGF _{2α}	15
I.1.4.3. Rôles physiologiques et physiopathologiques des isoprostanes	16
<i>I.2. Les modulateurs de la voie du TXA₂</i>	16
I.2.1. Les agonistes du récepteur TP	16
I.2.2. Les inhibiteurs de la TXA ₂ synthétase.....	16
I.2.3. Les antagonistes du récepteur TP.....	17
I.2.4. Les agents mixtes.....	17
I.2.5. Développement de nouvelles molécules	18
<i>I.3. La sérotonine</i>	18
I.3.1. Découverte de la sérotonine.....	18
I.3.2. Biosynthèse de la sérotonine.....	19
I.3.3. La tryptophane hydroxylase.....	19
I.3.4. Dégradation de la sérotonine.....	19
I.3.5. Les récepteurs à la sérotonine	20
I.3.6. Rôles physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine	21
<i>I.4. Les modulateurs du récepteur 5-HT_{2A}</i>	22
<i>I.5. La thrombose</i>	23
I.5.1. Définition.....	23

I.5.2. La thrombose artérielle	24
I.5.3. Médiateurs impliqués dans le phénomène de thrombose artérielle	24
I.5.4. Stratégies thérapeutiques utilisées dans le cadre de la thrombose artérielle	25
<i>I.6. La claudication intermittente</i>	<i>25</i>
I.6.1. Définition	25
I.6.2. Physiopathologie et médiateurs impliqués.....	26
I.6.3. Stratégies thérapeutiques utilisées dans la claudication intermittente	26
<i>I.7. Objectifs</i>	<i>27</i>
II. Matériels et méthodes.....	29
<i>II.1. Contraction d'organes isolés.....</i>	<i>29</i>
II.1.1. Description du système.....	29
II.1.2. Préparation de l'aorte de rat.....	29
II.1.3. Préparation des milieux, drogues et réactifs	30
II.1.4. Essai.....	30
II.1.5. Expression des résultats.....	31
<i>II.2. Relaxation d'organes isolés</i>	<i>31</i>
II.2.1. Préparation de l'aorte de rat.....	31
II.2.2. Préparation des milieux, drogues et réactifs	31
II.2.3. Essai.....	31
II.2.4. Expression des résultats.....	32
<i>II.3. Culture cellulaire</i>	<i>32</i>
II.3.1. Lignée cellulaire	32
II.3.2. Matériel.....	32
II.3.3. Méthode.....	33
<i>II.4. Mise au point du protocole du dosage de calcium dans les cellules HEK 293 grâce au Fluo-4 AM</i>	<i>33</i>
II.4.1. Matériel.....	33
II.4.2. Méthode.....	33
II.4.2.1. Préparation des cellules	33
II.4.2.2. Dosage du calcium intracellulaire : principe général.....	34

II.4.2.3. Détermination de la concentration cellulaire de la suspension dans les cellules HEK 293 TP α et TP β	34
II.4.2.4. Détermination de la concentration en Fluo-4 AM dans les cellules HEK 293 TP α et TP β	34
II.4.2.5. Détermination du temps de mesure suite à la stimulation des cellules HEK 293 TP α et TP β	34
<i>II.5. Calibration in situ du Fluo-4 AM dans les cellules HEK 293 TPα et TPβ</i>	<i>35</i>
II.5.1. Matériel.....	35
II.5.2. Méthode.....	35
II.5.3. Expression des résultats.....	35
<i>II.6. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser dans les cellules HEK 293 TPα et TPβ.....</i>	<i>36</i>
II.6.1. Matériel.....	36
II.6.2. Méthode.....	36
II.6.3. Expression des résultats.....	36
<i>II.7. Mesure de l'effet des drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TPα et TPβ</i>	<i>37</i>
II.7.1. Matériel.....	37
II.7.2. Méthode.....	37
II.7.3. Expression des résultats.....	37
<i>II.8. Mise au point du protocole du dosage de calcium dans les cellules HVSMC grâce au Fluo-4 AM</i>	<i>37</i>
II.8.1. Matériel.....	37
II.8.2. Méthode.....	38
II.8.3. Détermination de la concentration en Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC	38
<i>II.9. Etude de la compartimentalisation du Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC et les HEK 293 TPβ.....</i>	<i>38</i>
II.9.1. Matériel.....	38
II.9.2. Méthode.....	38
II.9.3. Expression des résultats.....	38
<i>II.10. Etude du leakage du Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC et les cellules HEK 293 TPβ.....</i>	<i>39</i>
II.10.1. Matériel.....	39

II.10.2. Méthode.....	39
<i>II.11. Mise au point du protocole général de dosage du calcium dans les cellules HVSMC grâce au Fura-2 AM.....</i>	<i>39</i>
II.11.1. Matériel.....	39
II.11.2. Méthode.....	39
II.11.3. Détermination de la concentration cellulaire de la suspension dans les cellules HVSMC.....	39
II.11.4. Détermination du temps de mesure suite à la stimulation des cellules HVSMC.....	40
<i>II.12. Calibration in situ du Fura-2 AM dans les cellules HVSMC.....</i>	<i>40</i>
II.12.1. Matériel.....	40
II.12.2. Méthode.....	40
II.12.3. Expression des résultats.....	40
<i>II.13. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser dans les cellules HVSMC.....</i>	<i>41</i>
II.13.1. Matériel.....	41
II.13.2. Méthode.....	41
II.13.3. Expression des résultats.....	41
<i>II.14. Mesure de l'effet des drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HVSMC.....</i>	<i>41</i>
II.14.1. Matériel.....	41
II.14.2. Méthode.....	41
II.14.3. Expression des résultats.....	42
III. Résultats.....	43
<i>III.1. Evaluation ex vivo de l'activité pharmacologique du naftidrofuryl (Praxilène®) et du picotamide sur la contraction de l'aorte de rat.....</i>	<i>43</i>
III.1.1. Contexte de recherche et stratégie scientifique.....	43
III.1.2. Caractérisation de l'activité pharmacologique de différentes drogues sur la contraction d'aorte de rat induite.....	44
III.1.2.1. Principe.....	44
III.1.2.2. Comparaison de l'activité agoniste du U-46619 et du 8-iso-PGF _{2α} vis-à-vis du récepteur TP de la musculature lisse d'aorte de rat.....	45
III.1.2.3. Etude de l'effet du temps de pré-incubation des antagonistes.....	45

III.1.2.4. Effet de différents antagonistes du récepteur TP pré-incubés avec l'aorte sur la contraction musculaire induite par le U-46619	45
III.1.2.5. Effet de différents antagonistes du récepteur TP pré-incubés avec l'aorte sur la contraction musculaire induite par le 8-iso-PGF _{2α}	46
III.1.2.6 Effet du naftidrofuryl et de différents antagonistes du récepteur TP pré-incubés avec l'aorte sur la contraction musculaire induite par le 5-HT.....	47
III.1.3. Caractérisation de l'activité pharmacologique de différents diastéréoisomères du naftidrofuryl sur la contraction de rat induite par le 5-HT	47
III.1.3.1. Principe.....	48
III.1.3.2. Effet des diastéréoisomères du naftidrofuryl sur la contraction de l'aorte.....	48
<i>III.2. Evaluation in vitro de l'activité pharmacologique du naftidrofuryl (Praxilène®) sur la mobilisation du calcium intracellulaire.....</i>	<i>49</i>
III.2.1. Objectifs et démarche scientifique	49
III.2.2. Principe du test	49
III.2.2.1. Définition de la fluorescence.....	49
III.2.2.2. Détection et quantification des ions calcium.....	50
III.2.3. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les cellules HEK 293 TPβ grâce au Fluo-4 AM.....	50
III.2.3.1. Choix de la sonde	51
III.2.3.2. Détermination du nombre de cellules.....	51
III.2.3.3. Détermination de la concentration en Fluo-4 AM.....	52
III.2.3.4. Calibration in situ des cellules HEK 293 TPβ.....	53
III.2.3.5. Détermination du temps de mesure après la stimulation par les agonistes	53
III.2.3.6. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser.....	54
III.2.4. Effet des drogues sur la libération de calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TPβ	54
III.2.5. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les cellules HEK 293 TPα grâce au Fluo-4 AM.....	55
III.2.5.1. Calibration in situ des cellules HEK 293 TPα.....	55
III.2.5.2. Détermination du temps de mesure après la stimulation aux agonistes	55
III.2.5.3. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser.....	56
III.2.6. Effet des drogues sur la libération de calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TPα	56
III.2.7. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les HVSMC grâce au Fluo-4 AM.....	57
III.2.7.1. Etude de la compartimentalisation du Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC et les cellules HEK293 TPβ.....	58
III.2.7.2. Etude du leakage du Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC et les cellules HEK293 TPβ	59

III.2.7.3. Conclusion.....	59
III.2.8. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les cellules HVSMC grâce au <i>Fura-2 AM</i>	60
III.2.8.1. Choix de la sonde	60
III.2.8.2. Détermination du nombre de cellules.....	60
III.2.8.3. Détermination de la concentration en Fura-2 AM.....	61
III.2.8.4. Calibration in situ des cellules HVSMC	61
III.2.8.5. Détermination du temps de mesure après la stimulation aux agonistes	61
III.2.8.6. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser.....	62
III.2.8.7. Effet des drogues sur la libération de calcium intracellulaire dans les cellules HVSMC.....	62
IV. Discussion.....	64
V. Conclusion et perspectives	68
VI. Bibliographie.....	70

I. Introduction

Les maladies cardiovasculaires constituent un problème majeur de santé publique. Parmi ces pathologies, la thrombose et la claudication intermittente occupent une place importante. Ainsi, ces deux maladies induisent une ischémie vasculaire diminuant l'apport en oxygène. Divers travaux ont mis en évidence une implication et une augmentation de la concentration plasmatique de médiateurs comme la sérotonine, le thromboxane A₂ et le 8-iso-prostaglandine F_{2α} dans ces pathologies. La compréhension des mécanismes d'action de ces composés dans ces états pathologiques ainsi que l'étude de leur origine constituent donc un enjeu thérapeutique important.

Dans cette première partie, les différents composés ainsi que leurs rôles biologiques seront décrits. Ensuite, l'implication de ces médiateurs dans la thrombose et la claudication intermittente sera abordée.

I.1. Médiateurs dérivés de l'acide arachidonique

I.1.1. L'acide arachidonique

L'acide arachidonique, ou acide 5, 8, 11, 14-éicosatétraénoïque (**Figure I.1**), est un acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone contenant quatre doubles liaisons. Il constitue un des acides gras formés à partir de la membrane phospholipidique. Cet acide gras essentiel provient directement de l'alimentation ou dérive de l'acide linoléique. Il est le précurseur principal de la famille des éicosanoïdes chez les mammifères. Cette famille comprend les leucotriènes, les époxydes ainsi que les prostanoides.

La libération de l'acide arachidonique est catalysée par des enzymes spécifiques, les phospholipases. La phospholipase A₂ (PLA₂) est la principale enzyme de cette famille jouant un rôle central dans la libération de l'acide arachidonique estérifié au glycérol en position 2 (*Nakahata, 2008*).

I.1.2. Métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique libéré devient le substrat principal de trois voies enzymatiques différentes : la voie des lipooxygénases, générant les leucotriènes ; la voie des époxygénases, engendrant les époxydes ; et la voie des cyclooxygénases, à l'origine des prostanoides (**Figure I.2**).

Seule la dernière voie sera détaillée puisque le thromboxane A₂ (TXA₂), médiateur d'intérêt dans ce travail, appartient à cette dernière famille de composés.

I.1.2.1. La voie des cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COX), ou prostaglandine endoperoxydase synthétases, sont des glycoprotéines membranaires homodimériques catalysant la biosynthèse des prostaglandines (PGs), de la prostacycline (PGI₂) et du TXA₂ (*Hanson, 2007*).

Une seule forme de COX a été initialement décrite (*Bergstroem et al. 1964*). Néanmoins, au début des années 1990, une seconde isoforme fût découverte (*Fu et al., 1990*). La COX-1, caractérisée par une expression constitutive, est présente dans la

plupart des tissus et types cellulaires. La COX-2 est quant à elle exprimée de façon inductible au niveau de certaines cellules du rein (Harris, McKanna *et al.*, 1994), du cortex (Yamagata *et al.*, 1993) et de l'endothélium vasculaire (Cheng *et al.*, 2002). En outre, elle est exprimée lors de situations pathologiques comme l'inflammation (Seibert *et al.*, 1994), la fièvre, le cancer du sein (Hwang *et al.*, 1998).

La COX comporte deux sites catalytiques. Le site cyclooxygénase catalyse dans un premier temps l'oxydation et la cyclisation de l'acide arachidonique par l'insertion de deux molécules d'oxygène. Il en résulte un endoperoxyde instable, la prostaglandine G₂ (PGG₂). Le site peroxydase catalyse ensuite la réduction de la PGG₂ en prostaglandine H₂ (PGH₂), eicosanoïde pivot, précurseur des prostaglandines D₂, E₂ et F_{2α}, du TXA₂ et de la PGI₂ (**Figure I.3**) (Hanson, 2007).

L'isomérisation de la PGH₂ en TXA₂ est catalysée par la thromboxane synthétase (TXS), hémoprotéine appartenant à la famille du cytochrome P450 (Haurand *et al.*, 1985). Dans les années 1990, diverses équipes ont montré la présence d'ARNm de la TXS dans les plaquettes, les macrophages, les monocytes, les leucocytes, les cellules endothéliales et certaines cellules rénales où la synthèse du TXA₂ prédomine (Miyata *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1997).

I.1.3. Le thromboxane A₂

Le thromboxane A₂ est un médiateur cellulaire lipidique appartenant à la famille des éicosanoïdes et produit par les plaquettes (**Figure I.4**). Il est issu du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie des cyclooxygénases.

I.1.3.1. Dégradation du TXA₂

Le TXA₂, médiateur instable, est rapidement hydrolysé en thromboxane B₂ (TXB₂) inactif. En effet, *in vivo*, le temps de demi-vie du TXA₂ est de trente secondes (Hanson, 2007).

Chez l'Homme, le catabolisme du TXA₂ aboutit à la production d'environ 20 composés inactifs en diverses proportions. Au niveau plasmatique, le TXB₂ et le 11-déhydroTXB₂ constituent les principaux métabolites reflétant la production de TXA₂. Tandis qu'au niveau urinaire, ce sont les métabolites 11-déhydroTXB₂ et 2,3-dinorTXB₂ (Catella *et al.*, 1986). Un troisième métabolite de moindre importance a été identifié en 1993, le 11-déhydro-2,3-dinorTXB₂ (Chiabrando *et al.*, 1993) (**Figure I.5**).

I.1.3.2. Rôles physiologiques et physiopathologiques du TXA₂

Le TXA₂ joue un rôle aussi important que diversifié au sein de l'organisme. En effet, ce composé est responsable de la vasoconstriction, de l'activation et de l'agrégation plaquettaire. De plus, le TXA₂ induit également la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses en agissant via les récepteurs TP présents à la surface des cellules musculaires lisses.

La PGI₂, synthétisée au niveau de l'endothélium vasculaire, est l'antagoniste physiologique du TXA₂. Elle est reconnue par un récepteur spécifique appartenant à la famille des récepteurs couplés à des protéines G. Elle inhibe l'activation des plaquettes et induit la relaxation des cellules musculaires lisses.

Par conséquent, l'équilibre entre la production de PGI_2 et de TXA_2 est déterminant pour le maintien de l'homéostasie vasculaire. En effet, de nombreux travaux ont mis en évidence la relation entre une surproduction de TXA_2 responsable de la rupture de cet équilibre et de nombreuses maladies cardiovasculaires et pulmonaires (Hanson, 2007).

La thrombose artérielle, l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral sont les principales conséquences de la rupture ou de l'érosion d'une plaque athéromateuse à l'origine de la formation d'un thrombus artériel occluant la lumière du vaisseau sanguin. De plus, dans le processus d'agrégation plaquettaire, le TXA_2 est un des inducteurs majeurs. Ainsi, de nombreux travaux mettent en évidence une augmentation de TXA_2 chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral consécutifs à une thrombose artérielle. Le développement de molécules capables d'inhiber les effets biologiques du TXA_2 ou sa synthèse constitue dès lors une approche intéressante pour la prévention de ces pathologies (Hanson, 2007).

Il est intéressant de noter que le TXA_2 joue aussi un rôle dans d'autres processus physiopathologiques tels que l'athérosclérose, l'asthme, la pré-éclampsie, l'angine instable, ainsi que dans le développement de certaines formes de cancers (Dogné et al., 2004). Par conséquent, le développement de modulateurs du TXA_2 pourrait s'avérer intéressant dans l'étude, la prévention et/ou le traitement de ces pathologies.

I.1.3.3. Le récepteur au TXA_2

L'action du TXA_2 est médiée par un récepteur spécifique : le récepteur TP. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est ainsi caractérisé par sept domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires.

Cette famille de récepteurs est caractérisée par leur capacité à se coupler à une protéine G hétérodimérique permettant une transduction de signal spécifique responsable de l'activation d'effecteurs cellulaires précis. La protéine G est constituée de trois sous-unités : α , β , γ . La liaison d'un ligand au récepteur va activer ce dernier ; entraînant l'échange d'un GDP contre un GTP par la sous-unité α . Différentes classes de protéines G sont répertoriées: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_{q/11}$. Le récepteur TP est connu pour être couplé à une protéine $G\alpha_{q/11}$.

Dans cette classe, la sous-unité α active la PLC, entraînant l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG). L' IP_3 étant responsable de la libération du calcium (Ca^{++}) des réserves intracellulaires grâce à sa fixation sur son récepteur, tandis que le DAG, qui reste ancré à la membrane, agit comme activateur de la protéine kinase C (PKC) régulant divers processus cellulaires (**Figure I.6**) (Billington et al., 2003).

Le gène codant pour le récepteur TP a été découvert en 1991. Celui-ci code pour une protéine de 343 acides aminés. En 1994, un ADNc de 369 acides aminés codant pour le récepteur TP fut isolé. Cet ADNc est caractérisé par une extrémité C-terminale différente du récepteur TP découvert en 1991. Ce second transcrit est obtenu par épissage alternatif. Par conséquent, ces deux isoformes possèdent 328 acides aminés en commun mais différent par leurs domaines cytoplasmiques C-terminal (Huang et al.,

2004). Ainsi, l'isoforme de 343 résidus est appelé TP α , et est localisée notamment au niveau des plaquettes, tandis que l'isoforme TP β , de 369 résidus, se situe à la surface des cellules endothéliales.

Récemment, *Fam et Morrow* ont démontré que l'acide arachidonique pouvait également être métabolisé de manière non-enzymatique générant ainsi la famille de composés isoprostanoïdes (*Fam et Morrow, 2003*). Ces composés sont générés dans des situations pathologiques où un stress oxydatif joue un rôle important. De plus, en 2001, *Cracowski* rapporte que le TXA₂ et les isoprostanes agiraient tous via le récepteur TP (*Cracowski et al., 2001*). Il est donc essentiel de comprendre également le rôle de cette classe de composés dans diverses situations pathologiques afin de mieux en comprendre les mécanismes et de développer de nouveaux traitements.

I.1.4. Les isoprostanes

A la différence des prostanoides, les isoprostanes résultent de l'oxydation non-enzymatique de l'acide arachidonique (*Fam et Morrow, 2003*) par les ROS.

Les ROS ("Reactive Oxygen Species") sont des radicaux libres capables d'agir comme messagers dans de nombreuses voies physiologiques comme celles du TNF- α , de la leptine et de l'endothéline. La synthèse des ROS est réalisée au niveau de la mitochondrie et est un processus extrêmement régulé par le potentiel membranaire, la concentration en calcium et en monoxyde d'azote (NO) (*Zmijewski et al., 2005*).

I.1.4.1. Formation des isoprostanes

La biosynthèse des isoprostanes se déroule en plusieurs étapes. L'attaque des ROS sur l'acide arachidonique constitue la première étape de cette voie biosynthétique ayant pour conséquence la formation de trois radicaux arachidonyle différents. Ces ROS vont ensuite réagir directement avec l'oxygène donnant naissance à des endoperoxydes intermédiaires isomères de la PGH₂. Ces endoperoxydes vont ensuite être réduits soit de manière totale afin de générer les isoprostanes de la série, soit de manière partielle afin de former les isoprostanes des séries E₂ et D₂. Tous ces isoprostanes sont des isomères des prostaglandines et chaque série est constituée de 4 régioisomères ayant chacun 8 diastéréoisomères théoriques (**Figure I.7**) (*Cracowski et al., 2005*).

I.1.4.2. L'isoprostane 8-iso-PGF_{2 α}

Le 8-iso-PGF_{2 α} est un marqueur de la peroxydation lipidique se réalisant *in vivo*. Ainsi, le dosage urinaire et plasmatique des isoprostanes de la série F₂ et de leurs métabolites renseigne sur l'implication potentielle de phénomènes de stress oxydatifs dans le développement de certaines pathologies comme l'athérosclérose, la thrombose et la claudication intermittente.

L'action du 8-iso-PGF_{2 α} serait partiellement ou totalement médiée par le récepteur TP. En effet, diverses études ont montré que l'action de cet isoprostane était abolie par un antagoniste de ce récepteur (*Kumar et al., 2005*). Cependant, la présence d'un récepteur spécifique au 8-iso-PGF_{2 α} n'est pas encore totalement exclue. Ainsi, un antagoniste du récepteur TP, tel que le SQ-29548, n'inhibe que partiellement la production d'IP₃ générée suite à la liaison du 8-Iso-PGF_{2 α} sur le récepteur TP (*Fukunaga*

et al., 1993). Enfin, il a également été démontré que le 8-iso-PGF_{2α}, en agissant via le récepteur TP, active la protéine kinase A tandis que le TXA₂ active la protéine kinase C. Par conséquent, le 8-iso-PGF_{2α} et le TXA₂ activeraient des voies de transduction du signal différentes (*Leitinger et al.*, 2001).

I.1.4.3. Rôles physiologiques et physiopathologiques des isoprostanes

Le 8-iso-PGF_{2α} est capable, comme le TXA₂, de moduler la vasomotricité. En effet, il peut induire la contraction de cellules musculaires lisses vasculaires, bronchiques, gastro-intestinales et utérines. De plus, il serait caractérisé par un pouvoir mitogène favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses. Enfin, il serait également capable de réguler la synthèse d'endothéline, du TXA₂ et de NO.

Si des taux anormalement élevés en TXA₂ sont renseignés dans divers états pathologiques, il en est de même pour le 8-iso-PGF_{2α} détecté à des concentrations élevées dans l'athérosclérose (*Patrono et al.*, 1997), la claudication intermittente (*Meru et al.*, 2006) et les phénomènes thrombotiques en général (*Loscalzo*, 2003). Ainsi, dans la claudication intermittente, le 8-iso-PGF_{2α} est produit à la suite d'une ischémie induite par un thrombus formé au niveau des artères des membres antérieurs. Le 8-iso-PGF_{2α} est alors capable de se lier au récepteur TP et d'induire la constriction du vaisseau sanguin, réduisant ainsi la lumière du vaisseau et accentuant l'ischémie déjà présente.

I.2. Les modulateurs de la voie du TXA₂

Au vu de l'implication de dérivés de l'acide arachidonique comme le TXA₂ dans divers processus pathologiques, le développement de composés capables de moduler les actions du TXA₂ a été très tôt envisagé. Ces modulateurs sont groupés en trois classes : les inhibiteurs de la thromboxane synthétase, les antagonistes du récepteur TP et les agents mixtes capables d'agir à la fois sur le récepteur et sur l'enzyme. Des agonistes synthétiques du récepteur au TXA₂ existent également ; ils sont utilisés comme outils pharmacologiques.

I.2.1. Les agonistes du récepteur TP

En raison du temps de demi-vie très court du TXA₂ (environ trente secondes), la nécessité de développer des agonistes stables du récepteur TP était indispensable. Le U-46619 (**Figure I.8**), agoniste dont la structure s'apparente le plus à celle du TXA₂, exerce également les mêmes effets biologiques. Cependant, si cette molécule n'est nullement utilisée à des fins thérapeutiques, ses propriétés en font toutefois un agent couramment utilisé dans des études impliquant le récepteur TP.

I.2.2. Les inhibiteurs de la TXA₂ synthétase

Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase (TXSIs) empêchent la conversion du PGH₂ en TXA₂ en inhibant, de manière sélective, l'activité de la thromboxane synthétase tout en maintenant la synthèse des autres métabolites de l'acide arachidonique. Ainsi, la synthèse des prostanoïdes favorables, comme la PGI₂ et la PGE₂, est maintenue. De plus, l'accumulation de PGH₂ permet un transfert partiel de cet endopéroxyde vers l'endothélium vasculaire où il sera transformé en prostacycline.

Différents TXSIs ont été développés dans les années 1980 et testés cliniquement. Le Furegrlate en est un exemple. Malgré ces propriétés avantageuses d'un point de vue théorique, ces composés n'ont pas tenu toutes leurs promesses en clinique. En effet, ils se sont révélés moins actifs que prévu ou parfois même inefficaces. Ces résultats s'expliquent par une accumulation de PGH₂ exerçant les mêmes effets biologiques que le TXA₂ en agissant via le récepteur TP (*Dogné et al., 2000*).

Même si les essais cliniques ont été abandonnés, les TXSIs sont principalement utilisés comme outils pharmacologiques des projets étudiant l'influence du TXA₂ et de sa synthèse en situations pathologiques.

I.2.3. Les antagonistes du récepteur TP

Les antagonistes du récepteur TP (TXRAs) empêchent l'action du TXA₂ ainsi que de la PGH₂ en agissant au niveau du récepteur sans toutefois moduler la synthèse des autres prostaglandines. De plus, en se fixant au récepteur TP, l'antagoniste prévient à la fois les effets biologiques du TXA₂, mais également ceux de la PGH₂, agoniste physiologique du TXA₂, et du 8-iso-PGF_{2α} (*Dogné et al., 2004*).

Le SQ-29548 (**Figure I.9**), dérivant de l'endoperoxyde PGH₂, est un antagoniste de type prostanoloïde du récepteur TP très utilisé dans le cadre d'études pharmacologiques concernant ce récepteur. En effet, cette molécule se lie de manière réversible et hautement spécifique. Il est considéré comme un des plus puissants antagonistes du récepteur TP si bien qu'il fût annoncé comme une molécule thérapeutique prometteuse. Cependant, diverses recherches ont montré que le SQ-29548 constituait une substance mutagène et son développement fût aussitôt arrêté (*Hanson, 2007*).

D'autres classes de TXRAs ont été développées par la suite. Ceux-ci se caractérisent pour la plupart par une structure non-prostanoloïde comme le sulotroban (*Gresele et al., 1984*). D'autres composés ont été synthétisés comme le daltroban et le ramatroban (*Hanson, 2006*).

I.2.4. Les agents mixtes

De nombreuses études ont montré que des molécules présentant à la fois les propriétés des TXRAs et des TXSIs constituent de meilleurs composés modulant les effets biologiques du TXA₂. En effet, l'inhibition de la thromboxane synthétase favorise la synthèse de la prostacycline ; et l'antagonisme vis-à-vis des récepteurs TP permet de bloquer les effets du TXA₂ mais aussi ceux de la PGH₂ et des isoprostanes. Ainsi, de nombreuses molécules rassemblant ces propriétés pharmacologiques ont été synthétisées.

Le picotamide est à la fois un antagoniste du récepteur TP et inhibiteur de la thromboxane synthétase caractérisé par deux cycles de type pyridine fixés à un benzène par une liaison carboxamide (**Figure I.10**). Il remplit son rôle d'inhibiteur de la thromboxane synthétase en remplaçant de manière compétitive la PGH₂, substrat physiologique de cet enzyme. Il agit également de manière compétitive au niveau du récepteur TP. Il a été étudié chez l'Homme pour la première fois en 1978 sur des patients souffrant de pathologies vasculaires chroniques, de claudication intermittente,

de thrombose veineuse profonde, etc... Il est actuellement commercialisé en Italie comme agent antiplaquettaire et antithrombotique (*Gresele et al., 1989, 1990*).

D'autres composés comme le ridogrel et le terbogrel appartiennent également à cette classe (*Carty et al., 2001 ; Fike et al., 2005*).

I.2.5. Développement de nouvelles molécules

En 1992, *Uchida et ses collaborateurs* découvrent que le torasémide, une sulfonylurée, est capable de relaxer une artère coronaire de chien pré-contractée au TXA₂ (*Uchida et al., 1992*). A la suite de cette découverte surprenante, de nombreuses molécules apparentées à ce diurétique ont été synthétisées dans le but d'obtenir des antagonistes du récepteur au TXA₂ plus puissants (*Rolin et al., 2007 ; Dogné et al., 2000, 2004, 2005*). Même s'ils possèdent une structure chimique différente des autres antagonistes de référence, leur activité pharmacologique est proche pour certains du SQ-29548.

Le BM-520 (**Figure I.11**), dérivé du torasémide, montre une excellente affinité vis-à-vis du récepteur TP. Il inhibe ainsi l'activation et l'agrégation des plaquettes induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}. Cette molécule possède une activité myorelaxante sur une aorte de rat pré-contractée par le U-46619 ainsi que par le 8-iso-PGF_{2α} (*Rolin et al., 2007*).

I.3. La sérotonine

La sérotonine (5-HT ou 5-hydroxytryptamine) est une monoamine biogène issue d'un acide aminé, le tryptophane (**Figure I.12**). Elle est très répandue chez les êtres vivants, tant dans le règne animal que végétal. Cette molécule agit à la fois comme une hormone, un neuromédiateur et comme un agent mitogène (*Mohammad-Zadeh et al., 2008*). Le système nerveux, les plaquettes sanguines et les cellules entérochromaffines gastro-intestinales contiennent des concentrations non négligeables en 5-HT (*Hoyer et al., 2002*).

I.3.1. Découverte de la sérotonine

Les premières observations de l'effet du 5-HT remontent à 1868. En effet, les physiologistes tentant de perfuser des organes isolés avec du sérum ont observé une vasoconstriction (*Guignet, 2006*). Par la suite, Page, Rapport et Green parvinrent à isoler en 1948 la substance responsable de ce phénomène et la nommèrent "sérotonine" car ce composé est contenu dans le sérum et est responsable de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires.

Le premier scientifique à avoir travaillé sur le 5-HT fût Vittorio Erspamer en 1930. Il s'intéressait à diverses amines capables d'induire la contraction de cellules musculaires lisses. Cependant, une molécule détectée au niveau des cellules entérochromaffines l'intéressait particulièrement, l'entéramine. En 1951, la synthèse de 5-HT par Hamlin et Fischer démontra que l'entéramine et la sérotonine avaient la même structure (*Whitacker-Azmitia, 1999*).

I.3.2. Biosynthèse de la sérotonine

Le 5-HT est produit en deux étapes à partir d'un acide aminé essentiel, le tryptophane. Tout d'abord, l'hydroxylation du tryptophane par la tryptophane hydroxylase (TPH) permet la production du 5-hydroxytryptophane qui est ensuite décarboxylé pour former le 5-HT (**Figure I.13**) (Clark *et al.*, 1954). L'activité enzymatique de la tryptophane hydroxylase utilise une molécule d'oxygène et nécessite la participation d'un cofacteur, le L-erythro-5, 6, 7, 8-tétrahydrobiopterin, servant de donneur d'électrons (Zhang *et al.*, 2006). L'enzyme de la seconde étape est, quant à elle, dépendante du pyridoxal-5'-phosphate (Guignet, 2006).

L'étape limitante de la production de 5-HT est la première réaction catalysée par la tryptophane hydroxylase. En effet, le K_m de cet enzyme est relativement élevé (3×10^{-5} M) indiquant une faible affinité pour son substrat (Tong *et Kaufman*, 1975). Elle possède également une faible affinité pour les autres acides aminés (Noguchi *et al.*, 1973) et sa localisation est limitée aux tissus nécessitant la présence de 5-HT pour fonctionner (Noguchi *et al.*, 1973 ; Champier *et al.*, 1997).

Des travaux ont également montré que seuls 5% du métabolisme du Tryptophane sert à la synthèse de la sérotonine. Ceci s'explique notamment par la localisation de la tryptophane hydroxylase limitée au cerveau, aux cellules entérochromaffines et aux plaquettes (Mohammad-Zadeh, 2008).

Dès sa synthèse dans le système nerveux central (hypothalamus et mésencéphale), le 5-HT est stocké dans des vésicules avant d'être libéré au niveau des synapses (Tamir *et al.*, 1990). Ce stockage permet d'empêcher la dégradation de la sérotonine par les monoamine oxydases. Cependant, 95% de la sérotonine sont stockés en dehors du système nerveux central dans les cellules entérochromaffines et surtout dans les plaquettes ; ces dernières constituant le site majeur de stockage du 5-HT (Toh, 1954 ; Hardisty *et Stacey*, 1955).

I.3.3 La tryptophane hydroxylase

La tryptophane hydroxylase appartient à la superfamille des hydroxylases d'acides aminés aromatiques. L'activité de ces enzymes nécessite la présence d'un cofacteur, le Fe^{++} , ainsi que d'un co-substrat, la tétrahydrobiopterine.

Récemment, des travaux ont montré que cet enzyme pouvait être codé par deux gènes (Kim *et al.*, 1991). L'isoforme *TPH1* est connue depuis plus de 40 ans tandis que l'isoforme *TPH2* ne fût découverte que récemment. L'isoforme *TPH1* est caractérisée par une expression au niveau des tissus périphériques tandis que la seconde isoforme est exprimée au niveau des neurones sérotoninergiques ainsi qu'au niveau des neurones présents dans l'intestin (Zhang *et al.*, 2006). Cependant, Zill *et al.* ont montré la présence d'ARN messager de l'isoforme *TPH1* dans diverses régions du cerveau humain (Zill *et al.*, 2007).

I.3.4. Dégradation de la sérotonine

La dégradation du 5-HT est principalement réalisée par la voie de la monoamine oxydase (MAO) (**Figure I.14**). L'activité de cet enzyme s'exerce dans différents tissus

comme le cerveau, le tractus gastro-intestinal, les poumons, le foie et les plaquettes. Il existe deux isoformes de MAO, la *MAO-A* et la *MAO-B* (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Soulignons par ailleurs que ces enzymes inactivent aussi d'autres neurotransmetteurs tels la noradrénaline et la dopamine.

En 1981, *Sandler* montra que l'inactivation du 5-HT était principalement réalisée par la *MAO-A* tandis que la dégradation par l'isoforme *MAO-B*, majoritairement présente au niveau des plaquettes, ne représentait qu'une faible partie de la dégradation totale. Le principal produit résultant de l'inactivation de la sérotonine par les *MAO* est l'acide 5-hydroxyindoleacétique, métabolite présent dans les urines. La métabolisation de la sérotonine par la voie des *MAO* est un processus assez rapide. En effet, des travaux ont permis de montrer que 24 heures après l'administration de sérotonine, une excrétion d'acide 5-hydroxyindoleacétique est observée (*Tyce, 1990*).

I.3.5. Les récepteurs à la sérotonine

Les différentes activités du 5-HT sont médiées via un récepteur, le récepteur au 5-HT dont il existe différents types, mais tous dérivent d'un même gène. En outre, le 5-HT étant une molécule très présente dans le règne animal, ses récepteurs se retrouvent abondamment chez les invertébrés et mammifères. La caractérisation de ce récepteur dans de nombreuses espèces animales a permis l'identification de trois sous-types majoritaires : 5-HT₁, 5-HT₂, et le 5-HT₃ (*Peroutka & Howell, 1994*).

Les différents types de récepteurs au 5-HT, excepté le récepteur 5-HT₃, appartiennent à la famille des récepteurs couplés à des protéines G. Il existe 14 types de récepteurs au 5-HT classés en 7 familles, mais de nouveaux sous-types sont constamment découverts ; ce qui augmente progressivement le nombre de récepteurs des différentes familles. Ces récepteurs, à 7 hélices transmembranaires, exercent leur action sur une grande variété de protéines, intracellulaires permettant la transduction du signal, comme l'adenylyl cyclase, la phospholipase C, les canaux voltage-dépendant, etc... (*Nagatomo et al., 2004*).

En raison des implications du récepteur 5-HT_{2A} dans les phénomènes de vasoconstriction et d'agrégation plaquettaire, ce récepteur constitue un intérêt thérapeutique particulier dans des pathologies telles la thrombose et la claudication intermittente.

Le récepteur 5-HT_{2A}, constitué de 471 acides aminés, se trouve en abondance tant dans les tissus périphériques que dans le système nerveux central. Le gène codant pour ce récepteur fait environ 20 kb et est constitué de trois exons séparés par deux introns. Il est localisé chez l'homme au niveau de la région 13q14-q21 (*Nagatomo et al., 2004*). La liaison du 5-HT à ce sous-type de récepteur induit une vasoconstriction, une agrégation plaquettaire et une augmentation de la perméabilité capillaire. Au niveau du cortex, ce récepteur est également responsable de la sécrétion de diverses hormones comme l'acétylcholine, la rénine et la prolactine.

Des études récentes ont montré que le récepteur 5-HT_{2A} est capable d'activer une grande quantité de voies laissant entrevoir une grande diversité dans les réponses cellulaires engendrées par l'activation de ce récepteur (**Figure I.15**). En effet, celui-ci est capable d'activer les PLC et PLA₂ (*Nagatomo et al., 2004*). Pour rappel, une

activation de la PLC engendre une génération d'IP₃ à l'origine d'une mobilisation du calcium intracellulaire. Une activation de la PLA₂ permet l'activation de la cascade de l'acide arachidonique (*Tournois et al., 1998*). Cependant, le type de protéine G couplé au récepteur 5-HT_{2A} générant ces mécanismes est différent. Ainsi, l'activation de la PLC est réalisée grâce à une protéine G_{q/11} tandis que l'activation de la PLA₂ se fait grâce à une G_{αi/o}, initiant la voie Ras-Raf-MEK-ERK, ou par une G_{α12/13} activant p38.

Enfin, il a également été montré que le récepteur 5-HT_{2A} était capable d'activer la voie des Janus Kinases (JAK) ainsi que celle des "mitogen-activated protein" (MAP) kinases permettant la prolifération cellulaire chez les cellules musculaires lisses vasculaires et de réguler l'accumulation de l'AMPC (*Nagatomo et al., 2004*).

I.3.6. Rôles physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine

Le 5-HT exerce ses effets tant au niveau du système nerveux central que dans les tissus périphériques. Il régule divers processus tels que la pression sanguine, la fonction cardiaque, la motilité gastrique et entérique, la nociception et le sommeil (*Nagatomo et al., 2004*).

Il est également connu depuis plus de 40 ans que le 5-HT est capable d'induire l'agrégation plaquettaire (*O'Brien, 1964*) même si le mécanisme de ce phénomène n'est pas encore totalement compris. En outre, la présence de récepteur au 5-HT au niveau des plaquettes a également été démontrée (*De Chaffoy et al., 1987*). Cependant, le 5-HT n'induit l'agrégation plaquettaire que de manière faible et réversible mais son effet est potentialisé en présence d'ADP, de TXA₂ ou de collagène (*Mohammad-Zadeh et al., 2008*). Il semble ainsi que le 5-HT possède un rôle de recrutement de nouvelles plaquettes une fois le processus d'agrégation enclenché. Enfin, cet effet serait médié par le récepteur de type 5-HT_{2A} localisé au niveau de la membrane des plaquettes. En effet, une inhibition de l'agrégation plaquettaire est observée en présence d'antagonistes spécifiques du récepteur 5-HT_{2A} (*Noble et Drake-Holland, 1990*).

Il est intéressant de noter aussi que les premières recherches sur le 5-HT se concentraient sur sa capacité à induire une vasoconstriction. En effet, une stimulation au 5-HT de tissus riches en cellules musculaires lisses induit leur contraction. Cet effet serait médié, comme lors de l'agrégation plaquettaire, par le récepteur 5-HT_{2A} (*De Chaffoy et al., 1987*). De plus, des études réalisées chez l'homme ont permis de démontrer que la libération de 5-HT par les plaquettes induit la vasoconstriction des vaisseaux locaux. Par ailleurs, le 5-HT peut également induire un effet contraire comme une relaxation des cellules musculaires lisses à l'origine d'une vasodilatation. Ce phénomène étant, en partie, la conséquence de la stimulation du récepteur 5-HT₁ (*Janssen et al., 2004*).

En raison de ses propriétés vasoactives et procoagulantes, le 5-HT joue un rôle important au niveau du système cardiovasculaire. Cette molécule est également impliquée dans divers processus pathologiques. En effet, lors de la formation d'un thrombus, le 5-HT libéré par les plaquettes entraîne le recrutement de nouvelles plaquettes capables de sécréter des molécules vasoconstrictrices comme le TXA₂ et du 5-HT. Cet effet va se traduire par un renforcement de l'ischémie provoquée par la présence du thrombus. Par ailleurs, des travaux ont montré une augmentation de la concentration plasmatique en 5-HT chez des patients présentant diverses maladies cardiovasculaires.

Les principaux effets du 5-HT (vasoconstriction, agrégation plaquettaire) en font un candidat idéal comme médiateur dans le développement de la maladie périphérique artérielle (PAD). En effet, l'adhésion des plaquettes au niveau des lésions athéromateuses s'accompagne d'une libération de 5-HT induisant la constriction des vaisseaux sanguins.

Le 5-HT semble aussi impliqué dans d'autres processus pathologiques que nous ne décrirons pas dans ce travail tels que les migraines, les dépressions, les difficultés d'apprentissage, le manque d'appétit, les insomnies (*Guignet, 2006*). Ainsi, la sérotonine ou certains de ses récepteurs spécifiques sont des cibles de nombreux médicaments utilisés dans ces pathologies. A titre d'exemple, les substances qui inhibent spécifiquement la recapture de sérotonine par les neurones constituent la grande classe des inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine (ISRS) dont la Fluoxétine (Prozac[®]) constitue le chef de file. Les ISRS sont préconisés, entre autres, en cas d'anxiété, de trouble obsessionnel compulsif et de troubles de l'alimentation.

Enfin, le 5-HT est également un intermédiaire de la biosynthèse de la mélatonine (**Figure I.13**). Ainsi, la transformation de la sérotonine en mélatonine, qui ne doit pas être considérée comme une dégradation car la mélatonine est également active, s'effectue essentiellement dans la glande pinéale ou épiphyse. Elle comporte deux étapes. Premièrement, l'acétylation de la fonction amine par la N-acétyl transférase conduit à la N-acétyl-sérotonine. Ensuite, la méthylation du groupe OH de cette dernière par l'hydroxyindol-O-méthyltransférase catalysant le transfert d'un groupe méthyl à partir de la S-adénosyl-méthionine permet l'obtention d'acétyl-5-méthoxytryptamine ou mélatonine.

La concentration de mélatonine dans la glande pinéale présente des variations circadiennes ; elle suit les variations de l'activité N-acétyl transférase. Ainsi, elle augmente pendant la nuit et diminue pendant la journée ; la lumière du jour inhibant la biosynthèse de mélatonine. L'obscurité et la lumière jouant le rôle de régulateur par l'intermédiaire des catécholamines.

Elle est aussi impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance des cheveux, la pigmentation, la protection des cellules de la peau contre les UVs, etc... (*Slominski et al., 2005*).

1.4. Les modulateurs du récepteur 5-HT_{2A}

Le 5-HT joue un rôle important au niveau du système cardiovasculaire en favorisant la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire. Ces deux phénomènes participent de manière importante au développement de pathologies à l'origine d'une ischémie. Des antagonistes du récepteur 5-HT_{2A} ont donc été développés dans un but thérapeutique.

La kétansérine (**Figure I.16**), découverte en 1981 par *Leysen* et ses collaborateurs, est un antagoniste liant de manière sélective le récepteur 5-HT_{2A}. Divers travaux ont montré qu'un traitement à cet antagoniste sur une longue période réduit de manière significative la pression sanguine (*Du et al., 2003*). Malgré cet effet bénéfique, cette molécule a été retirée du marché en raison d'une proarythmie développée à la suite de la prise de ce médicament. Cette molécule reste néanmoins utilisée comme

antagoniste de référence dans le cadre d'études pharmacologiques menées sur le récepteur 5-HT_{2A}.

Après l'échec de la kétansérine, de nouvelles molécules ont vu le jour. Le sarpogrelate (**Figure I.17**), antagoniste spécifique du récepteur 5-HT_{2A}, est utilisé comme agent thérapeutique dans le cadre de maladies provoquant une ischémie associées à une thrombose (Kihara *et al.*, 2001). Divers travaux ont permis de montrer que cette nouvelle molécule prévenait de façon dose-dépendante la vasoconstriction des vaisseaux ainsi que l'agrégation plaquettaire (Gong *et al.*, 2000). D'autres phénomènes biologiques rencontrés dans le cadre des maladies cardiovasculaires comme une hypertrophie cardiaque (Ikeda *et al.*, 2000) ainsi qu'une hyperprolifération néointimale et des cellules musculaires lisses sont également réduits suite à un traitement au sarpogrelate (Sharma *et al.*, 1999).

Le naftidrofuryl (nafronyl oxalate, Praxilene[®]) (**Figure I.18**) est une molécule commercialisée depuis plus de 30 ans comme agent thérapeutique chez des patients atteints de claudication intermittente. Cet antagoniste des récepteurs 5-HT₂ est avant tout utilisé pour ses propriétés vasoactives et son effet sur le métabolisme oxydatif (Barradell & Brodgen, 1996). En effet, le naftidrofuryl inhibe de manière dose-dépendante la vasoconstriction des vaisseaux induite par le 5-HT et ce, chez divers animaux (Verheggen & Schör., 1993). De plus, la génération d'IP₃, suite à la liaison du 5-HT à son récepteur, est également inhibée par le naftidrofuryl (Maloteaux *et al.*, 1986). En outre, Verheggen et Schör ont montré que ce composé avait également un effet sur la contraction des vaisseaux induite par le TXA₂ (Verheggen et Schör, 1988). Enfin, cet agent est non seulement capable de prévenir une agrégation plaquettaire survenant suite à la formation d'un thrombus mais également d'empêcher l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire (Barradell & Brodgen, 1996). En conclusion, cet agent se révèle être une molécule très intéressante dans le cadre de pathologies induisant une ischémie liée à une vasoconstriction provoquée par le 5-HT. Cependant, ses effets sur le TXA₂ et son récepteur n'ont été que très peu étudiés.

Enfin, d'autres antagonistes du récepteur 5-HT_{2A} ont également été développés. Il s'agit de la ritanserine, de la cyproheptadine, du AT-1015, ... Ces molécules bloquent toujours les effets biologiques du 5-HT (Nagatomo *et al.*, 2004).

I.5. La thrombose

I.5.1. Définition

Les maladies cardiovasculaires, maladies touchant le cœur et la circulation sanguine, constituent un problème de santé public majeur. En effet en 2002, ces pathologies étaient, d'après un rapport de l'OMS publié en 2004, la cause de 30% des décès. Parmi ces maladies, les plus fatales sont les pathologies de type cardiaques ischémiques, dont fait partie la thrombose (51% des décès), ainsi que les pathologies cérébrovasculaires (38%).

La thrombose est un phénomène physiologique ou pathologique par lequel se développe un thrombus formé essentiellement de plaquettes et de fibrine. Ce phénomène peut se dérouler en cas de lésions traumatiques afin d'éviter une perte sanguine

excessive. Cependant, ce processus peut-être initié de façon anormale ou suractivée en présence de facteurs de risques.

I.5.2. La thrombose artérielle

Différents types de thromboses existent et peuvent survenir au niveau des artères, des veines, de la microcirculation d'organes, des cavités du cœur et des surfaces artificielles en contact avec le sang. Les conséquences ne seront évidemment pas les mêmes et dépendront donc du type de thrombose. Seule la thrombose artérielle sera décrite dans le cadre de ce projet.

La thrombose artérielle se développe souvent sur une lésion pariétale d'athérosclérose proche d'une bifurcation vasculaire où le débit sanguin est rapide et les forces de cisaillement à la paroi sont élevées. Cette lésion fait suite à une rupture de plaque athéromateuse qui inclut deux phénomènes : la rupture de la chape fibreuse ainsi qu'une érosion des cellules endothéliales. La lésion endothéliale de la paroi et l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium jouent un rôle capital dans l'initiation d'une thrombose artérielle. En effet, après une lésion de l'endothélium, les plaquettes vont adhérer rapidement aux constituants du sous-endothélium (facteur de Willebrand, collagènes de type IV et de type III, laminine, fibronectine, vitronectine, thrombospondine, glycosaminoglycanes).

Les thrombi artériels sont généralement constitués d'agrégats plaquettaires et d'un réseau de fibrine. Ces thrombi, appelés thrombi plaquettaires ou blancs, comprennent peu de globules rouges. Le mécanisme principal de leur formation est l'agrégation plaquettaire. Un rétrécissement des artères ou leur obstruction par un thrombus peuvent avoir pour conséquence une ischémie, soit une diminution de l'apport en oxygène des tissus entraînant une perturbation voire l'arrêt de leur fonctionnement.

I.5.3. Médiateurs impliqués dans le phénomène de thrombose artérielle

Les cellules endothéliales produisent de nombreuses cytokines et expriment des molécules d'adhésions comme ICAM-1, VCAM-1 et les sélectines. Toutes ces molécules permettent l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium. Lorsque l'endothélium est lésé, l'exposition de composants sous-endothéliaux, comme le collagène, entraîne l'adhérence et l'activation des plaquettes. L'accumulation de lipides ainsi que la migration de leucocytes au niveau de l'intima entraîne la formation de plaques athéromateuses, à chape fibreuse la séparant du flux sanguin. La rupture de la chape fibreuse active la cascade de coagulation suite à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium.

Ainsi, les plaquettes jouent un rôle important dans la thrombose artérielle. La liaison de celles-ci avec le sous-endothélium médiée par le facteur de von Willebrandt et par les P-sélectines engendre l'adhésion des plaquettes à la paroi du vaisseau (*Krötz et al., 2008*). Cette adhésion se réalise lorsque l'endothélium est lésé à la suite par exemple d'une rupture de plaque d'athérosclérose. Cette interaction engendre l'activation des plaquettes s'accompagnant, d'un changement forme de celles-ci, d'une élévation de la concentration en calcium intracellulaire et d'une libération de TXA₂, de 5-HT et d'ADP (*Siess, 1989 ; Krötz et al., 2008*).

La libération de substances vasoactives permet le recrutement de nouvelles plaquettes, au niveau du site d'agrégation, libérant à leur tour le contenu de leurs granules renforçant ainsi la formation du thrombus. Ces différents composés agissent via des récepteurs spécifiques : le récepteur TP pour le TXA₂, le récepteur 5-HT_{2A} pour le 5-HT et les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ pour l'ADP (*Sieess, 1989*).

Lors de l'hémostase, l'agrégation plaquettaire s'accompagne d'une vasoconstriction due à la contraction des cellules musculaires lisses présentes au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins afin de limiter les pertes sanguines au niveau de la lésion.

Le TXA₂ et le 5-HT sont les deux principaux médiateurs responsables de ce phénomène. En effet, ces cellules musculaires lisses expriment de manière importante les différentes isoformes du récepteur TP ainsi que la forme 5-HT_{2A} du récepteur au 5-HT (*Yoshimi et al., 2001*).

I.5.4. Stratégies thérapeutiques utilisées dans le cadre de la thrombose artérielle

En raison du rôle clé des plaquettes dans la thrombose artérielle, les composés capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire sont efficaces. Les plaquettes possédant de nombreux récepteurs impliqués dans ce phénomène, de nombreuses stratégies thérapeutiques existent donc. Seuls les composés agissant sur le récepteur TP seront décrits dans ce chapitre.

L'acide acétylsalicylique inhibe de manière irréversible l'activation des cyclooxygénases et donc, la production de TXA₂. Ainsi, les plaquettes, ne pouvant resynthétiser de nouvelles cyclooxygénases, sont inhibées spécifiquement durant une période d'environ cinq jours (*Cipollone et al., 1997*). Cependant, chez certains patients la prise d'acide acétylsalicylique ne s'accompagne pas d'une inhibition de l'agrégation plaquettaire. Les causes sont diverses comme des interactions avec d'autres médicaments, l'absorption du composé réduite au niveau du tractus digestif, des variabilités génétiques ou la formation de TXA₂ en dehors des plaquettes (*Patrono et Rocca, 2007*).

Les antagonistes du récepteur TP représentent un intérêt thérapeutique important. En effet, l'inhibition de ce récepteur suite à la liaison d'un antagoniste permet d'empêcher l'activation des plaquettes (*Krötz et al., 2008*). Ainsi, de nouveaux composés comme le S11886 furent développés (*Belhassen et al., 2003*). D'autres composés comme le picotamide possèdent à la fois un effet antagoniste vis-à-vis du récepteur mais également un effet inhibiteur de la thromboxane synthétase (*Gresele et al., 1989*).

I.6. La claudication intermittente

I.6.1. Définition

Le mot "claudication" dérive du verbe latin "*claudicare*" signifiant boiter. Cette maladie, touchant 15 à 20% des personnes âgées de plus de 70 ans, est caractérisée par des douleurs musculaires et de la fatigue lors d'exercices physiques comme la marche, symptôme disparaissant au repos. Ces douleurs musculaires apparaissent suite à

une accumulation d'acide lactique, produit résultant du fonctionnement anaérobie des muscles suite à un apport insuffisant en oxygène durant un effort physique.

La claudication intermittente est le symptôme le plus commun de la maladie artérielle périphérique (PAD) et à l'origine d'une diminution de la qualité de vie des patients. Elle constitue un facteur de risque pour des maladies cardiovasculaires comme les infarctus ou les accidents vasculaires cérébraux.

I.6.2. Physiopathologie et médiateurs impliqués

La compréhension du mécanisme de développement de la maladie constitue une étape essentielle à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi qu'au développement de nouvelles thérapies.

Il est désormais bien établi que la claudication intermittente est une des conséquences de la présence d'une maladie artérielle occlusive, généralement l'athérosclérose, provoquant une diminution du flux sanguin et induisant une ischémie temporaire disparaissant au repos. Des travaux ont également montré que la dysfonction endothéliale, jouant un rôle clé dans le processus athérosclérotique, semble tout aussi important dans le développement de la claudication intermittente.

L'origine de la claudication intermittente est, comme pour la thrombose, la rupture d'une plaque d'athérosclérose. Ainsi, des molécules comme le 5-HT, l'ADP, et le TXA₂ sont libérées par les plaquettes activées. Ce thrombus peut évoluer de deux manières ; soit il reste fermement attaché à la paroi du vaisseau et continue à augmenter de taille jusqu'à obstruer la lumière du vaisseau ; soit il se détache et circule dans les vaisseaux périphériques donnant ainsi naissance au phénomène de claudication intermittente.

I.6.3. Stratégies thérapeutiques utilisées dans la claudication intermittente

Le traitement médical de cette pathologie vise à améliorer la qualité de vie des patients en réduisant les symptômes et à prévenir l'apparition des conséquences d'une ischémie importante.

L'acide acétylsalicylique est un agent antiplaquettaire utilisé dans le traitement préventif de nombreuses pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et la thrombose. Cependant, l'utilisation de ce composé entraîne l'apparition de maux d'estomac et d'ulcères. La dose journalière effective permettant d'éviter ces effets secondaires est de 75-100 mg.

La pentoxifylline fût la première molécule développée spécifiquement dans le cadre de la claudication intermittente. Ce composé agit principalement en augmentant la déformation des globules rouges, en réduisant la viscosité du sang, en inhibant l'agrégation plaquettaire et en réduisant le taux de fibrinogène permettant ainsi de réduire l'importance de l'ischémie. Malgré ces effets intéressants, l'efficacité de ce composé est controversée. Ainsi, des travaux conclurent que ce médicament n'était efficace qu'au début du traitement sans amélioration des symptômes après douze semaines de traitement et que le bénéfice d'un traitement à la Pentoxifylline est minime.

Le cilostazol inhibe l'agrégation plaquettaire en agissant comme inhibiteur de la phosphodiesterase augmentant la concentration en AMPc chez les cellules, y compris les plaquettes. Ce composé démontre une meilleure efficacité que la pentoxifylline car il améliore les symptômes en augmentant notamment la distance de marche des patients traités.

Enfin, comme il l'a été mentionné précédemment, le naftidrofuryl est également utilisé dans le cadre de traitements de la claudication intermittente (*Meru et al., 2006*).

1.7. Objectifs

La thrombose et la claudication intermittente constituent deux problèmes majeurs de santé publique. Ainsi, ces pathologies sont caractérisées, entre autres, par une augmentation de la concentration plasmatique en TXA₂, en 8-iso-PGF_{2α} et en 5-HT. Ces médiateurs constituent donc des cibles thérapeutiques attractives pour prévenir le développement de ces pathologies. En effet, diverses études ont montré les rôles importants joués par ces médiateurs dans l'installation d'une ischémie provoquée par une vasoconstriction et une agrégation plaquettaire importante, deux phénomènes caractéristiques de ces pathologies.

Le picotamide est à la fois un inhibiteur de la thromboxane synthétase et un antagoniste du récepteur TP, récepteur au TXA₂. Les recherches sur ce composé ont permis sa commercialisation comme agent antiplaquettaire et anti-thrombotique (Plactidil®). Il est indiqué dans le traitement de désordres thromboemboliques.

Le naftidrofuryl (Praxilène®) est un antagoniste des récepteurs 5-HT₂ commercialisé dans le traitement de la claudication intermittente mais aussi dans le traitement des acouphènes en raison de son action favorable sur la microcirculation cérébrale. Fin des années 1980, *Verheggen et Schör* montrèrent que ce composé avait également des effets sur une vasoconstriction induite par le TXA₂ (*Verrheggen et Schör, 1988*). Cette molécule semblerait donc agir à la fois via les récepteur 5-HT₂ et les récepteurs TP, ce qui constitue un avantage thérapeutique indéniable dans le traitement de pathologie à l'origine d'une ischémie liée à une vasoconstriction et une agrégation plaquettaire.

Le présent mémoire a pour objectifs d'une part d'étudier *ex vivo* le comportement pharmacologique du naftidrofuryl sur la vasoconstriction induite par le TXA₂, le 8-iso-PGF_{2α} et le 5-HT et, d'autre part, d'étudier *in vitro* l'effet de cette molécule sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite après l'activation du récepteur TP.

Au cours de ces différentes études, des modulateurs de la voie du TXA₂ sont utilisés comme outils pharmacologiques. Parmi ceux-ci, le SQ-29548 et le BM-520, antagonistes de référence du récepteur TP, sont utilisés afin de comparer l'activité du composé potentiellement antagoniste, le naftidrofuryl. Le picotamide est également utilisé comme agent comparatif.

Les expériences *ex vivo* sont réalisées sur des aortes de rat en raison de leur richesse en récepteur TP et en récepteur 5-HT_{2A}. Cette étude a pour but à la fois d'investiguer le rôle du TXA₂, du 8-iso-PGF_{2α} et du 5-HT dans les processus de

vasomotricité mais également d'évaluer le comportement pharmacologique de molécules potentiellement antagonistes.

L'effet du naftidrofuryl et d'autres modulateurs potentiels sera également étudié *in vitro* dans un modèle mis au point permettant de détecter une mobilisation du calcium intracellulaire induite par activation d'un récepteur couplé à une protéine $G\alpha_{q/11}$. Cette étude permettra de déterminer le rôle du TXA_2 et du 8-iso-PGF_{2 α} dans les processus de mobilisation du calcium intracellulaire induits suite après activation du récepteur TP mais également d'évaluer le comportement pharmacologique des molécules. Dans la première partie, les lignées cellulaires utilisées, les HEK 293 TP α et les HEK 293 TP β surexprimant chacune une des isoformes du récepteur TP, permettront également de déterminer l'effet antagoniste des différents composés vis-à-vis d'une des deux isoformes du récepteur TP. Dans la seconde partie, la troisième lignée cellulaire permettra d'évaluer les effets de nos composés sur des cellules issues de la musculature lisse d'une aorte humaine, les HVSMC.

En conclusion, les modèles *ex vivo* et *in vitro* ont pour objectif de démontrer les capacités du naftidrofuryl à prévenir les phénomènes de vasoconstriction et de mobilisation du calcium intracellulaire survenant après activation du récepteur TP par le TXA_2 ou le 8-iso-PGF_{2 α} et de les comparer à des molécules de référence.

II. Matériels et méthodes

II.1. Contraction d'organes isolés

II.1.1. Description du système

Le système utilisé comprend trois bains de 20 ml (EMKA TECHNOLOGIE[®], France) et est destiné à l'étude d'organes ou de tissus isolés (*Figure II.1.*).

Ce dispositif comprend :

- un portique en aluminium équipé de :
 - 3 bains à double paroi de 20 ml en polyméta-acrylate
 - 3 crémaillères de précision
 - 3 capteurs de force isométrique
 - 3 robinets de bullage (pour le carbogène)
- un ensemble de thermorégulation comprenant :
 - une pompe de circulation et de thermorégulation
 - un bain thermostaté
 - un réservoir de liquide d'incubation (tampon Krebs-Henseleit)
 - un amplificateur 3 voies

Pour fonctionner ce montage nécessite :

- une source de carbogène (95 % O₂-5 % CO₂) régulée entre 0,3 et 0,4 bar
- une source de vide régulé entre -0,6 et 0,8 bar
- un récipient pour les liquides usagés
- un thermorégulateur

Ce système est également connecté à un PC équipé d'un logiciel d'acquisition de données IOX (version 1.445) (EMKA TECHNOLOGIE[®], France).

II.1.2. Préparation de l'aorte de rat

Des rats Wistar pesant entre 250 et 450g sont préalablement euthanasiés au pentobarbital sodique (120 mg/kg, en intrapéritonéal) après une brève pré-narcose à l'isoflurane (Abbott Laboratories, UK). L'aorte est prélevée, nettoyée de tout tissu adhérent et l'endothélium est éliminé par simple curetage. Ensuite, des segments de 5 mm sont coupés et suspendus horizontalement dans un bain contenant 20 ml de solution d'incubation (tampon Krebs-Henseleit) à 37°C et soumis à l'action du carbogène amenant le pH à 7,4. Les segments sont équilibrés pendant une heure à un gramme de tension avant de recevoir l'agent contractant (agoniste). Durant cette période d'incubation, le milieu est renouvelé tous les quarts d'heure.

Lors de l'étude de l'effet potentiellement antagoniste d'une drogue sur la contraction induite par l'agoniste, celle-ci est ajoutée 5 minutes avant l'ajout de

l'agoniste. La période de 5 minutes d'incubation a été déterminée à la suite de différents essais.

II.1.3. Préparation des milieux, drogues et réactifs

La solution aqueuse d'incubation (tampon Krebs-Henseleit) est constituée de NaCl 118 mM ; KCl 5,4 mM ; CaCl₂.2H₂O 2,5 mM ; MgCl₂.6H₂O 1,5 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; NaH₂PO₄.H₂O 1,2 mM ; glucose 10 mM.

Les agonistes du récepteur TP utilisés sont le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α} (Cayman Chemical, Tallin, Estonie). Le 5-HT, ligand endogène des récepteurs au 5-HT, est également utilisé (Sigma, USA).

Le U-46619 est fourni à une concentration de 5 mg/ml dans une solution d'acétate de méthyle. Après évaporation de ce dernier sous un flux d'azote, le U-46619 est remis en solution dans du DMSO afin d'obtenir une solution stock de 30 mM. Les différentes concentrations utilisées sont préparées extemporanément à partir de cette solution stock en les diluant dans du tampon d'incubation.

Le 8-iso-PGF_{2α} est mis en solution dans du DMSO fournissant ainsi une solution stock à 20 mM. Les différentes concentrations évaluées sont préparées de manière analogue à celles du U-46619.

Le 5-HT est également mis en solution dans du DMSO. Les concentrations testées sont préparées de manière analogues à celle du U-46619 et du 8-iso-PGF_{2α}.

Le BM-520 est une molécule originale synthétisée par le professeur Jean-Michel Dogné (*Département de Pharmacie, FUNDP*). Elle est dissoute dans du DMSO à une concentration stock de 2 mM. Les différentes concentrations utilisées sont préparées extemporanément dans du tampon.

Le picotamide (4-methoxy-N,N'-bis(pyridin-3-ylmethyl)benzene-1,3-dicarboxamide) est un composé fourni par l'EDQM (European Directorate for Quality of Medicine ; European Pharmacopoeia) sous forme de poudre sèche. La solubilisation de ce composé est réalisée extemporanément dans du DMSO et les dilutions subséquentes sont effectuées dans le tampon d'incubation.

Le naftidrofuryl (nafronyl oxalate, Praxilène®) nous fût généreusement offert par Dybly (Suisse). La préparation de ce composé est réalisée de la même manière que le picotamide.

Enfin, le SQ-29548 (Cayman Chemical, Tallin, Estonie) est mis en solution dans du DMSO afin d'obtenir une solution stock de 2 mM. Les concentrations utilisées sont préparées de la même manière que les autres antagonistes.

II.1.4. Essai

Après équilibre et stabilisation de la tension de l'aorte durant 60 minutes sous une tension de 1 gramme (T_{min}), la drogue testée est incubée pendant 5 minutes. Une fois cette période de pré-incubation terminée, une contraction est déclenchée par ajout de la plus faible concentration en agoniste. La tension est enregistrée jusqu'à l'obtention

d'une phase plateau de 15 min (T). Une fois celle-ci stabilisée, des concentrations croissantes en agoniste sont progressivement ajoutées. La plus haute concentration en agent contractant permet de déterminer la tension maximale (T_{\max}).

II.1.5. Expression des résultats

Pour une concentration en drogue donnée, la tension de l'aorte est exprimée en pourcentage grâce à la formule suivante :

$$\text{Tension (\%)} = \left[\frac{T - T_{\min}}{T_{\max} - T} \right] \times 100$$

Pour chaque composé testé, trois courbes doses-réponses sont réalisées au minimum et ce, sur trois animaux différents. Ces tracés permettent de déterminer l' EC_{50} défini comme la concentration en agoniste induisant 50 % de la tension maximale de l'aorte stimulée en présence des différentes drogues. Les EC_{50} sont calculés après traitement des données grâce à une équation logistique à 4 paramètres (Graph Pad Prism 5 software®). Ces EC_{50} sont exprimés sous forme de moyennes suivies de l'intervalle de confiance à 95 % (IC_{95}) ($n \geq 3$).

II.2. Relaxation d'organes isolés

II.2.1. Préparation de l'aorte de rat

La préparation de l'aorte de rat est en tout point identique à celle décrite au point II.1.2.

II.2.2. Préparation des milieux, drogues et réactifs

La préparation du tampon d'incubation et la mise en solution du 5-HT sont identiques à celles décrites pour la contraction d'organes isolés décrite au point II.1.3. La contraction de l'aorte est déclenchée par ajout de 100 μ l d'une solution de 5-HT à $4 \cdot 10^{-4}$ M, soit une concentration finale de 2 μ M.

Les diastéréoisomères du naftidrofuryl (Chiral technologies Europe, France) nous ont été fournis dilués dans 1 ml d'éthanol soit à une concentration stock de $2,48 \cdot 10^{-2}$ M pour le diastéréoisomère 2R,2'S ; de $2,35 \cdot 10^{-2}$ M pour le diastéréoisomère 2S,2'R ; $7,73 \cdot 10^{-2}$ M pour le diastéréoisomère 2R,2'R ; et $7,99 \cdot 10^{-2}$ M pour le diastéréoisomère 2S,2'S. La première dilution s'obtient en diluant 20 μ l de la solution stock dans 90 μ l d'éthanol et 90 μ l de tampon d'incubation. Les dilutions subséquentes sont réalisées dans le tampon d'incubation (Krebs-Henseleit).

II.2.3. Essai

Après équilibre et stabilisation de la tension de l'aorte, une contraction est déclenchée par ajout de 5-HT [2μ M]_F. Lorsque la tension maximale est atteinte et stable (T_{\max}), la drogue potentiellement antagoniste est ajoutée. Une fois la relaxation observée, la nouvelle tension stabilisée (10 minutes) est enregistrée (T). Des

concentrations croissantes en drogues sont alors ajoutées afin de relâcher l'aorte par paliers.

II.2.4. Expression des résultats

Pour une concentration en drogue donnée, la tension de l'aorte est exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Tension (\%)} = \left[\frac{T - T_{\min}}{T_{\max} - T_{\min}} \right] \times 100$$

Pour chaque composé testé, trois courbes doses-réponses sont réalisées au minimum et ce, sur trois animaux différents. Ces tracés permettent de déterminer l' IC'_{50} défini comme la concentration en drogue réduisant de 50 % de la tension maximale de l'aorte induite par le 5-HT 2 μ M. Les IC'_{50} sont calculés par traitement des données grâce à une équation logistique à quatre paramètres (GraphPad Prism 5 software[®]). Ces IC'_{50} sont exprimés sous forme de moyennes suivie de l'intervalle de confiance à 95 % (IC_{95}) ($n \geq 3$).

II.3. Culture cellulaire

II.3.1. Lignée cellulaire

Trois types cellulaires sont utilisés dans ce travail : les HVSMC, les HEK 293 TP α et les HEK 293 TP β . Les HVSMC (*Human Vascular Smooth Muscle Cells*) sont des cellules musculaires lisses de type vasculaire prélevées sur l'aorte d'un enfant de 11 mois de type caucasien. Les HEK 293 proviennent de la transformation de cellules embryonnaires de rein humain (HEK 293, *Human Embryonic Kidney cells*) par un adénovirus. Ces cellules sont faciles à cultiver et à transfecter. Ainsi, l'insertion d'un plasmide contenant la séquence codante d'une des deux isoformes du récepteur TP a permis d'obtenir une lignée cellulaire stable surexprimant de manière constitutive les deux isoformes. Ces cellules nous furent généreusement offertes par le Dr Julien Hanson (*Laboratoire de chimie pharmaceutique, ULG*) les ayant reçues du Dr Kinsella (*Département de Biochimie, University College Dublin, Irlande*).

II.3.2. Matériel

- Milieu de culture 3T3-L1 : milieu DMEM avec 1g/L de D-Glucose, L-Glutamine et du Pyruvate (Gibco, UK) (pour HEK 293) ; milieu F12 Nutrient Mixture (HAM) avec L-Glutamine (Gibco, UK) (pour HVSMC)
- Sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, UK)
- Trypsine 0,5%-EDTA (Gibco, UK)
- PBS (Phosphate Buffer Saline) (Gibco, UK)
- Boîte de culture de 75 cm² (T75) (Cell Star, Greiner Bio-one, Allemagne)
- Incubateur à 37°C (5% de CO₂) (Thermo Electron Corporation, USA)
- Centrifugeuse (Hettich, Allemagne)
- Hotte à flux laminaire Gelaire (ICN, USA)
- Microscope à contraste de phase (Leica, Allemagne)

II.3.3. Méthode

Les cellules (HEK 293 ou HVSMC) sont cultivées dans un milieu enrichi (DMEM ou F12 nutrient mixture) avec 10 % de FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, UK) dans des boîtes T75 maintenues dans une chambre humidifiée à 37°C et soumises à une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

Le protocole de culture cellulaire nécessite la stérilité et des boîtes de culture confluentes. Après avoir éliminé le milieu, les HEK 293 sont rincées avec 5 ml de PBS tandis que les HVSMC sont rincées deux fois avec 5 ml de PBS. Les cellules sont ensuite détachées suite à l'ajout de 2 ml de Trypsine 0,5 %-EDTA. Lorsque celles-ci sont détachées, la trypsine est neutralisée par ajout de 8 ml de milieu complet (milieu contenant 10 % de FBS). Ces 10 ml de suspension cellulaire sont ensuite centrifugés à 1300 rpm durant 4 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est ensuite remis en suspension dans 6 ml de milieu DMEM complet pour les HEK 293 tandis que les HVSMC sont resuspendues dans 4 ml de milieu F12 complet. Ces nouvelles suspensions sont ensuite réparties dans de nouvelles T75. Du milieu complet est enfin ajouté afin d'obtenir un volume final de 20 ml. Ce milieu est renouvelé tous les trois jours.

II.4. Mise au point du protocole du dosage de calcium dans les cellules HEK 293 grâce au Fluo-4 AM

Le protocole général est basé sur les publications de *Lin et al.* (*Lin et al.*, 1999) et de *Hanson et al.* (*Hanson et al.*, 2005). Il a néanmoins été adapté.

II.4.1. Matériel

- Solution : Krebs-Hepes (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄.6H₂O 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, CaCl₂.2H₂O 1,3 mM, de glucose 11,7 mM et de 10 mM d'Hepes, pH 7,4) ; Krebs-Hepes + BSA 0,5 % ; Milieu de culture DMEM avec 1g/L de D-Glucose, L-Glutamine et du Pyruvate (Gibco, UK) + 10 % de FBS ; Trypsine 0,5 %-EDTA (Gibco, UK) ; PBS (Gibco, UK) ; Pluronic F-127 (Invitrogen, USA) ; *Fluo-4 AM* 1 mM (Invitrogen, USA) (λ_{exc} : 490 nm ; $\lambda_{émi}$: 520 nm) ; Triton X100 (Sigma, USA) ; EGTA (Sigma, USA)
- Plaques 96 puits MicroliteTM TCT (Thermo Fischer, USA)
- Fluorimètre Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation, USA)

II.4.2. Méthode

II.4.2.1. Préparation des cellules

Des boîtes de culture (T75) à confluence sont préalablement lavées avec 10 ml de PBS. Les cellules sont détachées par ajout de 2,5 ml de Trypsine 0,5 %-EDTA. La trypsine est ensuite neutralisée grâce à l'ajout de 10 ml de milieu de culture + 10 % de FBS. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1300 rpm pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 10 ml de tampon Krebs-Hepes. Après deux lavages successifs, les cellules sont incubées durant 40 minutes dans un incubateur à 37°C afin de leur permettre de récupérer de la trypsinisation.

Les cellules sont ensuite comptées et le tampon est renouvelé après centrifugation à 1300 rpm pendant 5 minutes. Un mélange de *Fluo-4 AM* [500 μM]_F et de pluronic F-127 [2 %]_F en volume égal est réalisé. Ce mélange est ensuite ajouté à la solution contenant les cellules. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 1 heure en présence de ce mélange *Fluo-4 AM* [5 μM]_F-Pluronic F-127 [0,02 %]_F.

Après incubation, le *Fluo-4 AM* est éliminée de la solution grâce à 3 centrifugations à 1300 rpm durant 5 minutes. Le surnageant contenant la sonde est éliminé et est remplacé par du Krebs-Hepes + BSA 0,5 % frais.

II.4.2.2. Dosage du calcium intracellulaire : principe général

La solution contenant les cellules chargées en sonde est dispensée dans une plaque 96 puits MicroliteTM TCT, blanche et opaque, à raison de 150 μl par puits. La fluorescence basale (F_{basal}) est mesurée (λ_{exc} : 490 nm ; $\lambda_{\text{émi}}$: 520 nm). Dix μl de l'agoniste du récepteur TP testé sont ensuite ajoutés et la fluorescence ($F_{\text{stimulé}}$) est ensuite mesurée en continu jusqu'à obtenir une phase plateau.

La normalisation des résultats se réalise après mesure de la fluorescence maximale (F_{max}) et de la fluorescence minimale (F_{min}). Ainsi, l'ajout de 10 μl de Triton X-100 17,5% [1 %]_F permet la lyse des membranes cellulaires libérant ainsi tout le calcium intracellulaire. La mesure du F_{max} se fait jusqu'à obtenir une phase plateau. Enfin, l'ajout de 10 μl d'EGTA 185 mM [1 mM]_F, un chélateur de calcium, permet la mesure du F_{min} .

II.4.2.3. Détermination de la concentration cellulaire de la suspension dans les cellules HEK 293 TP α et TP β

Le protocole utilisé est identique au protocole général du dosage de calcium décrit au point II.4.2. Différentes concentrations de la suspension des HEK 293 ont été testées : $1,5 \cdot 10^6$; $5 \cdot 10^6$; $10 \cdot 10^6$ et $20 \cdot 10^6$ cellules par ml. La sonde fluorescente utilisée est le *Fluo-4 AM* à une concentration finale de 5 μM . L'agoniste du récepteur TP servant d'inducteur de la mobilisation du calcium est le U-46619 à une concentration finale de 1 μM .

II.4.2.4. Détermination de la concentration en *Fluo-4 AM* dans les cellules HEK 293 TP α et TP β

Le protocole utilisé est identique au protocole général du dosage de calcium décrit au point II.4.2. Les HEK 293 ont été comptées afin d'obtenir une solution ajustée à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml. Différentes concentrations finales en *Fluo-4 AM* ont été testées : 2,5 ; 5 et 10 μM . La mobilisation du calcium intracellulaire est déclenchée par ajout de U-46619 à une concentration finale de 1 μM .

II.4.2.5. Détermination du temps de mesure suite à la stimulation des cellules HEK 293 TP α et TP β

Le protocole utilisé est en tous points identiques à celui décrit au point II.4.2. Les HEK 293, à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml et incubées 1 h en présence de *Fluo-4 AM* [5 μM]_F et de pluronic F-127 [0,02 %]_F, sont stimulées au U-46619 à une

concentration finale de 1 μM . La mesure de la fluorescence est réalisée jusqu'à l'obtention d'une phase plateau.

Les résultats de cette expérience ont été exprimés en $[\text{Ca}^{++}]_i$ en fonction du temps grâce à la formule suivante :

$$[\text{Ca}^{++}] = K_d \times \left[\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right]$$

La valeur du K_d a été déterminée par calibration *in situ* du *Fluo-4 AM* (voir point II.5).

II.5. Calibration *in situ* du *Fluo-4 AM* dans les cellules HEK 293 $TP\alpha$ et $TP\beta$

II.5.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1. Il est à noter l'utilisation supplémentaire :

- du Kit de calibration calcium (Invitrogen, USA). La préparation des différentes solutions de calibration se fait par mélange de deux solutions stock : $\text{K}_2\text{Ca.EGTA}$ (haute concentration en calcium, soit 100 mM) et $\text{K}_2\text{H}_2\text{.EGTA}$ (faible concentration en calcium, soit 0 mM).
- d'ionomycine (Invitrogen, USA). Sa préparation est réalisée *ex tempore* dans du Krebs-Hepes.

II.5.2. Méthode

Les cellules sont préparées de la même manière que pour le dosage de calcium traditionnel chez les HEK 293 (voir point II.4.2.1.). Dix μl des différentes concentrations en solution de calibration sont ensuite disposés dans les puits. Une fois les cellules chargées en *Fluo-4 AM* [$5 \mu\text{M}$]_F, 150 μl de cette suspension à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml sont dispensés dans chaque puits. La fluorescence basale (F_{basal}) est alors mesurée. L'ajout d'ionomycine à une concentration finale de 5 μM est ensuite réalisé afin d'équilibrer les concentrations en ions calcium par déstabilisation de la membrane. La fluorescence (F_{Iono}) est alors mesurée jusqu'à obtention d'une phase plateau.

La normalisation des résultats se fait par mesure du F_{\max} et du F_{\min} suite à l'ajout de Triton X-100 [1 %]_F et d'EGTA [1 mM]_F.

II.5.3. Expression des résultats

La calibration d'une sonde fluorescente est déterminée grâce à une méthode décrite par *Tsien et Pozzan*. Ainsi, lorsque les concentrations en calcium et en EGTA sont proches, la concentration en calcium libre est fonction du K_d de l'EGTA. L'évaluation de la concentration en calcium libre se calcule grâce à la formule suivante :

$$[\text{Ca}^{++}]_{\text{libre}} = K_d^{\text{EGTA}} \times \left[\frac{[\text{CaEGTA}]}{[\text{K}_2\text{EGTA}]} \right]$$

Avec pour K_d de l'EGTA, à un pH 7,4 et à 20°C, une valeur égale à 60,5 nM (Tsien et Pozzan, 1989).

La valeur du K_d est déterminée grâce à un graphe comprenant en abscisse le $\log[Ca^{++}]_{libre}$ et en ordonnée le $-\log[(F_{iono}-F_{min})/(F_{max}-F_{iono})]$. Cette double échelle logarithmique permet d'obtenir une droite dont le point d'intersection avec l'axe des x correspond au $\log K_d$. Cette valeur a été calculée par extrapolation d'une régression linéaire réalisée grâce au logiciel Graph Pad Prism 5 Software®. La valeur du K_d obtenue est exprimée en nM et est suivie par l'intervalle de confiance à 95 % (IC₉₅). L'expérience est réalisée en triplicats.

II.6. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser dans les cellules HEK 293 TP α et TP β

II.6.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1. Il est à noter l'utilisation supplémentaire du U-46619 et du 8-iso-PGF_{2 α} , agonistes du récepteur TP. Leur préparation est identique à celle décrite au point II.1.3.

II.6.2. Méthode

Le protocole utilisé est identique au protocole général du dosage de calcium décrit au point II.4.2. Différentes concentrations en agonistes furent testées allant de $1,25 \cdot 10^{-3}$ à $1,25 \cdot 10^{-8}$ M pour le 8-iso-PGF_{2 α} et de $1,875 \cdot 10^{-3}$ à $1,875 \cdot 10^{-8}$ M pour le U-46619. Les dilutions ont été préalablement réalisées dans du tampon Krebs-Hepes. Les cellules, mises en solution à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml, furent incubées en présence de *Fluo-4 AM* [5 μ M]_F durant 1 h.

II.6.3. Expression des résultats

Les résultats de cette expérience ont été exprimés en $[Ca^{++}]_i$ en fonction du logarithme de la concentration en agoniste grâce à la formule suivante :

$$[Ca^{++}] = K_d \times \left[\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right]$$

La valeur du K_d a été déterminée par calibration *in situ* du *Fluo-4 AM* (voir point II.5). Le graphe obtenu permet de calculer l' EC'_{50} défini comme la concentration en agoniste induisant 50 % de la mobilisation du calcium intracellulaire maximale. Les EC'_{50} sont calculés grâce à une équation logistique à 4 paramètres (GraphPad Prism 5 software®) et sont exprimés sous forme de moyennes suivies des IC₉₅ (intervalle de confiance à 95 %) (n=3).

II.7. Mesure de l'effet des drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TP α et TP β

II.7.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.6.1. Il est à noter l'utilisation supplémentaire du SQ-29548, du BM-520, du picotamide et du naftidrofuryl. Ces drogues sont préparées de la même manière que décrite au point II.1.3.

II.7.2. Méthode

Le protocole utilisé est en tous points identiques à celui décrit dans le protocole général de la mobilisation du calcium intracellulaire (point II.1.4.). Les HEK 293, mises en suspension à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml, sont incubées en présence de *Fluo-4 AM* [$5 \mu\text{M}$]_F et de pluronic F-127 [$0,02 \%$]_F durant 1 h. Dix μl de drogue testée puis 150 μl de suspension cellulaire sont ajoutées dans les puits. Une période d'incubation de 5 minutes entre la drogue et les cellules est respectée avant ajout de l'agoniste à une concentration finale de $1 \mu\text{M}$ pour le U-46619 et de $100 \mu\text{M}$ pour le 8-iso-PGF_{2 α} .

II.7.3. Expression des résultats

Les drogues ont été testées à des concentrations allant de $1,25 \cdot 10^{-4}$ à $1,25 \cdot 10^{-13}$ M pour le SQ-29548 et le BM-520 et de $1 \cdot 10^{-2}$ à $1 \cdot 10^{-9}$ M pour le picotamide et le naftidrofuryl. Pour une concentration en drogue donnée, le pourcentage d'inhibition de la mobilisation de calcium est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition de la drogue (\%)} = 1 - \left[\frac{\left[\frac{F_{\text{stim}} - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F_{\text{stim}}} - \frac{F_{\text{basal}} - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F_{\text{basal}}} \right]_{\text{drogue}}}{\left[\frac{F_{\text{stim}} - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F_{\text{stim}}} - \frac{F_{\text{basal}} - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F_{\text{basal}}} \right]_{\text{CTL}}} \right]$$

Les courbes doses-réponses, avec en abscisse le log [drogue] et en ordonnée le pourcentage d'inhibition de la mobilisation du calcium intracellulaire, permettent de déterminer l'IC₅₀ c'est-à-dire la concentration en drogue inhibant 50% de la libération de calcium maximale induite par les différents inducteurs. Les IC₅₀ sont calculés grâce à une équation logistique à 4 paramètres. Ces IC₅₀ sont exprimés en moyennes suivies des intervalles de confiance à 95 % (n \geq 3).

II.8. Mise au point du protocole du dosage de calcium dans les cellules HVSMC grâce au Fluo-4 AM

II.8.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1. excepté que le milieu de culture DMEM est remplacé par du milieu F12 nutrient mixture (Gibco, USA).

II.8.2. Méthode

Le protocole utilisé est identique au protocole général du dosage du calcium décrit au point II.4.2.

II.8.3. Détermination de la concentration en Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC

Le protocole utilisé est identique au protocole général du dosage de calcium décrit au point II.4.2. Les HVSMC furent comptées afin d'obtenir différentes solutions à une concentration $4,32 \cdot 10^5$; $5,40 \cdot 10^5$; $6,48 \cdot 10^5$ et $8 \cdot 10^5$ cellules par ml. Ces différentes conditions ont été chacune incubées en présence de différentes concentrations finales en *Fluo-4 AM* (2,5 ; 5 et 10 μM) et de pluronic F-127 [0,02 %]_F durant 1h. Enfin, la mobilisation du calcium intracellulaire a été déclenchée par ajout de U-46619 à une concentration finale de 1 μM .

II.9. Etude de la compartimentalisation du *Fluo-4 AM* dans les cellules HVSMC et les HEK 293 TP β

II.9.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1. Il est à noter l'utilisation supplémentaire de digitonine (Sigma, USA), mise en solution dans de l'HBSS + EGTA 2,6 mM + HEPES 10 mM afin d'obtenir une concentration de 320 μM , et de Triton X-100 17,5 % préparé dans du Krebs-Hepes.

II.9.2. Méthode

Les différents types cellulaires (HVSMC et HEK 293 TP β), mis en suspension à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml et chargés en *Fluo-4 AM* [5 μM]_F dans du tampon HBSS + EGTA 2,6 mM + HEPES 10 mM, sont répartis à raison de 150 μl par puits. La fluorescence totale (F_{total}), contribution des sondes présentes au niveau du cytoplasme et au niveau des organelles, est mesurée durant 10 minutes.

L'ajout de 10 μl de digitonine 320 μM permet la perméabilisation sélective de la membrane plasmique et par conséquent la sortie des fluorophores et des ions calcium présents au niveau du cytoplasme. La fluorescence est mesurée pendant 5 minutes suite à l'ajout de la digitonine [20 μM]_F. L'intensité du signal fluorescent mesurée juste avant l'ajout de Triton X100 [1 %]_F représente la fluorescence émise par le *Fluo-4* compartimentalisé au niveau des organelles (F_{org}).

L'ajout de 10 μl de Triton X-100 17,5 % permet la lyse des membranes des organelles et par conséquent la libération des sondes et du calcium présents au niveau des organelles. La fluorescence (F_{min}) est mesurée durant 5 minutes. L'intensité du signal mesuré juste avant la fin de l'expérience représente l'autofluorescence de la cellule.

II.9.3. Expression des résultats

Pour une sonde, la normalisation de la fluorescence s'effectue grâce la formule suivante :

$$\text{Fluorescence (\%)} = \left[1 - \frac{F_{org} - F_{min}}{F_{total} - F_{min}} \right] \times 100$$

II.10. Etude du leakage du Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC et les cellules HEK 293 TPβ

II.10.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1. Il est à noter l'utilisation supplémentaire du probénécide (Sigma, USA). Une solution 25 mM a été réalisée dans du Krebs-Hepes.

II.10.2. Méthode

Les deux types cellulaires (HVSMC et HEK 293 TPβ) sont préparés de la même manière qu'au point II.4.3. Les cellules, à une concentration de 1.10^6 cellules/ml, ont été incubées en présence de *Fluo-4 AM* [$5 \mu\text{M}$]_F et de pluronic F-127 [$0,02 \%$]_F pendant différents temps (0, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 min). Pour les cellules traitées au probénécide, 50 μl de probénécide 25 mM ont également été ajoutés à 450 μl de suspension cellulaire lors de l'ajout du *Fluo-4 AM*. Le F_{basal} et le F_{min} ont été mesurés pour chaque condition à une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

II.11. Mise au point du protocole général de dosage du calcium dans les cellules HVSMC grâce au Fura-2 AM

II.11.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1 excepté que le *Fluo-4 AM* est remplacé par du *Fura-2 AM* (Invitrogen, USA) (λ_{exc} : 340 et 380 nm ; $\lambda_{\text{émi}}$: 510 nm) et que le milieu DMEM est remplacé par du milieu F12 nutrient mixture (Gibco, UK).

II.11.2. Méthode

Les protocoles de mise en solution des HVSMC dans le tampon Krebs-Hepes et la mesure des différents paramètres de fluorescence sont identiques à ceux décrits au point II.4.2.1. et II.4.2.2. Le *Fura-2 AM* étant une sonde ratiométrique, l'excitation de ce fluorophore s'effectue à deux longueurs d'ondes, 340 et 380 nm, tandis que la mesure du signal fluorescent s'effectue à une longueur d'onde de 510 nm.

II.11.3. Détermination de la concentration cellulaire de la suspension dans les cellules HVSMC

Le protocole utilisé est identique au protocole général du dosage de calcium décrit au point II.4.2. Différentes concentrations de HVSMC ont été testées : $1,5.10^5$; $2,5.10^5$; 5.10^5 ; $7,5.10^5$ et 10.10^5 cellules par ml. La sonde fluorescente utilisée est le

Fura-2 AM testé à une concentration finale de 5 µM. Le U-46619 est, quant à lui, utilisé à une concentration finale de 1 µM.

II.11.4. Détermination du temps de mesure suite à la stimulation des cellules HVSMC

Le protocole utilisé est en tous points identiques à celui décrit au point II.4.2. Les HVSMC, à une concentration de 5.10^5 cellules par ml et incubées 1 h en présence de *Fura-2 AM* [5 µM]_F et de pluronic F-127 [0,02 %]_F, sont stimulées au U-46619 [1 µM]_F.

Les résultats de cette expérience ont été exprimés en $[Ca^{++}]_i$ en fonction du temps grâce à la formule suivante :

$$[Ca^{++}] = \beta \times K_d \times \left[\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right]$$

La valeur du K_d a été déterminée par calibration *in situ* du *Fura-2 AM* (voir point II.12.). Le β correspond au ratio des ratios de fluorescence lorsque la sonde est complètement saturée et lorsque la sonde n'est pas liée au calcium. Cette valeur du β est comprise entre 13 et 25 pour le *Fura-2 AM* (Takahashi *et al.*, 1999). Enfin, le R correspond à la valeur du ratio des intensités des fluorescences aux longueurs d'ondes permettant l'excitation ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) mesurées. Le R_{max} , ou ratio des fluorescences maximales, correspond à la concentration maximale en calcium présente dans les cellules et se mesure suite à la lyse des cellules par le Triton X100. Le R_{min} , ou ratio des fluorescences minimales, représente l'auto-fluorescence des cellules (membranes,...) et est mesuré par ajout d'EGTA.

II.12. Calibration *in situ* du *Fura-2 AM* dans les cellules HVSMC

II.12.1. Matériel

Le matériel utilisé est en tous points identiques à celui utilisé lors de la calibration du *Fluo-4 AM* chez les HEK 293 TP α et TP β (voir point II.5.1) excepté que le *Fluo-4 AM* est remplacé par du *Fura-2 AM* (Invitrogen, USA) (λ_{exc} : 340 et 380 nm ; $\lambda_{émi}$: 510 nm) et que le milieu DMEM est remplacé par du milieu F12 nutrient mixture (Gibco, UK).

II.12.2. Méthode

Le principe de la calibration chez les HVSMC est le même que pour les HEK 293 TP α et TP β (voir point II.5.2). Cependant, le *Fluo-4 AM* est remplacé par du *Fura-2 AM*, la concentration en cellules de la suspension est de 5.10^5 cellules/ml et les différents paramètres de fluorescence sont mesurés à deux longueurs d'onde d'excitation 340 et 380 nm, la longueur d'onde d'émission étant dans les deux cas 510 nm.

II.12.3. Expression des résultats

La valeur du K_d est calculée de la même manière que lors de la calibration du *Fluo-4 AM* par élaboration d'un graphe du $-\log[(R_{iono}-R_{min})/(R_{max}-R_{iono})]$ en fonction du

logarithme de la concentration en calcium libre (voir point II.5.3). La valeur du K_d est exprimée en nM et est suivie de l'intervalle de confiance à 95 % (IC_{95}) (n=3).

II.13. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser dans les cellules HVSMC

II.13.1. Matériel

Le matériel utilisé est identique à celui décrit au point II.4.1. Il est à noter l'utilisation du *Fura-2 AM* ; le milieu F12 nutrient mixture remplace le milieu DMEM ; et l'utilisation du U-46619 et du 8-iso-PGF_{2α}, agonistes du récepteur TP. Leur préparation est identique à celle décrite au point II.1.3.

II.13.2. Méthode

Le protocole utilisé est identique à celui décrit au point II.6.2 excepté que le *Fluo-4 AM* [5 μM]_F est remplacé par du *Fura-2 AM* [5 μM]_F.

II.13.3. Expression des résultats

Les résultats de cette expérience ont été exprimés en $[Ca^{++}]_i$ en fonction du logarithme de la concentration en agoniste grâce à la formule suivante :

$$[Ca^{++}] = K_d \times \left[\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right]$$

La valeur du K_d a été déterminée par calibration *in situ* du *Fura-2 AM* (voir point II.12). Le graphe obtenu permet de calculer les EC'_{50} définis comme la concentration en agonistes induisant 50 % de la mobilisation du calcium intracellulaire maximale. Les EC'_{50} sont calculés grâce à une équation logistique à 4 paramètres (GraphPad Prism 5 software[®]) et sont exprimés sous forme de moyennes suivies des IC_{95} (intervalle de confiance à 95 %) (n=3).

II.14. Mesure de l'effet des drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HVSMC

II.14.1. Matériel

Le matériel utilisé est en tous points identiques à celui décrit au point II.7.1 excepté que le *Fura-2 AM* remplace le *Fluo-4 AM* et le milieu F12 nutrient mixture remplace le milieu DMEM.

II.14.2. Méthode

Le principe est le même que pour le dosage de calcium réalisé sur les HEK 293 voir point II.7.2 excepté que le *Fluo-4 AM* [5 μM]_F est remplacé par du *Fura-2 AM* [5 μM]_F et que la concentration en cellules de la suspension est de 5.10⁵ cellules/ml.

II.14.3. Expression des résultats

Les drogues ont été testées à des concentrations variant de $1,25 \cdot 10^{-4}$ à $1,25 \cdot 10^{-13}$ M pour le SQ-29548 et le BM-520 et de $1 \cdot 10^{-2}$ à $1 \cdot 10^{-9}$ M pour le picotamide et le naftidrofuryl. Pour une concentration en drogue donnée, le pourcentage d'inhibition de la mobilisation de calcium est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition de la drogue (\%)} = 1 - \left[\frac{\left[\frac{R_{\text{stim}} - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{stim}}} \right] - \left[\frac{R_{\text{basal}} - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{basal}}} \right]}{\left[\frac{R_{\text{stim}} - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{stim}}} \right] - \left[\frac{R_{\text{basal}} - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{basal}}} \right]_{\text{CTL}}} \right]$$

Les courbes doses-réponses permettent de déterminer l'IC₅₀ c'est-à-dire la concentration en drogue inhibant 50% de la libération de calcium maximale induite par les différents inducteurs. Les IC₅₀ sont calculés grâce à une équation logistique à 4 paramètres normalisée. Ces IC₅₀ sont exprimés en moyennes suivies des intervalles de confiance à 95 % (n ≥ 3).

III. Résultats

III.1. Evaluation ex vivo de l'activité pharmacologique du naftidrofuryl (Praxilène®) et du picotamide sur la contraction de l'aorte de rat

III.1.1. Contexte de recherche et stratégie scientifique

Les nombreux progrès de ces quinze dernières années en biologie cellulaire et en biochimie ont permis de mieux comprendre les dysfonctionnements vasculaires qui accompagnent plusieurs pathologies vasculaires majeures parmi celles-ci la thrombose et la claudication intermittente. La musculature lisse et les terminaisons nerveuses ne sont pas les seuls acteurs impliqués dans le contrôle de la vasomotricité. Ainsi, l'endothélium joue un rôle prépondérant dans le tonus vasomoteur grâce à la synthèse et à la libération de substances vasoactives. En effet, les cellules endothéliales répondent non seulement à l'action de nombreux médiateurs comme l'ADP, l'acétylcholine, l'adrénaline, l'histamine, la sérotonine,... mais aussi à des modifications physicochimiques telles des forces de cisaillement et des conditions d'hypoxie, en synthétisant des facteurs vasorelaxants (l'EDRF *endothelium-derived relaxing factor*, le NO, l'EDHF *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, la prostacycline PGI₂) et/ou de facteurs vasocontractants (les endothélines, le thromboxane A₂ (TXA₂), les ROS) (Pitré *et al.*, 1998).

Le contrôle du tonus vasomoteur joue un rôle important tant dans des conditions physiologiques normales que dans des situations pathologiques telles la thrombose et la claudication intermittente, deux pathologies où une anomalie de la vasomotricité est observée.

La vasoconstriction peut notamment être médiée par le récepteur TP et le récepteur 5-HT_{2A} dont les ligands respectifs sont le TXA₂ et le 5-HT, deux molécules présentes en concentrations anormalement élevées dans les pathologies d'origine artérielle mentionnées ci-dessus.

L'étude de modulateurs capables d'agir sur ces récepteurs a pour objectif d'identifier des composés potentiellement capables de réduire une ischémie résultant de la contraction des vaisseaux sanguins. Le picotamide et le naftidrofuryl sont deux exemples de composés préconisés non seulement pour leur activité antiagrégante plaquettaire mais aussi pour leur activité modulatrice de la contraction vasculaire. L'activité préventive du naftidrofuryl, antagoniste du récepteur 5-HT_{2A}, vis-à-vis de la constriction vasculaire induite par le TXA₂ a été mise en évidence fin des années 80 (Verheggen *et Schör*, 1988). Les propriétés anti-vasoconstrictrices du picotamide furent mise en évidence en 1997 (Vezza *et al.*, 1997).

Une molécule capable de prévenir simultanément une constriction médiée par le TXA₂ et le 5-HT pourrait constituer une nouvelle classe thérapeutique intéressante dans le traitement des pathologies vasculaires comme la claudication intermittente et la thrombose.

Dans le cadre de ce travail, nous avons tout d'abord évalué l'activité antagoniste potentielle du naftidrofuryl vis-à-vis du récepteur TP et comparé celle-ci à un composé mixte, le picotamide, molécule de référence commercialisée comme agent thérapeutique

en Italie. Il s'agit d'un inhibiteur de la thromboxane synthétase et antagoniste du récepteur TP.

L'activité potentielle du naftidrofuryl vis-à-vis du récepteur TP a été étudiée *ex vivo* sur des segments d'aortes de rats isolés. La molécule étudiée était ajoutée avant la contraction par des agonistes du récepteur TP tels le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}. La contraction déclenchée par le 5-HT a aussi été étudiée. En raison de sa richesse en récepteurs TP et 5-HT_{2A}, l'aorte est un modèle idéal pour ce type d'étude (*Watts & Thompson, 2003*).

Dans un second temps, l'activité de quatre isomères du naftidrofuryl a été investiguée sur une aorte contractée au préalable par le 5-HT a été étudiée.

Les principaux objectifs de cette première partie sont de :

- caractériser l'activité pharmacologique potentielle du naftidrofuryl vis-à-vis du récepteur TP et de comparer celle-ci à divers antagonistes de référence du récepteur TP comme le SQ-29548, le BM-520 et le picotamide. L'activité potentielle du naftidrofuryl ainsi que des autres molécules vis-à-vis du récepteur 5-HT_{2A}, est également étudiée.

- caractériser l'activité antagoniste potentielle des quatre diastéréoisomères du naftidrofuryl sur des segments d'aortes contractés au préalable par le 5-HT.

III.1.2. Caractérisation de l'activité pharmacologique de différentes drogues sur la contraction d'aorte de rat induite

III.1.2.1. Principe

L'aorte de rats Wistar est prélevée, nettoyée de tout tissu adhérent et coupée en segments d'environ 5 mm. Ces segments sont ensuite suspendus dans un bain thermostaté à 37°C contenant un tampon d'incubation (Krebs-Henseleit) et oxygéné par du carbogène (mélange O₂-CO₂ 95-5 %), amenant le pH à 7,4.

Après stabilisation de la tension à un gramme, une incubation de 5 minutes avec une des drogues d'intérêt (SQ-29548, BM-520, picotamide, naftidrofuryl) est respectée avant l'ajout de concentrations croissantes en agonistes. La concentration en agoniste supérieure n'est ajoutée que lorsqu'un palier de minimum 10 minutes est obtenu.

Des courbes doses-réponses sont réalisées à partir des tracés obtenus et représentent l'évolution de la tension normalisée en pourcent en fonction du logarithme de la concentration en agoniste. Sur base de ce graphique, un EC₅₀, représentant la concentration en agoniste requise pour atteindre 50 % du tonus maximal de l'aorte contractée, est calculé. Une augmentation de la valeur d'EC₅₀ de l'agoniste (U-46619, 8-iso-PGF_{2α}, 5-HT), consécutive à l'incubation de l'aorte avec l'antagoniste, traduit une capacité de la drogue testée à prévenir la contraction de la musculature lisse vasculaire induite par les différents agonistes.

III.1.2.2. Comparaison de l'activité agoniste du U-46619 et du 8-iso-PGF_{2α} vis-à-vis du récepteur TP de la musculature lisse d'aorte de rat

Le U-46619, outil pharmacologique très utilisé pour mimer les propriétés du TXA₂ instable, et le 8-iso-PGF_{2α} sont deux molécules capables d'induire une vasoconstriction de manière dose-dépendante. Cet effet est médié par le récepteur TP, très abondant au niveau de l'aorte de rat.

Des injections successives de concentrations croissantes en U-46619 et en 8-iso-PGF_{2α} ont permis de contracter l'aorte de rat par paliers. La **Figure III.1** montre les courbes doses-réponses de chaque agoniste obtenues à partir des tracés représentant l'évolution de la tension au fil du temps (**Figure III.2**). Ces courbes doses-réponses permettent le calcul de l'EC₅₀ défini comme la concentration en agoniste nécessaire pour induire 50 % de la tension maximale. Ces EC₅₀ sont respectivement de 5,71 nM pour le U-46619 et de 330 nM pour le 8-iso-PGF_{2α} (**Tableau III.1**). Ainsi, l'EC₅₀ du 8-iso-PGF_{2α} est 58 fois plus important que celui du U-46619, indiquant que le 8-iso-PGF_{2α} possède une activité agoniste, vis-à-vis du récepteur TP, inférieure à celle du U-46619.

III.1.2.3. Etude de l'effet du temps de pré-incubation des antagonistes

Au cours de ce travail, nous souhaitons mettre en évidence un effet potentiellement préventif d'antagonistes du récepteur TP. A cette fin, l'aorte est incubée avec la molécule étudiée (picotamide) avant d'être contractée avec l'agoniste. Durant cette période d'incubation, l'antagoniste pourra diffuser vers la musculature lisse et interagir avec les récepteurs TP présents. Au contraire, une période trop longue peut se traduire notamment par une dégradation de la molécule et une diminution de son activité éventuelle ou une diffusion intracellulaire excessive. Deux périodes d'incubation (5 et 15 minutes) ont été évaluées sur base de travaux antérieurs (*Sametz et al., 2000*). La concentration en picotamide de 50 μM évaluée dans ces expériences a été retenue à la suite de tests réalisés au préalable au Département de Pharmacie.

Il apparaît que même en présence du picotamide, l'effet dose-dépendant du U-46619 vis-à-vis de la contraction musculaire est toujours observé. Toutefois, l'incubation de cet antagoniste avec l'aorte avant l'ajout de concentrations croissantes en l'agoniste induit un déplacement de la courbe vers de plus hautes concentrations en agoniste pour induire le même effet (**Figure III.3**).

Le temps de pré-incubation de l'antagoniste est un paramètre essentiel. En effet, une incubation de 15 minutes induit un déplacement moins important qu'un temps d'incubation de 5 minutes ; signifiant une perte de la capacité à prévenir la contraction induite par l'ajout de concentrations croissantes en U-46619. Les EC₅₀ du U-46619 en l'absence d'antagoniste (*véhicule*), en présence du picotamide préincubé avec l'aorte 5 minutes et 15 minutes sont respectivement de 5,71 nM (IC₉₅: 4.55-7.17 nM), 18,86nM (IC₉₅: 13,52-26,31 nM) et 7,84nM (IC₉₅: 5.95-10,34 nM).

III.1.2.4. Effet de différents antagonistes du récepteur TP pré-incubés avec l'aorte sur la contraction musculaire induite par le U-46619

Des travaux précédents ont montré que le SQ-29548, largement étudié tant *in vitro* qu'*in vivo*, était capable de prévenir une vasoconstriction d'aorte de rat induite par

le U-46619 (Sametz *et al.*, 2000). Cette molécule est décrite comme l'antagoniste le plus puissant du récepteur TP. Même si son développement non clinique a dû être arrêté pour des raisons de toxicité, le SQ-29548 reste toutefois un outil pharmacologique de choix.

Le BM-520 et le picotamide, tous deux décrits comme des antagonistes du récepteur TP, ont également montré une capacité à relaxer par paliers une aorte pré-contractée au U-46619 (Rolin *et al.*, 2007 ; Buccellati *et al.*, 2006).

Les concentrations évaluées en composés potentiellement antagonistes et les concentrations croissantes en U-46619 testées (de $1,5 \cdot 10^{-5}$ M à $1,5 \cdot 10^{-9}$ M), ont été déterminées sur base de travaux antérieurs (Rolin *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 1996 ; Sametz *et al.*, 2000 ; Oliverira *et al.*, 2000).

Il ressort de ces expériences que lorsque le picotamide ou le BM-520 sont pré-incubés avec l'aorte de rat, ces molécules sont capables de prévenir la contraction de la musculature lisse induite par le U-46619. Ainsi, un déplacement de la courbe dose-réponse du U-46619 vers de plus hautes concentrations est observé. Le SQ-29548, choisi comme antagoniste de référence dans ces expériences, a également montré une haute activité myorelaxante, traduite par un déplacement de la courbe contrôle (U-46619) vers des concentrations plus élevées (**Figure III.4**).

En outre, l'effet du naftidrofuryl, antagoniste du récepteur 5-HT_{2A}, a été étudié et, a démontré également une activité antagoniste vis-à-vis du récepteur TP en induisant aussi un déplacement de la courbe dose-réponse du U-46619 vers de plus hautes concentrations. Les valeurs d'EC₅₀ pour les différentes molécules évaluées vis-à-vis de la constriction induite par le U-46619 sont résumées au **Tableau III.1**.

Dans cette étude, le picotamide apparaît comme un faible antagoniste du récepteur TP en comparaison avec le SQ-29548 et le BM-520 qui sont plus affins vis-à-vis du récepteur TP. Le naftidrofuryl montre également une faible activité antagoniste vis-à-vis du récepteur TP ; il prévient en effet aussi la contraction induite par le U-46619 mais dans une moindre mesure. Un classement de ces molécules peut donc être établi sur base de leur activité antagoniste préventive de la contraction musculaire induite par le U-46619 : SQ-29548 10 nM > BM-520 1 µM > naftidrofuryl 50 µM > picotamide 50 µM.

III.1.2.5. Effet de différents antagonistes du récepteur TP pré-incubés avec l'aorte sur la contraction musculaire induite par le 8-iso-PGF_{2α}

L'aorte de rat est capable de répondre à une stimulation au 8-iso-PGF_{2α} par une constriction de la musculature lisse. Soulignons toutefois que cet effet est moins important que celui induit par le U-46619. Les concentrations en antagonistes testées sont identiques à celles utilisées lors du test précédent. Des travaux précédents ont également montré que le SQ-29548 était capable de prévenir une vasoconstriction d'aorte de rat induite par le 8-iso-PGF_{2α} (Sametz *et al.*, 2000). Enfin, le BM-520 est également capable de relaxer par paliers une aorte pré-contractée au U-46619 (Rolin *et al.*, 2007).

Les concentrations croissantes en 8-iso-PGF_{2α} testées (de $1 \cdot 10^{-4}$ M à $1 \cdot 10^{-9}$ M), ont été déterminées sur base de travaux antérieurs (Rolin *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 1996 ; Sametz *et al.*, 2000 ; Oliverira *et al.*, 2000).

Il ressort de ces expériences que le BM-520 et le picotamide sont capables de prévenir une vasoconstriction induite par le 8-iso-PGF_{2α}. Le SQ-29548, choisi comme antagoniste de référence dans ces expériences, a également montré une haute activité myorelaxante. L'ajout d'un antagoniste du récepteur TP induit aussi, comme dans les expériences réalisées précédemment, un déplacement de la courbe dose-réponse au 8-iso-PGF_{2α} vers de plus hautes concentrations (**Figure III.5**). De plus, nous observons que le naftidrofuryl, également investigué, peut aussi déplacer la courbe dose-réponse vers de plus hautes concentrations en 8-iso-PGF_{2α}. Les valeurs EC₅₀ pour les différents antagonistes sont repris dans le **Tableau III.1**.

Nous concluons de ces expériences que le naftidrofuryl, décrit comme antagoniste du récepteur 5-HT_{2A}, réagit vis-à-vis du récepteur TP comme un antagoniste puisqu'il est capable de prévenir une contraction induite non seulement par le U-46619 mais aussi par le 8-iso-PGF_{2α}, deux agonistes du récepteur TP. Si cette activité est comparable à celle du picotamide, antagoniste de référence du récepteur TP, elle reste toutefois relativement faible par rapport aux antagonistes puissants et spécifiques comme le SQ-29548 ou le BM-520. Un classement de ces molécules peut être établi sur base de leur activité antagoniste préventive de la contraction musculaire induite par le 8-iso-PGF_{2α} : BM-520 1 μM > SQ-29548 10 nM > naftidrofuryl 50 μM > picotamide 50 μM.

III.1.2.6 Effet du naftidrofuryl et de différents antagonistes du récepteur TP pré-incubés avec l'aorte sur la contraction musculaire induite par le 5-HT

Le 5-HT est le ligand endogène du récepteur 5-HT_{2A}, récepteur abondant au niveau de l'aorte de rat et responsable de la contraction de la musculature lisse au même titre que le U-46619 et d'autres agents constricteurs agissant via leur propre récepteur (*Watts et al., 2003*). Cette activité peut toutefois être prévenue par un antagoniste spécifique du récepteur.

Les concentrations croissantes en 5-HT testées (de 9,68.10⁻⁴ M à 9,9.10⁻¹⁰ M), ont été déterminées sur base de travaux antérieurs (*Watts et al., 2003*).

Ainsi, une incubation de l'aorte durant 5 minutes avec le naftidrofuryl permet de prévenir et de retarder la contraction musculaire induite par des concentrations croissantes en 5-HT. Un important déplacement de la courbe du 5-HT vers de plus hautes concentrations est observé. En effet, si le naftidrofuryl montre une activité antagoniste vis-à-vis du récepteur TP stimulé par le U-46619 ou le 8-iso-PGF_{2α}, les antagonistes du récepteurs TP testés (SQ-29548, BM-520 et picotamide) n'ont aucun effet sur la contraction musculaire induite par le 5-HT (**Figure III.6**). Les valeurs EC₅₀ des différents composés testés sont reprises au **Tableau III.1**.

Nous concluons de ces expériences que les antagonistes du récepteur TP testés n'interagissent pas avec le récepteur 5-HT_{2A}. Le naftidrofuryl, antagoniste de référence, est à l'origine d'un EC₅₀ du 5-HT de 14,24 μM contre 1,74 μM sans antagoniste.

III.1.3. Caractérisation de l'activité pharmacologique de différents diastéréoisomères du naftidrofuryl sur la contraction de rat induite par le 5-HT

L'existence de différents isomères d'un composé peut présenter un intérêt pharmaceutique important. En effet, un ou plusieurs de ces isomères peuvent s'avérer

plus ou moins actifs d'un point de vue pharmacologique et pharmacodynamique. Ainsi, l'identification de ces isomères a permis la commercialisation par exemple de la thalidomide (*Patil et Kothekar, 2006*).

Le naftidrofuryl comporte deux carbones asymétriques permettant l'existence de 4 diastéréoisomères : 2R,2'S ; 2S,2'R ; 2R,2'R ; et 2S,2'S (*Figure III.7*). Il est donc intéressant d'évaluer chacun des diastéréoisomères séparément afin de comparer leur activité et, en cas de différences significatives, de sélectionner celui qui est pharmacologiquement plus actif. Ce travail est d'autant plus intéressant puisqu'il n'a jamais été réalisé et qu'il s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec la firme *Chiral Chemical Europe* (France).

Les quatre diastéréoisomères ont été étudiés sur aorte de rat préalablement contractée par le 5-HT [2 μ M]_F.

III.1.3.1. Principe

L'aorte de rats Wistar est prélevée, nettoyée de tout tissu adhérent et coupée en segments d'environ 5 mm. Ces segments sont ensuite suspendus dans un bain thermostaté à 37°C contenant un tampon d'incubation (Krebs-Henseleit) et oxygéné par du carbogène (mélange O₂-CO₂ 95-5%), amenant le pH à 7,4.

Après stabilisation de la tension à un gramme, une contraction est déclenchée par l'ajout de 5-HT à une concentration finale de 2 μ M. Cette concentration a été choisie sur base des courbes doses-réponses réalisées avec le 5-HT. Une fois la tension maximale atteinte et stable, les tissus sont relâchés par paliers au moyen de concentrations croissantes en diastéréoisomères du naftidrofuryl.

III.1.3.2. Effet des diastéréoisomères du naftidrofuryl sur la contraction de l'aorte

L'aorte de rat préalablement contractée par le 5-HT [2 μ M]_F est relâchée par des concentrations croissantes en diastéréoisomères du naftidrofuryl (de 1,20.10⁻⁵ à 1,23.10⁻⁹ M pour le diastéréoisomère 2R,2'S ; de 1,14.10⁻⁵ à 1,16.10⁻⁹ M pour le diastéréoisomère 2S,2'R ; de 3,76.10⁻⁵ à 3,83.10⁻⁹ M pour le diastéréoisomère 2R,2'R ; et de 3,63.10⁻⁵ à 4,36.10⁻⁹ M pour le diastéréoisomère 2S, 2'S). La *Figure III.8* montre les courbes doses-réponses de chaque diastéréoisomère obtenues à partir des tracés représentant l'évolution de la tension au fil du temps (*Figure III.9*). Les valeurs d'IC₅₀ déterminés sur base de ces courbes doses-réponses sont repris dans le *Tableau III.2* et sont définis comme les concentrations en diastéréoisomères requises pour relâcher de 50 % la tension maximale induite par le 5-HT [2 μ M]_F.

Aucun classement des diastéréoisomères ne peut se faire sur base de leur activité myorelâchante en raison de leurs valeurs d'IC₅₀ statistiquement comparables.

III.2. Evaluation *in vitro* de l'activité pharmacologique du naftidrofuryl (Praxilène®) sur la mobilisation du calcium intracellulaire

III.2.1. Objectifs et démarche scientifique

L'activation du récepteur TP, récepteur couplé à une protéine G, entraîne une libération de calcium des réserves cellulaires situées dans le réticulum endoplasmique au niveau du cytoplasme suite à l'action de l'IP₃ (voir point I.1.3.3.). Ainsi, l'étude de la mobilisation de calcium intracellulaire constitue un outil de choix dans la mesure de l'activité du récepteur (Lin *et al.*, 1999).

Le but de cette seconde partie est d'étudier les effets du naftidrofuryl et du picotamide sur la mobilisation du calcium intracellulaire en réponse à une stimulation du récepteur TP par le U-46619 ou le 8-iso-PGF_{2α}. Le SQ-29548 et le BM-520 ont également été testés en tant que drogues-antagonistes de référence.

Pour ce modèle *in vitro*, nous avons utilisé deux lignées de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293, *Human Embryonic Kidney 293 Cells*), surexprimant chacune une des deux isoformes du récepteur TP ainsi qu'une lignée de cellules humaines musculaires lisses de type vasculaire (HVSMC, *Human Vascular Smooth Muscle Cells*). Les HEK293 TP α et TP β ont été choisies afin de déterminer s'il existait une éventuelle sélectivité des antagonistes vis-à-vis de l'une des deux isoformes du récepteur TP tandis que les HVSMC ont été sélectionnées pour leur appartenance aux cellules musculaires lisses que l'on retrouve chez l'homme au niveau des vaisseaux sanguins. Une stimulation des HEK 293 et des HVSMC aux agonistes du récepteur TP, tels que le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}, engendre diverses réponses cellulaires (Kelley-Hickie & Kinsella, 2004 ; Wilson *et al.* 2006 ; Zhang *et al.*, 2008).

Cette seconde partie a été réalisée en deux temps. Premièrement, le test de mesure de la mobilisation du calcium intracellulaire a été mis au point et validé de façon systématique avec chaque type cellulaire. Ainsi, différents paramètres ont été optimisés tels que le type de sonde fluorimétrique utilisé, sa concentration, le nombre de cellules nécessaires et la concentration en agoniste efficace permettant de stimuler les cellules. Les effets des différentes drogues sur la mobilisation de calcium ont été ensuite mesurés.

III.2.2. Principe du test

III.2.2.1. Définition de la fluorescence

La fluorescence est un processus par lequel une molécule ou un atome absorbe de la lumière à une longueur d'onde donnée et la ré-émet à une autre longueur d'onde. Ce phénomène se déroule en trois étapes (**Figure III.10**). La première étape est une phase d'excitation durant laquelle le fluorophore absorbe un photon d'énergie $h\nu_{\text{ex}}$, faisant passer de cette manière le fluorophore d'un état non-excité S_0 à un état d'excitation S_1' . Cet état d'excitation est de durée limitée (1-10 ns). Ainsi, durant la deuxième étape, le fluorophore subit de nombreux changements conformationnels ainsi que diverses interactions avec son environnement entraînant une dissipation de l'énergie absorbée jusqu'à un état d'excitation S_1 . Enfin, la troisième étape est à l'origine de la fluorescence et est appelée phase d'émission. Elle correspond à l'émission d'un photon de faible

énergie, et donc de longueur d'onde plus importante, par le fluorophore entraînant son retour d'un état d'excitation S_1 à son état d'excitation d'origine S_0 (Haugland, 2002).

III.2.2.2. Détection et quantification des ions calcium

La quantification des ions calciums se fait notamment grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes. Malgré leurs propriétés physico-chimiques différentes, toutes ces molécules partagent néanmoins une caractéristique commune : elles sont constituées d'un groupement chélateur de calcium et d'une entité capable d'émettre de la fluorescence. La liaison de ces sondes aux ions calcium (Ca^{2+}) est responsable d'une variation de la fluorescence.

La plupart des sondes fluorescentes pénètrent difficilement à l'intérieur des cellules car ces molécules sont généralement des anions polycarboxylates. Ces sondes sont donc conditionnées sous une forme acétoxyméthyl ester (AM). Ces composés étant hydrophobes et ne portant aucune charge, pénètrent plus facilement à l'intérieur des cellules. Une fois à l'intérieur de celles-ci, des estérases cellulaires clivent les groupements AM libérant ainsi le fluorophore. Cette forme hydrolysée ne peut plus retraverser passivement la membrane et est donc la seule la forme capable d'émettre de la fluorescence en se liant au calcium (Takahashi et al., 1999 ; Nuccitelli, 1994) (**Figure III.11**).

Il existe de nombreuses sondes fluorescentes. Elles peuvent néanmoins être classées en deux grands groupes : les sondes ratiométriques et les sondes non-ratiométriques. Les sondes non-ratiométriques sont caractérisées par une augmentation de l'intensité de la fluorescence émise lors de la liaison aux ions calcium sans changement au niveau de leur spectre d'absorption et d'émission. Le *Fluo-4 AM* et *Quin-2* sont ; par exemple, deux fluorophores appartenant à cette première classe. Les sondes ratiométriques sont quant à elles caractérisées non seulement par une augmentation de l'intensité de fluorescence lors de la liaison au calcium mais également par un *shift* dans les spectres d'émission ou d'absorption. Le *Fura-2* et l'*Indo-1* sont les sondes les plus courantes de cette seconde catégorie (Takahashi et al., 1999).

Auparavant, la mesure d'un flux de calcium lors d'une réponse cellulaire était réalisée à l'aide d'un fluorimètre classique (Arnould et al., 1992). Cependant, ce protocole est particulièrement difficile à mettre en œuvre et prend énormément de temps. En outre, un fluorimètre classique ne permet pas d'effectuer de cinétique et les intervalles de temps entre deux mesures sont généralement trop longs pour mesurer de façon précise des phénomènes biologiques rapides tel que la libération de calcium. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de mettre au point un protocole rapide et facile à mettre en œuvre permettant l'étude de la cinétique de la mobilisation du calcium intracellulaire grâce à un fluorimètre de type lecteur de plaques multi-puits.

III.2.3. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les cellules HEK 293 TPβ grâce au Fluo-4 AM

La mise au point du protocole a d'abord été réalisée sur la lignée cellulaire HEK 293 TPβ car d'une part, ces cellules se cultivent beaucoup plus facilement que les HVSMCs et d'autre part, nos différentes publications de référence traitant de la

mobilisation du calcium intracellulaire utilisent cette souche cellulaire (*Hanson, 2005 ; Lin et al., 1999*).

III.2.3.1. Choix de la sonde

Le choix d'une sonde non-ratiométrique semblait le plus approprié car ce type de sonde permet le travail à une seule longueur d'onde d'émission et une seule longueur d'onde d'excitation et est caractérisée par une augmentation de l'intensité de fluorescence.

Le *Fluo-4 AM* (**Figure III.12**) est un composé fluorescent appartenant à cette classe. Il est largement utilisé dans diverses recherches impliquant la mobilisation du calcium intracellulaire (*Gilchrist et al., 2008*). En effet, cette sonde présente une augmentation de l'intensité du signal importante lors de la liaison aux ions calcium ainsi qu'une très bonne affinité vis-vis du calcium. De plus, le pic d'excitation du *Fluo-4* est situé à 480 nm au niveau du spectre du visible ; ce qui évite aux cellules d'être endommagées par les UVs lors de l'excitation de la sonde (*Gee et al., 2000*).

La quantification du calcium avec ce type de sonde se réalise grâce à la formule mathématique suivante :

$$[\text{Ca}^{++}] = K_d \times \left[\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right]$$

où le F correspond à la valeur de la fluorescence mesurée. Le F_{\max} , ou fluorescence maximale, correspond à la concentration maximale en calcium présente dans les cellules et se mesure après la lyse de celles-ci par le Triton X-100. Le F_{\min} , ou fluorescence minimale, représente l'auto-fluorescence des cellules (membranes,...) et est mesuré par ajout d'un chélateur de calcium : l'EGTA. Ces valeurs de F_{\max} et de F_{\min} permettent de normaliser les résultats en tenant compte des variations des stocks de calcium et de l'autofluorescence des cellules. Enfin le K_d , ou constante de dissociation, est défini comme la concentration en sonde à laquelle 50~% de celle-ci est liée au calcium (*Tsien et Pozzan, 1989 ; Takahashi et al., 1999 ; Nuccitelli et al., 1994*).

III.2.3.2. Détermination du nombre de cellules

Un paramètre essentiel à déterminer est la quantité de cellules par millilitres (ml) à utiliser lors de l'étude de la mobilisation de calcium. En effet, plus le nombre de cellules est important et plus le signal fluorescent émis sera important. De plus, il est important de choisir une condition où la variation du signal fluorescent ($F_{\text{stimulé}}/F_{\text{basal}}$) soit suffisante afin de pouvoir discriminer un éventuel effet antagoniste lors des expériences avec les drogues.

Nous avons développé le protocole de ces expériences sur base d'articles de *Lin et al.* et de *Hanson et al.* décrivant une méthode rapide de mesure de la mobilisation de calcium intracellulaire en temps réel à l'aide d'un fluorimètre à plaque multipuits (*Lin et al., 1999 ; Hanson et al., 2005*).

Des cellules en suspension préalablement chargées en sonde fluorescente sont dispensées dans une plaque 96 puits à une concentration cellulaire déterminée. La fluorescence basale (F_{basal}), correspondant à la concentration initiale en calcium cytoplasmique, est déterminée. Ces cellules sont ensuite stimulées par un agoniste du récepteur TP et la fluorescence après stimulation ($F_{\text{stimulé}}$) est mesurée. Celle-ci correspond à la somme des concentrations en calcium libérées des réserves et présentes avant la stimulation dans le cytoplasme. Elle est mesurée durant toute la durée de la libération jusqu'à la restauration du niveau basal de la fluorescence.

Afin de permettre la normalisation des résultats, la fluorescence maximale et la fluorescence minimale sont également mesurées grâce à l'ajout de Triton X100 (F_{max}) puis d'EGTA (F_{min}).

Lors de ce premier test visant à déterminer le nombre de cellules nécessaires au test, les concentrations en *Fluo-4 AM* [$5\mu\text{M}$]_F et en U-46619 [$1\mu\text{M}$]_F utilisées sont basées sur des valeurs trouvées dans la littérature (*Hanson, 2005*). L'influence de la modification de ces paramètres a été étudiée par la suite.

Quelque soit la fluorescence mesurée (F_{max} , F_{min} , $F_{\text{stimulé}}$), nous pouvons constater que la relation entre le nombre de cellules et l'intensité de la fluorescence est proportionnelle (**Figure III.13**). En effet, plus le nombre de cellules est important et plus la concentration intracellulaire en ions calcium disponible sera importante. La quantité de sondes se liant au calcium sera donc plus importante et l'intensité de fluorescence également. Il est à noter que l'intensité de l'autofluorescence (F_{min}) a été soustraite à toutes les autres conditions afin de n'obtenir que les valeurs propres à l'intensité du signal fluorescent de chaque paramètre.

Nous avons ainsi choisi de travailler avec une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml. En effet, cette condition présente un excellent rapport $F_{\text{stim}}/F_{\text{basal}}$. De plus, dans ces conditions, une seule boîte de cellules à confluence permet de remplir aisément une plaque 96 puits.

III.2.3.3. Détermination de la concentration en *Fluo-4 AM*

Il est généralement décrit dans la littérature que la concentration optimale en *Fluo-4 AM* utilisée dans ce type d'expériences est comprise entre 1 et $10\mu\text{M}$ (*Haugland, 2002*). Dans cet intervalle, trois concentrations (2,5 ; 5 et $10\mu\text{M}$) ont donc été choisies afin d'étudier l'influence de la concentration en fluorophore sur le signal fluorescent et ainsi, déterminer la concentration optimale en *Fluo-4 AM* à utiliser.

Ce paramètre n'est pas facile à optimiser. Ainsi, plus la concentration en *Fluo-4 AM* est importante et plus le signal émis est important. Cependant, deux phénomènes interfèrent avec cette constatation : d'une part, la concentration en ions calcium limitée des cellules et d'autre part, le clivage par les estérases des groupements acétoxyméthyl esters génère des produits toxiques pour les cellules (*Haugland, 2002*).

Nous pouvons constater (**Figure III.14**) que le signal n'augmente pas lors du passage d'une concentration de 5 à $10\mu\text{M}$ en *Fluo-4 AM* signifiant que la sonde se trouve bien en excès par rapport aux ions calcium tandis que le passage d'une concentration de $5\mu\text{M}$ à $2,5\mu\text{M}$ diminue le signal. De plus, aucun effet toxique du

Fluo-4 AM n'a pu être mis en évidence dans cette gamme de concentration. A partir de ces résultats, nous avons conclu que la concentration optimale en *Fluo-4 AM* à utiliser était de 5 μM . Il est à noter que l'intensité de l'autofluorescence (F_{\min}) a été soustraite à toutes les autres conditions afin de n'obtenir que les valeurs propres à l'intensité du signal fluorescent de chaque paramètre.

III.2.3.4. Calibration *in situ* des cellules HEK 293 TP β

Pour rappel, la quantification de la concentration intracellulaire en calcium à partir du signal fluorescent s'effectue en tenant compte du K_d (ou constante de dissociation de la sonde et du calcium) (Tsien et Pozzan, 1989 ; Takahashi et al., 1999 ; Nuccitelli et al., 1994) :

$$[\text{Ca}^{++}] = K_d \times \left[\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right]$$

Il existe différentes manières de mesurer cette constante. Généralement, celle-ci est mesurée *in vitro* dans du tampon en l'absence de cellules. Ainsi, beaucoup d'équipes de recherche utilisent ces valeurs théoriques reprises dans la littérature (Gee et al., 2000). Cependant, le K_d varie en fonction du pH, de la température, des forces ioniques, de la viscosité du milieu ainsi que des constituants intracellulaires (Nuccitelli et al., 1994, Takahashi et al., 1999). Il est par conséquent fondamental de déterminer ce K_d *in situ*, c'est-à-dire en présence de la lignée cellulaire d'intérêt. Nous avons donc déterminé la valeur de K_d du *Fluo-4 AM* en présence de cellules HEK 293 TP β .

Les cellules sont mises en présence de différentes concentrations en calcium mimant une libération du calcium intracellulaire. La membrane plasmique des cellules est ensuite déstabilisée par ajout d'ionomycine [20 μM]_F afin de permettre aux ions de calcium de pénétrer à l'intérieur des cellules et ainsi permettre de cette manière la liaison du *Fluo-4* aux ions calcium. L'intensité de la fluorescence émise sera donc proportionnelle à la concentration en calcium présent dans les puits. La normalisation des résultats par ajout de Triton X100 et d'EGTA est enfin réalisée.

Ainsi, nous avons déterminé une valeur de K_d de 1239 nM (IC_{95} : 629-2999 nM) pour le *Fluo-4 AM* chez les HEK 293 TP β (**Figure III.15**).

III.2.3.5. Détermination du temps de mesure après la stimulation par les agonistes

La mobilisation du calcium intracellulaire étant un phénomène biologique rapide et de courte durée, il s'est avéré nécessaire de connaître le temps nécessaire pour que la mobilisation soit maximale. Ainsi, une stimulation d'une suspension cellulaire à 5.10⁶ cellules par millilitres au U-46619 [1 μM]_F nous a permis d'établir la cinétique de ce phénomène biologique (**Figure III.16**). Le pic de libération de calcium, correspondant à la concentration maximale en calcium libérée suite à la stimulation au U-46619 ($F_{\text{stimulé}}$) est atteint 28 secondes après la stimulation.

La cinétique de la mobilisation du calcium intracellulaire suite à une stimulation au 8-iso-PGF_{2α} a également été réalisée. Ainsi, le pic de libération des ions calcium est atteint après 27 secondes.

III.2.3.6. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser

Un dernier paramètre a finalement été optimisé : la concentration en agoniste utilisée afin de déclencher la mobilisation du calcium intracellulaire. Pour rappel, la variation de l'intensité de fluorescence ($F_{\text{stimulé}}/F_{\text{basal}}$) doit être suffisante afin de pouvoir détecter un éventuel effet antagoniste des drogues étudiées. Afin d'optimiser ce paramètre, des courbes doses-réponses au U-46619 et au 8-iso-PGF_{2α} ont été réalisées. Ainsi, notre adaptation des protocoles de *Lin et al.* et de *Hanson et al.* nous a permis de mesurer une mobilisation dose-dépendante du calcium intracellulaire induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α} (**Figure III.17**). La concentration en calcium libre correspond à la somme des concentrations en calcium libérées des réserves et présentes avant la stimulation dans le cytoplasme.

L' EC'_{50} , défini comme la concentration en agoniste nécessaire pour induire 50 % de la mobilisation de calcium intracellulaire maximale, est de 0,21 μM (IC_{95} : 0,15-0,29 μM) pour le U-46619 et de 9,58 μM (IC_{95} : 6,46-14,22 μM) pour le 8-iso-PGF_{2α}. Un déplacement de la courbe du 8-iso-PGF_{2α} vers de plus hautes concentrations par rapport à la courbe du U-46619 a donc été observé, indiquant un pouvoir agoniste du 8-iso-PGF_{2α} 45 fois plus faible que celui du U-46619. Enfin, nous pouvons constater, sur les deux courbes, que nous atteignons une phase plateau aux plus hautes concentrations signifiant que l'effet maximal est atteint dû probablement à une saturation des récepteurs TP. Nous avons ainsi choisi comme concentration optimale en agoniste la première concentration atteignant la phase plateau soit 1 μM pour le U-46619, valeur confirmée par les données de la littérature (*Hanson, 2005*) et 100 μM pour le 8-iso-PGF_{2α}.

III.2.4. Effet des drogues sur la libération de calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TPβ

L'activité des différents antagonistes après une stimulation des cellules HEK 293 TPβ au U-46619 [1 μM]_F ou au 8-iso-PGF_{2α} [100 μM]_F a été étudiée. Lors de ces expériences, les cellules sont incubées avant la stimulation pendant 5 minutes en présence des antagonistes à différentes concentrations. Pour chaque drogue, une courbe d'inhibition de la mobilisation du calcium a été établie et l' IC_{50} , soit la concentration en antagoniste inhibant 50 % de la mobilisation du calcium intracellulaire, a été déterminée.

L'utilisation des drogues a permis une inhibition dose-dépendante de la mobilisation de calcium intracellulaire déclenchée par le U-46619 [1 μM]_F. Ainsi, les premières concentrations en drogues n'inhibent pas la mobilisation du calcium. A partir d'une certaine concentration en drogue, l'inhibition augmente de manière proportionnelle à la concentration en drogue. Une phase plateau est observée une fois l'inhibition totale atteinte (**Figure III.18**). Ainsi, le SQ-29548 et le BM-520 inhibent cette mobilisation du calcium à de faibles concentrations et cet effet se renforce au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en drogue utilisée. Par contre, le picotamide et le naftidrofuryl commencent à inhiber cette mobilisation de calcium uniquement à de fortes concentrations si bien que la courbe d'inhibition n'a pas été

totale établie. Les valeurs d'IC₅₀ mesurées pour les différentes drogues lors d'une stimulation par le U-46619 [1 µM]_F sont reportées dans le **Tableau III.3**.

De même, la mobilisation de calcium induite par le 8-iso-PGF_{2α} est inhibée de façon dose-dépendante en présence des différentes drogues (**Figure III.19**). Les valeurs d'IC₅₀ des drogues après une stimulation au 8-iso-PGF_{2α} [100 µM]_F sont reportées dans le **Tableau III.3**.

Un classement de ces molécules peut donc être établi sur base du pouvoir inhibiteur de la libération du calcium des réserves quel que soit l'inducteur: SQ-29548 > BM-520 > naftidrofuryl > picotamide. Il est à noter qu'une validation de notre test a pu être établie grâce à la valeur d'IC₅₀ du SQ-29548 qui correspond à celle reprise dans la littérature pour la stimulation au U-46619 (*Moore et al., 2001*).

Dans cette étude, le picotamide et le naftidrofuryl apparaissent donc comme de faibles antagonistes de l'isoforme β du récepteur TP stimulée par le U-46619 [1 µM]_F ou le 8-iso-PGF_{2α} [100 µM]_F par comparaison à des antagonistes forts et spécifiques comme le SQ-29548 et le BM-520.

III.2.5. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les cellules HEK 293 TPα grâce au Fluo-4 AM

En raison des similarités entre les cellules HEK 293 TPα et les cellules HEK 293 TPβ, nous avons décidé d'utiliser le même protocole que celui décrit précédemment. Nous avons cependant déterminé cette fois encore le K_d et les concentrations en agonistes à utiliser.

III.2.5.1. Calibration *in situ* des cellules HEK 293 TPα

La détermination du K_d pour les cellules HEK 293 TPα a été réalisée de la même manière que pour le type cellulaire précédent (voir III.2.3.4.). Nous avons ainsi mesuré une valeur de K_d de 7294 nM (IC₉₅ : 2937-27164 nM). Celle-ci est donc différente de celle mesurée chez les HEK 293 TPβ (1239 nM (IC₉₅ : 629-2999 nM)) montrant que le *Fluo-4* est plus affin chez ces dernières (**Figure III.20**). Ces résultats illustrent donc l'importance d'effectuer une calibration *in situ* pour chaque type cellulaire.

III.2.5.2. Détermination du temps de mesure après la stimulation aux agonistes

Comme pour les cellules HEK 293 TPβ, il était nécessaire de connaître le temps à utiliser lors de la mesure d'une libération maximale du calcium intracellulaire (F_{max}). Ainsi, une stimulation d'une suspension cellulaire à 5.10⁶ cellules par ml par le U-46619 [1 µM]_F nous a permis d'établir la cinétique de ce phénomène biologique (**Figure III.21**). Le pic de stimulation correspondant à la concentration en calcium maximale libérée après une stimulation au U-46619 (F_{stimulé}) mesurée est atteint 27 secondes après la stimulation.

Une cinétique de mobilisation du calcium intracellulaire après une stimulation au 8-iso-PGF_{2α} a également été réalisée. Ainsi, le pic de libération des ions calcium est atteint après 29 secondes.

III.2.5.3. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser

La libération du calcium des réserves du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme suit une courbe dose-réponse de type sigmoïde (**Figure III.22**). Ainsi, les plus faibles concentrations en agoniste n'induisent pas de mobilisation de calcium. A partir d'une certaine concentration, la libération de calcium des réserves cellulaires augmente de manière proportionnelle à la concentration en agoniste. Enfin, à partir d'une certaine concentration, la libération de calcium n'augmente plus et une phase plateau est atteinte.

Les EC'_{50} calculés sont de 0,12 μM pour le U-46619 (IC_{95} : 0,015-0,96 μM) et de 6,25 μM pour le 8-iso-PGF_{2 α} (IC_{95} : 3,92-9,99 μM). Comme pour les cellules HEK 293 TP β , nous pouvons constater un déplacement de la courbe du 8-iso-PGF_{2 α} vers de plus hautes concentrations par rapport à celle du U-46619, indiquant un pouvoir agoniste du 8-iso-PGF_{2 α} 52 fois plus faible que celui du U-46619. Le choix des concentrations à utiliser lors des tests a été réalisé de la même manière qu'avec les cellules HEK 293 TP β . Ainsi, la concentration choisie pour le U-46619 est 1 μM , valeur confirmée par les données de la littérature (*Hanson, 2005*) tandis que la valeur retenue pour le 8-iso-PGF_{2 α} est 100 μM .

III.2.6. Effet des drogues sur la libération de calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TP α

Des résultats similaires à ceux des cellules HEK 293 TP β ont été obtenus chez les cellules HEK 293 TP α . Ainsi, l'utilisation des drogues a permis une inhibition dose-dépendante de la mobilisation de calcium intracellulaire déclenchée par le U-46619 [1 μM]_F ou par le 8-iso-PGF_{2 α} [100 μM]_F. Ainsi, quel que soit l'agoniste utilisé, le SQ-29548 et le BM-520 inhibent la mobilisation du calcium à de faibles concentrations et cet effet se renforce au fur et à mesure que la concentration en drogue utilisée augmente. Par contre, le picotamide et le naftidrofuryl commencent à inhiber la mobilisation de calcium uniquement à de fortes concentrations, si bien que la courbe d'inhibition n'a pu être totalement établie (**Figure III.23 et Figure III.24**). Les valeurs d' IC_{50} mesurées pour les différentes drogues utilisées lors d'une stimulation au U-46619 ou au 8-iso-PGF_{2 α} sont reportées dans le **Tableau III.3**. Un classement de ces molécules, identique à celui observé chez les HEK293 TP β , peut donc être établi : SQ-29548 > BM-520 > naftidrofuryl > picotamide.

Le picotamide et le naftidrofuryl apparaissent donc également comme de faibles antagonistes de l'isoforme α du récepteur TP en comparaison à des antagonistes forts et spécifiques comme le SQ-29548 et le BM-520.

De plus, nous pouvons constater que les valeurs d' IC_{50} des différentes drogues lors de stimulations des différentes isoformes du récepteurs TP sont similaires. Ceci nous indique donc qu'aucune des drogues ne semble présenter une sélectivité vis-à-vis d'un sous-type du récepteur TP.

III.2.7. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les HVSMC grâce au Fluo-4 AM

Après l'étude de l'effet des drogues sur les deux isoformes du récepteur chez les cellules HEK 293 TP α et TP β , l'utilisation des HVSMC a permis d'étudier *in vitro* les effets des différentes drogues sur la mobilisation du calcium dans une lignée cellulaire présente chez l'homme.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'adapter le protocole mis au point sur les cellules HEK 293 chez les cellules HVSMC. Comme pour les cellules HEK 293, la détermination du nombre de cellules par ml à utiliser est primordiale. La condition choisie devra répondre à un paramètre essentiel soit avoir un ratio de fluorescence F_{stim}/F_{basal} suffisant. Le choix de la concentration en *Fluo-4 AM* a été réalisé de la même manière qu'avec les cellules HEK 293. Ainsi, trois concentrations furent choisies (2,5, 5 et 10 μ M) dans un intervalle allant de 1 à 10 μ M. Les différentes concentrations cellulaires furent ainsi testées avec différentes concentrations en *Fluo-4 AM*.

Quelque soit le paramètre de fluorescence mesuré (F_{basal} , $F_{stimulé}$, F_{max}), nous pouvons constater, comme pour les cellules HEK 293, que l'intensité du signal fluorescent est proportionnel au nombre de cellules (**Figure III.25**). De plus, en ce qui concerne l'influence de la concentration en sonde, le passage d'une concentration de 5 à 10 μ M en *Fluo-4 AM* diminue légèrement l'intensité des signaux fluorescents laissant penser à un effet toxique des produits d'hydrolyse de la sonde. Par contre, le passage d'une concentration de 5 à 2,5 μ M diminue fortement l'intensité du signal. La concentration finale optimale en sonde semble donc être 5 μ M.

Néanmoins, de façon étonnante, la stimulation des HVSMC au U-46619 [1 μ M]_F n'induit aucune variation du signal fluorescent. Ainsi, les intensités des signaux fluorescents du F_{basal} et du $F_{stimulé}$ sont quasiment identiques et ce, quelque soit les conditions testées ($F_{stimulé}/F_{basal} \approx 1$).

Deux hypothèses sont donc envisageables. La première est que la valeur du F_{basal} est normale et que la valeur du $F_{stimulé}$ est trop basse ; ce qui indiquerait une concentration en agoniste trop faible pour stimuler efficacement le récepteur TP. Ce qui semble fort peu probable étant donné que le U-46619 est connu pour être un excellent inducteur de la mobilisation de calcium et que la concentration utilisée est décrite dans la littérature comme permettant d'obtenir une réponse maximale lors de la stimulation des HVSMC (Miki *et al.*, 1992).

La seconde hypothèse est que la valeur du $F_{stimulé}$ est normale et la valeur du F_{basal} est trop élevée. Cette seconde hypothèse semble d'ailleurs concorder avec le fait que le ratio $F_{max}/F_{stimulé}$ est relativement bas comparé aux données obtenues chez les cellules HEK293. Il y aurait donc une incompatibilité d'utilisation du *Fluo-4 AM* chez les HVSMC comme sonde de dosage de la mobilisation du calcium. Deux phénomènes pourraient ainsi expliquer ces résultats : la compartimentalisation et/ou la perte (*leakage*) de la sonde (Haugland, 1996 ; Takahashi *et al.*, 1999 ; Nuccitelli *et al.* 1994). Nous avons donc étudié la présence ou non de ces deux phénomènes chez les HVSMC et les HEK 293 TP TP β .

III.2.7.1. Etude de la compartimentalisation du *Fluo-4 AM* dans les cellules HVSMC et les cellules HEK293 TP β

Lors du *loading* du *Fluo-4 AM* dans la cellule, la situation idéale serait que la sonde se retrouve exclusivement dans le cytoplasme. Cependant, cette situation n'est jamais atteinte et une compartimentalisation de la sonde est généralement observée. En effet, comme la forme AM passe facilement à travers la membrane plasmique, la sonde non-hydrolysée est également capable de se retrouver à l'intérieur des organelles en passant à travers les membranes de celles-ci. Les organelles sont connues pour contenir une concentration en ions calcium supérieure à celle du cytosol. Les sondes se lient donc au calcium et génèrent un signal fluorescent responsable d'un bruit de fond important (Nuccitelli et al., 1994). Ce passage à travers ces membranes peut également être médié par des transporteurs anioniques (Di Virgilio et al., 1990). De plus, certains types cellulaires sont capables d'endocyter les différents constituants du tampon d'incubation comme la forme AM de la sonde (Nuccitelli et al., 1994). Ces sondes endocytées seront dès lors hydrolysées à l'intérieur des vésicules d'endocytose et des organelles participant à ce phénomène.

Enfin, il est à noter que la compartimentalisation est un processus dépendant de la température. Ainsi, chez les cellules REF52, 30% du *Fura-2* total est compartimentalisé lorsqu'il est chargé sous sa forme AM à 37°C tandis que seulement 10% de la concentration totale en *Fura-2* est compartimentalisée lorsqu'il est chargé à 23°C (Nuccitelli et al., 1994).

Nous avons donc tenté de mettre en évidence la présence du phénomène de compartimentalisation grâce à l'étude de la distribution intracellulaire de la sonde. Cette expérience a été réalisée à la fois sur les HVSMC et sur les HEK 293 TP β afin de pouvoir caractériser l'étendue du problème.

L'estimation de la compartimentalisation d'un indicateur se réalise par la mesure de la concentration en calcium présent dans le cytoplasme et dans les organelles au cours du temps. Pour ce faire, les cellules chargées en sonde sont tout d'abord traitées à la digitonine [20 μ M]_F, ce qui induit la perméabilisation sélective de la membrane plasmique. Cette perméabilisation sélective permet la sortie des fluorophores et des ions calcium présents au niveau du cytoplasme. Ensuite, un traitement au Triton X-100 [1%]_F permet la lyse des membranes des organelles entraînant la libération des ions calcium présents au niveau des organelles (Kao et al., 1989). L'expérience se réalise dans un tampon pauvre en calcium (HBSS) enrichi en EGTA.

Quel que soit le type cellulaire, le signal fluorescent total, résultant de la contribution des sondes présentes au niveau du cytosol et des sondes compartimentalisées, reste stable durant la période précédant l'ajout de digitonine [20 μ M]_F (Figure III.26). L'ajout de ce composé entraîne une diminution du signal fluorescent dû à la capture par l'EGTA des ions calcium relargués à partir du cytosol suite à la perméabilisation de la membrane plasmique. L'intensité du signal fluorescent mesuré juste avant l'ajout de Triton X100 [1%]_F représente la fluorescence émise par le *Fluo-4* compartimentalisé au niveau des organelles (F_{org}). La fraction compartimentalisée de la concentration totale en sonde varie selon le type cellulaire. Ainsi, les HEK 293 TP β présentent un pourcentage de compartimentalisation de 40% tandis que chez les HVSMC ce pourcentage monte jusqu'à 60%.

III.2.7.2. Etude du leakage du Fluo-4 AM dans les cellules HVSMC et les cellules HEK293 TP β

Le *leakage* est le processus par lequel la cellule expulse une sonde fluorimétrique de son milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ce mécanisme est régulé par les transporteurs anioniques “multidrugs”. L’utilisation de probénécide ou de sulfinpyrazone permet d’inhiber ces transporteurs et ainsi de limiter ce processus de *leakage*. Le taux d’expulsion de la sonde étant dépendant de la température et du type cellulaire (Takahashi et al., 1999).

Nous avons donc étudié le phénomène de *leakage* en réalisant la cinétique de l’incorporation du Fluo-4 AM chez les HVSMC et les HEK 293 TP β en présence ou non de probénécide [2,5 μ M]_F. Pour rappel, cette drogue est un inhibiteur des transporteurs “multidrugs” et empêche l’expulsion de la sonde vers le milieu extracellulaire.

Ainsi, les cellules HVSMC et HEK 293 TP β traitées au probénécide incorporent de manière continue la sonde sans en expulser. Les cellules non-traitées au probénécide montrent une augmentation du signal fluorescent durant les premières minutes de l’incubation. Ensuite, cette fluorescence diminue et atteint une phase plateau. Ces deux types cellulaires présentent donc un phénomène de *leakage* (Figure III.27). Ainsi, les HVSMC perdent 48% des sondes internalisées durant la période d’incubation (60 minutes dans notre protocole standard) tandis que les HEK 293 TP β perdent environ 40% de la concentration totale en Fluo-4 AM internalisée.

III.2.7.3. Conclusion

Lors de la mise au point du dosage de calcium dans les cellules HVSMC à l’aide de Fluo-4 AM, aucune variation du signal fluorescent n’avait été observée lors de la stimulation des HVSMC par le U-46619 [1 μ M]_F. La valeur de $F_{\text{stimulé}}$ semblait normale alors que la valeur de F_{basal} paraissait trop élevée. De plus, le ratio $F_{\text{max}}/F_{\text{stimulé}}$ était relativement bas comparé aux données obtenues chez les cellules HEK293. Ces constatations semblent trouver une explication au vu des résultats obtenus lors des expériences de mise en évidence des phénomènes de compartimentalisation et de *leakage*. Ainsi, bien que présents dans les deux types cellulaires, la compartimentalisation et le *leakage* sont plus importants chez les HVSMC que chez les HEK 293 TP β .

Afin de minimiser ces phénomènes, deux solutions existent : une diminution de la température à laquelle se réalisent les expériences (37°C à 25°C) pourraient limiter la compartimentalisation et le *leakage*, tandis que l’utilisation d’un inhibiteur des transporteurs anioniques “multidrugs” tel que le probénécide interférerait avec le *leakage* (Takahashi et al., 1999 ; Nuccitelli, 1994). Nos expériences se réalisant déjà à 25°C, nous ne pouvons optimiser ce paramètre et éviter la compartimentalisation. En ce qui concerne le *leakage*, l’utilisation de probénécide risquerait d’interférer avec la mesure de l’effet des différentes drogues. En conclusion, le Fluo-4 AM ne semble pas approprié dans le cadre d’une étude de la mobilisation de calcium chez les HVSMC. Le choix d’une autre sonde s’est donc imposé.

III.2.8. Mise au point du test de mesure de la mobilisation de calcium dans les cellules HVSMC grâce au *Fura-2 AM*

III.2.8.1. Choix de la sonde

Suite à l'incompatibilité d'utilisation du *Fluo-4 AM* chez les HVSMC, une revue de la littérature s'est avérée nécessaire. Ainsi, l'étude de flux de calcium chez les HVSMC se réalise grâce au *Fura-2 AM* (Xie et al., 1998 ; Patel et al., 2005).

Le *Fura-2* (**Figure III.28**) appartient à la classe des sondes ratiométriques. Ce type de sonde possède la particularité d'effectuer un *shift* dans ses longueurs d'ondes. Ainsi, le *Fura-2* excité à 340 nm produit une augmentation du signal fluorescent tandis qu'une excitation à 380 nm entraîne une diminution de ce signal. Lorsque la sonde est excitée grâce à une succession rapide d'excitation à 340 et 380 nm, le calcul d'un ratio R entre les intensités mesurées après excitation à ces deux longueurs d'ondes permet d'étudier l'évolution de la mobilisation de calcium. L'utilisation de ce type de sonde permet également des mesures plus précises car le ratio est indépendant de la concentration en sonde, de l'intensité de l'excitation, du *leakage* et du "photobleaching" de la sonde (Nuccitelli et al., 1994 ; Takahashi et al., 1999).

La quantification de la concentration en calcium avec ce type de sonde se calcule grâce à la formule suivante :

$$[Ca^{2+}] = \beta \cdot K_d \cdot \frac{[R - R_{min.}]}{[R_{max} - R]}$$

où le R correspond à la valeur du ratio des intensités des fluorescences mesurées. Le R_{max} , ou ratio des fluorescences maximales, correspond à la concentration maximale en calcium présente dans les cellules et se mesure suite à la lyse des cellules par le Triton X100. Le R_{min} , ou ratio des fluorescences minimales, représente l'auto-fluorescence des cellules (membranes,...) et est mesuré par ajout d'EGTA. Ces valeurs de R_{max} et R_{min} permettent comme pour les tests avec le *Fluo-4* la normalisation des résultats. Enfin, le K_d , ou constante de dissociation, est défini comme la concentration en sonde à laquelle 50 % de celle-ci est liée au calcium (Tsien et Pozzan, 1989). Dans cette formule, le β correspond au ratio des ratios de fluorescence lorsque la sonde est complètement saturée et lorsque la sonde n'est pas liée au calcium. Cette valeur du β est comprise entre 13 et 25 pour le *Fura-2 AM* (Takahashi et al., 1999).

Cependant, l'utilisation de ce type de sonde présente deux inconvénients. Premièrement, la mesure de la fluorescence nécessite la présence de trois filtres distincts sur le fluorimètre, deux pour l'excitation du fluorophore et un pour la mesure du signal fluorescent. Deuxièmement, le *Fura-2* nécessite l'utilisation de longueurs d'onde d'excitation se situant dans les UVs ce qui peut endommager les cellules.

III.2.8.2. Détermination du nombre de cellules

Pour rappel, une variation suffisante des ratios des signaux fluorescents ($R_{stimulé}/R_{basal}$) est indispensable dans l'étude de l'effet des drogues sur la mobilisation du

calcium intracellulaire. Diverses concentrations en cellules ont été testées : $1,5 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^5$, $7,5 \cdot 10^5$ et $10 \cdot 10^6$ cellules par ml. Lors de ce premier test, les concentrations en *Fura-2 AM* [$5 \mu\text{M}$]_F et en U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F utilisées sont basées sur des valeurs trouvées dans la littérature (*Xie et al., 1998 ; Patel et al., 2005*).

Comme avec les cellules HEK 293 TP β , quelque soit le ratio du paramètre de fluorescence mesurée (R_{max} , R_{basal} , $R_{\text{stimulé}}$) nous pouvons constater que la relation entre le nombre de cellules et l'intensité de la fluorescence est proportionnelle (**Figure III.29**). Nous avons ainsi choisi de travailler avec une concentration de $5 \cdot 10^5$ cellules par millilitres. En effet, cette condition présente une excellente variation du signal fluorescent. De plus, dans ces conditions deux boîtes de cellules à confluence permettent de remplir aisément une plaque 96 puits.

III.2.8.3. Détermination de la concentration en *Fura-2 AM*

Le *Fura-2 AM* est une sonde ratiométrique. Pour rappel, ces sondes permettent de quantifier la concentration en calcium libérée suite à la liaison d'un ligand à un récepteur lié à une protéine indépendamment de la concentration en sonde, de l'intensité de l'excitation, du *leakage* et du *photobleaching* de la sonde (*Nuccitelli et al., 1994 ; Takahashi et al., 1999*). Ainsi la concentration en *Fura-2 AM* n'influençant pas le ratio, l'optimisation de ce paramètre ne s'est pas avérée nécessaire. Une recherche bibliographique a permis de déterminer qu'une concentration en *Fura-2 AM* de $5 \mu\text{M}$ est la plus couramment utilisée (*Xie et al., 1998 ; Patel et al., 2005*).

III.2.8.4. Calibration *in situ* des cellules HVSMC

Pour rappel, la quantification de la concentration intracellulaire en calcium à partir du signal fluorescent pour une sonde ratiométrique s'effectue en tenant compte du K_d défini comme la concentration à laquelle 50 % de l'indicateur est lié au calcium :

$$[\text{Ca}^{++}] = K_d \times \left[\frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \right] \times \beta$$

La calibration du *Fura-2 AM* dans les cellules HVSMC a été réalisée de la même manière que la calibration du *Fluo-4 AM* chez les HEK 293 (voir point III.2.3.4.). Ainsi, la valeur du K_d mesurée est de $358,10 \text{ nM}$ (**Figure III.30**). La valeur du β calculée, correspondant au ratio des ratios de fluorescence lorsque la sonde est complètement saturée et lorsque la sonde n'est pas liée au calcium, est égale à 20.

III.2.8.5. Détermination du temps de mesure après la stimulation aux agonistes

Comme pour les autres types cellulaires, le temps nécessaire pour que la mobilisation du calcium soit maximale est un paramètre important à déterminer. Pour cela, une stimulation au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F d'une suspension cellulaire à $5 \cdot 10^5$ cellules par ml nous a permis d'établir une cinétique de cette mobilisation (**Figure III.31**). Ainsi, le pic de stimulation correspondant à la concentration en calcium maximale libérée après stimulation au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F ($R_{\text{stimulé}}$) est atteint 22 secondes après la stimulation.

Une cinétique de mobilisation du calcium intracellulaire suite à une stimulation des HVSMC au 8-iso-PGF_{2α} a également été réalisée. Ainsi, le pic de libération des ions calcium est atteint après 27 secondes après la stimulation.

III.2.8.6. Détermination de la concentration en agoniste à utiliser

La concentration en agoniste utilisée est le dernier paramètre à optimiser afin d'obtenir une variation des ratios de l'intensité du signal fluorescent (F_{stim}/F_{basal}) suffisante permettant de détecter un éventuel effet antagoniste des drogues étudiées. Comme pour les HEK 293 TPβ, l'optimisation de ce paramètre a été réalisée grâce à l'élaboration de courbes doses-réponses au U-46619 et au 8-iso-PGF_{2α}. Ainsi, notre protocole adapté aux HVSMC a permis la mise en évidence d'une mobilisation dose-dépendante du calcium intracellulaire (*Figure III.32*).

Le tracé obtenu est celui d'une sigmoïde où les concentrations en agonistes les plus faibles sont incapables d'induire une mobilisation du calcium. Ce n'est qu'à partir d'une certaine concentration qu'une libération de calcium des réserves cellulaires est observée. Les concentrations suivantes entraînent une augmentation de la concentration en calcium mobilisée. Enfin, une stimulation aux concentrations les plus élevées n'entraîne pas d'augmentation de la concentration en calcium libérée.

L' EC'_{50} , défini comme la concentration en drogues nécessaire afin d'inhiber 50% de la mobilisation de calcium intracellulaire maximale, est de 0,61 μM (IC_{95} : 0,32-1,16 μM) pour le U-46619 et de 11,38 μM (IC_{95} : 0,89-144,40 μM) pour le 8-iso-PGF_{2α}. Un déplacement de la courbe au 8-iso-PGF_{2α} vers les plus hautes concentrations par rapport à la courbe au U-46619 a donc été observé indiquant un pouvoir agoniste du 8-iso-PGF_{2α} plus faible que celui du U-46619. Enfin, nous pouvons constater, sur les deux courbes, que nous atteignons une phase plateau aux plus hautes concentrations signifiant que l'effet maximal est atteint. Nous avons choisi comme concentration optimale en agoniste la première concentration atteignant la phase plateau soit 1 μM pour le U-46619, valeur confirmée par les données de la littérature (*Miki et al., 1992*) et 100 μM pour le 8-iso-PGF_{2α}.

III.2.8.7. Effet des drogues sur la libération de calcium intracellulaire dans les cellules HVSMC

L'activité des différents antagonistes suite à une stimulation des cellules HVSMC par le U-46619 [1 μM]_F ou par le 8-iso-PGF_{2α} [100 μM]_F a été étudiée. Comme pour les cellules HEK 293, les cellules HVSMC ont été incubées durant 5 minutes en présence de différentes concentrations en antagoniste avant la stimulation. Pour chaque drogue, une courbe d'inhibition de la mobilisation du calcium a été établie et l' IC_{50} , soit la concentration en antagoniste à laquelle 50% de la mobilisation du calcium intracellulaire est inhibée, a été déterminée.

Le SQ-29548 et le BM-520 inhibent cette mobilisation du calcium induite après une stimulation des cellules par le U-46619 [1 μM]_F à de faibles concentrations et cet effet se renforce au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en drogue utilisé jusqu'à atteindre une inhibition totale. Cependant, les effets du picotamide et du naftidrofuryl ne commencent à se voir qu'à de fortes concentrations si bien que la courbe d'inhibition n'est pas totalement établie (*Figure III.33*). Les IC_{50} mesurés pour

les différentes drogues lors d'une stimulation par le U-46619 [1 μM]_F sont reportés au niveau du **Tableau III.4**.

La mobilisation du calcium intracellulaire induite par le 8-iso-PGF_{2 α} [100 μM]_F est également inhibée de manière dose-dépendante en présence des différentes drogues (**Figure III.34**). Les IC₅₀ des drogues suite à cette stimulation par le 8-iso-PGF_{2 α} sont reportées au niveau du **Tableau III.4**.

Un classement de ces molécules peut donc être établi sur base du pouvoir à inhiber la libération du calcium des réserves chez les HVSMC : SQ-29548 > BM-520 > naftidrofuryl > picotamide. Ainsi, le picotamide et le naftidrofuryl apparaissent comme de faibles antagonistes du récepteur TP présent chez les HVSMC stimulées par le U-46619 [1 μM]_F ou par le 8-iso-PGF_{2 α} [100 μM]_F par comparaison aux antagonistes forts et spécifiques comme le SQ-29548 et le BM-520.

IV. Discussion

Selon les derniers rapports de l'OMS, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de près de 30% des décès dans le monde. Parmi ces pathologies, les maladies cardiovasculaires à l'origine d'une ischémie comme la thrombose et la claudication intermittente constituent une part importante. Celles-ci sont caractérisées par un phénomène de vasoconstriction consécutif à une augmentation de la concentration plasmatique de divers médiateurs comme le TXA₂ (Krötz *et al.*, 2008; Meru *et al.*, 2005 ; Dogné *et al.*, 2005), le 8-iso-PGF_{2α} (Meru *et al.*, 2005 ; Loscalzo *et Schafer*, 2003) et le 5-HT (Meru *et al.*, 2005 ; Yoshimi *et al.*, 2001).

L'acide acétylsalicylique utilisé à faible dose dans la prévention des maladies cardiovasculaires est responsable d'une inhibition de la COX constitutive plaquettaire (COX-1) et d'une suppression de la synthèse de TXA₂ responsable de l'agrégation plaquettaire et d'une contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (Grosser *et al.*, 2006). Cet effet d'anti-agrégation plaquettaire est par conséquent bénéfique dans les pathologies cardiovasculaires impliquant des risques thrombotiques. Ainsi, divers travaux ont montré que la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire peuvent être médiées par le TXA₂ et les isoprostanes, en particulier le 8-iso-PGF_{2α}. Cette activation de l'agrégation plaquettaire est directement responsable de l'augmentation du risque thrombose (Hennan *et al.*, 2001).

Les isoprostanes exercent leurs activités sur les plaquettes et le tonus vasculaire via le récepteur TP, notamment lors du processus d'athérogenèse et de lésions vasculaires survenant après une ischémie-reperfusion (Audoly *et al.*, 2000). Le TXA₂ est impliqué dans l'hypertrophie cardiaque, le développement d'une hypertension et participe au développement de l'athérosclérose (Francois *et al.*, 2005 ; Worth *et al.*, 2005).

Le TXA₂, le 8-iso-PGF_{2α} et le 5-HT agissent sur des récepteurs spécifiques : le récepteur TP pour le TXA₂ (Billington *et al.*, 2003) et le 8-iso-PGF_{2α} (Kumar *et al.*, 2005) et le récepteur 5-HT_{2A} pour le 5-HT (Nagatomo *et al.*, 2004). La liaison de ces médiateurs chimiques à leur récepteur est responsable d'une mobilisation du calcium intracellulaire à l'origine de diverses réponses biologiques comme la contraction des cellules musculaires lisses responsable de la vasomotricité (Billington *et al.*, 2003 ; Nagatomo *et al.*, 2004).

Par conséquent, l'étude et le développement de molécules agissant comme antagonistes au niveau de ces deux récepteurs constituent donc un enjeu pharmacologique et thérapeutique important. Ainsi, le picotamide (Plactidil[®]), antagoniste du récepteur TP et un inhibiteur de la thromboxane synthétase (Hanson *et al.*, 2005), est utilisé dans la prévention de la thrombose artérielle (Dogné *et al.*, 2005 ; Gresele *et al.*, 1989, 1990). Le naftidrofuryl (Praxilène[®]), un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, est quant à lui utilisé depuis plus de 30 dans le traitement de la claudication intermittente en Europe (Barradell & Brodgen, 1996).

En 1988, Verheggen et Schör ont montré que le naftidrofuryl était également capable d'agir sur la contraction de vaisseaux sanguins induite par le U-46619, un agoniste stable du TXA₂ (Verheggen et Schör, 1988). En outre, cet agent est également capable de prévenir une agrégation plaquettaire à l'origine d'un thrombus mais

également d'empêcher l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire (*Barradell & Brodgen, 1996*). Le naftidrofuryl est une molécule préconisée dans le traitement de pathologies apparentées à une ischémie liée à une vasoconstriction provoquée par le 5-HT mais également par le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α}. Toutefois, ses effets au niveau du récepteur TP n'ont été que très peu étudiés. La caractérisation pharmacologique *ex vivo* et *in vitro* du naftidrofuryl vis-à-vis du récepteur TP se révèle intéressante tant d'un point de vue fondamental que d'un point de vue thérapeutique.

Le caractère antagoniste vis-à-vis du récepteur TP du naftidrofuryl, décrit par *Verheggen et Schör*, a été confirmé dans des expériences *ex vivo* sur des préparations aortiques de rats. Les expériences développées dans le cadre de ce travail montrent que le naftidrofuryl, pré-incubé 5 minutes avec l'aorte, à une concentration de 50 μM est capable de prévenir une contraction induite par le TXA₂, le 8-iso-PGF_{2α} et le 5-HT. Cependant, si nous comparons cette activité avec d'autres antagonistes des récepteurs TP de référence tels le SQ-29548 et le BM-520, nous observons que le naftidrofuryl est nettement moins actif. Par ailleurs, nous avons montré que le naftidrofuryl était un antagoniste plus puissant que le picotamide, un composé agissant à la fois comme un inhibiteur de la thromboxane synthétase et un antagoniste du récepteur TP.

Comme il l'a été mentionné précédemment, l'existence de différents diastéréoisomères d'un composé peut présenter un intérêt pharmaceutique important. De nombreux exemples ont été décrits montrant l'efficacité supérieure de certains isomères optiques ou certains diastéréoisomères (*Patil et Kothekar, 2006*). La présence de deux carbones asymétriques au niveau de la structure chimique du naftidrofuryl permet l'existence de quatre diastéréoisomères. Afin de déterminer si un ou plusieurs de ces isomères se révélaient plus actifs, la relaxation d'une aorte pré-contractée au 5-HT par les différents diastéréoisomères a été réalisée. Il ressort de ces expériences qu'aucun de ces diastéréoisomères ne semblent plus actifs que les autres lors de la relaxation. L'utilisation d'un mélange non spécifié des différents isomères a dès lors été maintenue.

Il est désormais bien établi que le récepteur TP est couplé à une protéine G de type α_{q/11}. Ce type de protéine G induit une génération d'IP₃ responsable d'une libération des ions calcium des réserves cellulaires (réticulum endoplasmique) vers le cytoplasme. Ainsi, la liaison d'un ligand, comme le TXA₂ ou d'un agoniste synthétique comme le U-46619 au récepteur TP entraîne l'activation de celui-ci permettant l'échange d'un GDP contre un GTP par la sous-unité α de la protéine G et, par la suite, une mobilisation du calcium intracellulaire (*Billington et al., 2003*).

Le caractère antagoniste du naftidrofuryl a été aussi confirmé dans ce travail sur des cellules surexprimant une des isoformes du récepteur TP (HEK 293 TPα et HEK 293 TPβ) et sur des cellules issues de la musculature lisse d'aorte (HVSMC). Ainsi, ce composé est capable d'inhiber une mobilisation de calcium induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}. Cependant, l'activité antagoniste demeure relativement faible en comparaison à celles d'antagonistes de référence comme le SQ-29548 et le BM-520. Soulignons aussi que le naftidrofuryl est contre toute attente plus puissant que le picotamide,

Ces deux expériences montrent donc que le naftidrofuryl module l'activité du TXA₂ et du 8-iso-PGF_{2α} en agissant vraisemblablement via le récepteur TP. En effet, ce composé prévient une vasoconstriction induite après stimulation par des agonistes

spécifique du récepteur TP. De même, une incubation des HVSMC et des HEK 293 TP α et TP β avec le naftidrofuryl se traduit par une inhibition de la mobilisation du calcium intracellulaire induite par ces mêmes agonistes.

Deux mécanismes moléculaires différents peuvent expliquer ce caractère antagoniste. Le naftidrofuryl peut agir de manière compétitive en se fixant au niveau du même site de liaison que celui de l'agoniste empêchant ainsi l'accès de ce dernier à son site de liaison. Le naftidrofuryl peut également se fixer au niveau d'un site de liaison différent de celui de l'agoniste provoquant une distorsion allostérique de ce site réduisant ainsi le nombre de molécules d'agonistes pouvant venir se lier au récepteur. Bien qu'il soit impossible à déterminer le site liaison du naftidrofuryl au niveau du récepteur TP, cette molécule semble agir de manière réversible. Ainsi, la liaison du naftidrofuryl au récepteur TP, au même site de liaison que les agonistes ou à un site différent, limite l'accès du site de liaison du U-46619 et du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Cette diminution d'activation du récepteur se traduit logiquement par une libération des ions calcium du réticulum endoplasmique moins importante avec pour conséquence un phénomène de vasoconstriction moindre (Page et al., 1999). Des études de *binding* avec un produit radiomarqué (ex. [3 H]SQ-29548) permettraient d'étudier plus en détail l'affinité de nos molécules pour le récepteur TP. Néanmoins, ce type d'étude ne renseigne pas du caractère antagoniste ou agoniste potentiel des drogues évaluées.

La faible activité pharmacologique *in vitro* du picotamide fût pour la première fois rapportée par Gresele en 1989. Son équipe démontra que les effets du picotamide sur l'agrégation plaquettaire et sur la métabolisation de l'acide arachidonique ne sont détectés qu'à de hautes concentrations (Gresele et al., 1989, 1990). Nos expériences nous permettent de confirmer que ce composé possède une très faible activité antagoniste vis-à-vis du récepteur TP aussi bien sur musculatures lisses vasculaires isolées que sur les cellules dans les mesures de mobilisation de calcium. Cependant, le picotamide a démontré son efficacité dans divers modèles animaux de thrombose lorsqu'il était administré par voie orale. Cette activité s'explique par un effet plus marqué d'inhibition de la thromboxane synthétase et par conséquent de la synthèse de TXA $_2$ (Gresele et al., 1989, 1990). Le picotamide est dès lors plus proche pharmacologiquement de l'acide acétylsalicylique utilisé à faible dose pour inhiber la COX-1 plaquettaire et prévenir la production de TXA $_2$. Un des inconvénients de ce mécanisme d'inhibition direct (thromboxane synthétase) ou indirecte (cyclooxygénase-1) de la production de TXA $_2$ est que les récepteurs TP peuvent toujours être activés par les isoprostanes générés également dans le cadre d'un stress oxydatif rencontré dans l'athérosclérose ou la claudication intermittente (Dogné et al. 2005). Par conséquent, l'utilisation d'antagonistes puissants du récepteur TP s'avère particulièrement intéressante. Ainsi, le BM-520, molécule originale synthétisée par le professeur Jean-Michel Dogné, a démontré un comportement antagoniste vis-à-vis du récepteur TP en relâchant une aorte de rat pré-contractée par le U-46619 et par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ (Rolin et al., 2007). Nos résultats montrent également que le BM-520 est également capable de prévenir une vasoconstriction induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ en inhibant la libération des ions calcium du réticulum endoplasmique résultant de l'activation du récepteur TP. De plus, nos résultats montrent que ce composé n'est pas capable de prévenir une contraction aortique induite par le 5-HT démontrant que le BM-520 semble être spécifique au récepteur TP. Nos résultats suggèrent qu'à concentrations identiques le BM-520 exerce des effets antagonistes plus faibles que le SQ-29548 suggérant une activité moins importante que celle du SQ-29548. De même, nos observations montrent

que la concentration en BM-520 nécessaire permettant de prévenir une contraction induite par le U-46619 ou le 8-iso-PGF_{2α} est plus importante que celle du SQ-29548. De plus, les valeurs d'IC₅₀ obtenues, définies comme la concentration nécessaire afin d'inhiber 50% de la mobilisation du calcium intracellulaire suite à une stimulation par un agoniste du récepteur TP, lors des expériences de mobilisation de calcium sont plus importantes pour le BM-520 que pour le SQ-29548. Ces résultats confirment donc les observations faites par *Rolin et al.* suggérant que le BM-520 possède un pouvoir antagoniste plus faible que celui du SQ-29548 (*Rolin et al., 2007*). Néanmoins, nos travaux montrent aussi que le BM-520 s'avère plus puissant que le picotamide et le naftidrofuryl.

D'un point de vue plus fondamental, le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α} produisent une vasoconstriction et une mobilisation du calcium intracellulaire maximales équivalentes indiquant des niveaux comparables en terme d'efficacité. Cependant, la puissance (pouvoir agoniste vis-à-vis du récepteur TP) est plus faible pour le 8-iso-PGF_{2α}. En effet, la concentration nécessaire pour induire une contraction aortique maximale et/ou une mobilisation du calcium intracellulaire maximale est beaucoup plus élevée pour le 8-iso-PGF_{2α}. Cette différence d'activité pourrait s'expliquer par l'existence d'un récepteur spécifique aux isoprostanes. Ainsi, *Fukunaga et al.* suggèrent l'existence de récepteurs aux isoprostanes présentant des similarités de structure avec le récepteur TP (*Fukunaga et al., 1993, 1997*). Cette hypothèse est malheureusement impossible à confirmer dans le cadre de nos travaux car aucun antagonistes inhibant spécifiquement l'activité des isoprostanes n'existent actuellement (*Sametz et al., 2000*). Cependant, nos résultats suggèrent qu'une prévention d'une contraction aortique, induite par le 8-iso-PGF_{2α}, peut être obtenue après l'ajout d'antagonistes spécifiques du récepteur TP comme le BM-520 et le SQ-29548. De même, l'utilisation de ces mêmes antagonistes permet la relaxation d'une aorte pré-contractée de rat (*Rolin et al., 2001, 2007*). Prises dans leur ensemble, ces données supportent l'hypothèse que le 8-iso-PGF_{2α} et le U-46619 agissent via le récepteur TP.

De plus, les résultats obtenus lors de l'inhibition de la libération du calcium intracellulaire montrent également que l'utilisation du SQ-29548 ou du BM-520 sur les cellules HEK 293 TP α et TP β , cellules surexprimant l'une ou l'autre isoforme, inhibe une mobilisation du calcium induite après activation des récepteurs TP par le 8-iso-PGF_{2α}. *Kinsella* observa les mêmes effets après utilisation du SQ-29548 chez les HEK 293 TP α stimulée au 8-iso-PGF_{2α} démontrant également que le 8-iso-PGF_{2α} est capable d'agir via le récepteur TP (*Kinsella et al., 1997*). Cependant, bien que le 8-iso-PGF_{2α} peut activer le récepteur TP, il reste un ligand considérablement moins puissant que le U-46619.

En conclusion, si nos résultats ne nous permettent pas de nous prononcer quant à l'existence d'un récepteur spécifique aux isoprostanes, ils appuient l'hypothèse selon laquelle il existerait des interactions entre le récepteur TP et le 8-iso-PGF_{2α}.

V. Conclusion et perspectives

Le naftidrofuryl est un antagoniste des récepteurs 5-HT₂ commercialisé depuis plus de 30 ans comme agent thérapeutique chez des patients atteints de claudication intermittente. En 1988, *Verheggen et Schör* ont montré que ce composé avait également un effet sur la vasoconstriction induite par le TXA₂, phénomène jouant un rôle important dans des pathologies telles que la thrombose et la claudication intermittente. Au cours de ce travail, nous avons évalué en détail cette activité pharmacologique par diverses expériences *ex vivo* et *in vitro* sur les récepteurs TP présents sur la musculature lisse vasculaire et sur les plaquettes.

La liaison du 5-HT au récepteur 5-HT_{2A} est responsable d'une vasoconstriction. Ce phénomène peut être inhibé en présence d'un antagoniste du récepteur 5-HT_{2A} comme le naftidrofuryl (*Verheggen et Schör*, 1993). Nos résultats ont également montré qu'une incubation de 5 minutes d'une aorte de rat en présence de naftidrofuryl permet de prévenir ce phénomène là où un antagoniste du récepteur TP comme le picotamide se révèle inefficace.

Le TXA₂ agissant via le récepteur TP induit également la vasoconstriction. L'identification de composés présentant un caractère antagoniste vis-à-vis du récepteur TP s'avère dès lors intéressant. Ainsi, le naftidrofuryl confirme son caractère antagoniste par sa capacité à prévenir une vasoconstriction induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}. Cependant, cet effet est relativement faible comparé au SQ-29548 et BM-520, deux antagonistes puissants et spécifiques du récepteur TP.

La mise au point d'un protocole permettant d'étudier la mobilisation du calcium intracellulaire résultant de l'activation du récepteur TP nous a permis également de démontrer que le naftidrofuryl est capable d'agir à la fois sur l'isoforme α et l'isoforme β du récepteur TP, surexprimée de manière stable et constitutive chez des HEK 293. Ce composé est également capable d'inhiber une mobilisation du calcium intracellulaire induite après stimulation des cellules par le U-46619 et au 8-iso-PGF_{2α}. Cette affinité et cette inhibition restent malgré tout relativement faibles en comparaison au SQ-29548 et au BM-520. Nous pouvons également conclure de ces expériences que ces composés ne présentent pas de sélectivité vis-à-vis de l'une ou l'autre isoforme. L'inhibition de la mobilisation de calcium intracellulaire chez les HVSMC, cellules issues de la musculature lisse d'aorte humaine, a également été étudiée et a montré que le naftidrofuryl était également capable d'inhiber cette libération de calcium induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}. L'effet du naftidrofuryl reste relativement modéré en comparaison aux du SQ-29548 et du BM-520.

Le naftidrofuryl prévient donc la vasoconstriction en se liant à la fois au niveau des récepteurs TP et des récepteur 5-HT_{2A}. Cette diminution d'activation du récepteur est à son tour responsable d'une diminution de la génération d'IP₃ et donc d'une diminution de la libération des ions calcium du réticulum endoplasmique avec pour conséquence un phénomène de vasoconstriction moindre.

Le naftidrofuryl possédant deux carbones asymétriques, l'activité pharmacologique des quatre diastéréoisomères séparés était intéressante à étudier. Dans le modèle de relaxation d'aorte pré-contractées au 5-HT nous avons établi que ces diastéréoisomères possédaient une activité myorelâchante semblable.

En outre, ce travail a également permis de confirmer le caractère antagoniste du BM-520 mis en évidence par *Rolin et al.*, en montrant que cette molécule est également capable de prévenir une vasoconstriction induite par le U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α} et d'inhiber une mobilisation du calcium intracellulaire induite par ces mêmes agonistes. Cependant, le BM-520 se révèle inefficace lorsqu'il s'agit de relâcher une aorte pré-contractée par le 5-HT ce qui témoigne de sa sélectivité vis-à-vis du récepteur TP.

Enfin, notre travail ne permet pas de nous prononcer quant à l'existence d'un hypothétique récepteur spécifique aux isoprostanes proposée par *Fukunaga et al.*. Nos résultats appuient néanmoins l'hypothèse selon laquelle il existerait des interactions entre le récepteur TP et le 8-iso-PGF_{2α}. Ainsi, nous avons démontré que le 8-iso-PGF_{2α} présente une affinité pour les deux isoformes du récepteur TP en induisant une mobilisation du calcium intracellulaire. De plus, une incubation en présence d'antagonistes spécifiques du récepteur TP permet à la fois de prévenir une vasoconstriction et une mobilisation du calcium intracellulaire induite par le 8-iso-PGF_{2α}.

D'autres études seraient intéressantes à mener sur base des résultats obtenus lors de ce travail. Ainsi, le TXA₂ étant un inducteur de l'agrégation plaquettaire, le naftidrofuryl pourrait également inhiber une agrégation plaquettaire induite par le U-46619 et/ou le 8-iso-PGF_{2α}. Cet effet pourrait être étudié lors d'expériences d'agrégation plaquettaire sur plasma riche en plaquettes d'origine humaine.

Nous avons démontré que le naftidrofuryl constituait un antagoniste potentiel du récepteur TP *in vitro*. Cette molécule pourrait donc être évaluée dans divers modèles *in vivo* de pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose chez la souris APO E^{-/-} ou LDLR^{-/-} et la thrombose artérielle.

Afin de caractériser au mieux le mécanisme responsable du comportement antagoniste du naftidrofuryl, des expériences de modélisation permettraient de déterminer si ce composé se lie au récepteur TP via le même site de liaison que le TXA₂. En outre, des études de *binding* permettraient de déterminer l'affinité du naftidrofuryl pour ce récepteur.

VI. Bibliographie

Arnould, T., C. Michiels, et al. (1992). "Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells." *J Cell Physiol* 152(1): 215-21.

Audoly, L. P., B. Rocca, et al. (2000). "Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2 α)-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo." *Circulation* 101(24): 2833-40.

Barradell, L. B. and R. N. Brogden (1996). "Oral naftidrofuryl. A review of its pharmacology and therapeutic use in the management of peripheral occlusive arterial disease." *Drugs Aging* 8(4): 299-322.

Belhassen, L., G. Pelle, et al. (2003). "Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin." *J Am Coll Cardiol* 41(7): 1198-204.

Bergstroem S., Danielsson H., Samuelsson B. (1964). "The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid prostaglandins and related factor 32." *Biochim Biophys Acta* 15; 90:207-10

Billington, C. K. and R. B. Penn (2003). "Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle." *Respir Res* 4: 2.

Buccellati, C., A. Sala, et al. (2006). "Pharmacological characterization of 2NTX-99 [4-methoxy-N1-(4-trans-nitrooxycyclohexyl)-N3-(3-pyridinylmethyl)-1,3-benzenedicarboxamide], a potential antiatherothrombotic agent with antithromboxane and nitric oxide donor activity in platelet and vascular preparations." *J Pharmacol Exp Ther* 317(2): 830-7.

Carty, E., D. S. Rampton, et al. (2001). "Lack of efficacy of ridogrel, a thromboxane synthase inhibitor, in a placebo-controlled, double-blind, multi-centre clinical trial in active Crohn's disease." *Aliment Pharmacol Ther* 15(9): 1323-9.

Catella, F., D. Healy, et al. (1986). "11-Dehydrothromboxane B2: a quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(16): 5861-5.

Champier, J., B. Claustrat, et al. (1997). "Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxyindol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets." *Life Sci* 60(24): 2191-7.

Cheng, Y., S. C. Austin, et al. (2002). "Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2." *Science* 296(5567): 539-41.

Chiabrando, C., L. Rivoltella, et al. (1993). "Urinary excretion and origin of 11-dehydro-2,3-dinor-thromboxane B2 in man." *Prostaglandins* 45(5): 401-11.

- Cipollone, F., P. Patrignani, et al. (1997). "Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina." *Circulation* 96(4): 1109-16.
- Clark, C. T., H. Weissbach, et al. (1954). "5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties." *J Biol Chem* 210(1): 139-48.
- Cracowski, J. L., P. Devillier, et al. (2001). "Vascular biology of the isoprostanes." *J Vasc Res* 38(2): 93-103.
- Cracowski, J. L., O. Berdeaux, et al. (2005). "[Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 3: Biomarkers and mediators in vascular physiology and disease]." *Pathol Biol (Paris)* 53(6): 364-8.
- de Chaffoy de Courcelles, D., P. Roevens, et al. (1987). "Serotonin-induced alterations in inositol phospholipid metabolism in human platelets." *Biochim Biophys Acta* 927(2): 291-302.
- Di Virgilio F, Steinberg TH, Silverstein SC (1990). "Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers." *Cell Calcium* 11 (2-3): 57-62.
- Dogne, J. M., X. de Leval, et al. (2000). "New trends in thromboxane and prostacyclin modulators." *Curr Med Chem* 7(6): 609-28.
- Dogne, J. M., J. Hanson, et al. (2004). "New developments on thromboxane modulators." *Mini Rev Med Chem* 4(6): 649-57.
- Dogne, J. M., J. Hanson, et al. (2005). "Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis." *Trends Pharmacol Sci* 26(12): 639-44.
- Du, W. M., C. Y. Miao, et al. (2003). "Effects of long-term treatment with ketanserin on blood pressure variability and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol* 41(2): 233-9.
- Fam, S. S. and J. D. Morrow (2003). "The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review." *Curr Med Chem* 10(17): 1723-40.
- Fike, C. D., Y. Zhang, et al. (2005). "Thromboxane inhibition reduces an early stage of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in piglets." *J Appl Physiol* 99(2): 670-6.
- Francois, H., K. Athirakul, et al. (2005). "Prostacyclin protects against elevated blood pressure and cardiac fibrosis." *Cell Metab* 2(3): 201-7.
- Fu, J. Y., J. L. Masferrer, et al. (1990). "The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes." *J Biol Chem* 265(28): 16737-40.
- Fukunaga, M., N. Makita, et al. (1993). "Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): C1619-24.

Fukunaga, M., T. Yura, et al. (1997). "Evidence for the distinct nature of F2-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂." *Am J Physiol* 272(4 Pt 2): F477-83.

Gee, K. R., K. A. Brown, et al. (2000). "Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes." *Cell Calcium* 27(2): 97-106.

Gilchrist, M. A., 2nd, A. Cacace, et al. (2008). "Characterization of the 5-HT_{2b} receptor in evaluation of aequorin detection of calcium mobilization for miniaturized GPCR high-throughput screening." *J Biomol Screen* 13(6): 486-93.

Gong, H., T. Nakamura, et al. (2000). "A novel 5-HT(2) antagonist, sarpogrelate hydrochloride, shows inhibitory effects on both contraction and relaxation mediated by 5-HT receptor subtypes in porcine coronary arteries." *Pharmacology* 61(4): 263-8.

Gresele, P., H. Deckmyn, et al. (1984). "BM 13.177, a selective blocker of platelet and vessel wall thromboxane receptors, is active in man." *Lancet* 1(8384): 991-4.

Gresele, P., H. Deckmyn, et al. (1989). "Characterization of N,N'-bis(3-picolyl)-4-methoxyisophtalamide (picotamide) as a dual thromboxane synthase inhibitor/thromboxane A₂ receptor antagonist in human platelets." *Thromb Haemost* 61(3): 479-84.

Gresele, P., C. Corona, et al. (1990). "Picotamide protects mice from death in a pulmonary embolism model by a mechanism independent from thromboxane suppression." *Thromb Haemost* 64(1): 80-6.

Grosser, T., S. Fries, et al. (2006). "Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities." *J Clin Invest* 116(1): 4-15.

Guignet (2006). Dynamics of the 5-ht_{3a} serotonin receptor in living cells.

Hanson, J., S. Rolin, et al. (2005). "In vitro and in vivo pharmacological characterization of BM-613 [N-n-pentyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea], a novel dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist." *J Pharmacol Exp Ther* 313(1): 293-301.

Hanson, J. (2007). Design, synthesis and pharmacological evaluation of original nitrobenzenesulfonylureas and sulfonylcyanoguanidines as thromboxane A₂ receptor antagonists. Laboratoire de chimie pharmaceutique. Liège, ULG.

Hardisty, R. M. and R. S. Stacey (1955). "5-Hydroxytryptamine in normal human platelets." *J Physiol* 130(3): 711-20.

Harris, R. C., J. A. McKanna, et al. (1994). "Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction." *J Clin Invest* 94(6): 2504-10.

Haugland (2002). Handbook of fluorescent probes and research products.

Haurand, M. and V. Ullrich (1985). "Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a cytochrome P-450 enzyme." *J Biol Chem* 260(28): 15059-67.

- Hennan, J. K., J. Huang, et al. (2001). "Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries." *Circulation* 104(7): 820-5.
- Hoyer, D., J. P. Hannon, et al. (2002). "Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors." *Pharmacol Biochem Behav* 71(4): 533-54.
- Huang, J. S., S. K. Ramamurthy, et al. (2004). "Cell signalling through thromboxane A2 receptors." *Cell Signal* 16(5): 521-33.
- Hwang, D., D. Scollard, et al. (1998). "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 90(6): 455-60.
- Ikeda, K., K. Tojo, et al. (2000). "The effects of sarpogrelate on cardiomyocyte hypertrophy." *Life Sci* 67(24): 2991-6.
- Janssen, P., J. Tack, et al. (2004). "Influence of 5-HT1 receptor agonists on feline stomach relaxation." *Eur J Pharmacol* 492(2-3): 259-67.
- Kelley-Hickie, L. P. and B. T. Kinsella (2004). "EP1- and FP-mediated cross-desensitization of the alpha (alpha) and beta (beta) isoforms of the human thromboxane A2 receptor." *Br J Pharmacol* 142(1): 203-21.
- Kihara, H., H. Koganei, et al. (2001). "Antithrombotic activity of AT-1015, a potent 5-HT(2A) receptor antagonist, in rat arterial thrombosis model and its effect on bleeding time." *Eur J Pharmacol* 433(2-3): 157-62.
- Kim, K. S., T. C. Wessel, et al. (1991). "Molecular cloning and characterization of cDNA encoding tryptophan hydroxylase from rat central serotonergic neurons." *Brain Res Mol Brain Res* 9(4): 277-83.
- Kinsella, B. T., D. J. O'Mahony, et al. (1997). "The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha." *J Pharmacol Exp Ther* 281(2): 957-64.
- Krotz, F., H. Y. Sohn, et al. (2008). "Antiplatelet drugs in cardiological practice: established strategies and new developments." *Vasc Health Risk Manag* 4(3): 637-45.
- Kumar, A., E. Kingdon, et al. (2005). "The isoprostane 8-iso-PGF2alpha suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms." *Faseb J* 19(3): 443-5.
- Leitinger, N., J. Huber, et al. (2001). "The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation." *Faseb J* 15(7): 1254-6.
- Lin, K., W. Sadee, et al. (1999). "Rapid measurements of intracellular calcium using a fluorescence plate reader." *Biotechniques* 26(2): 318-22, 324-6.

- Loscalzo, J. (2003). "Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 5): 1059-61.
- Loscalzo, S. (2003). *Thrombosis and Hemorrhage*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Maloteaux, J. M., J. Haiech, et al. (1986). "Biochemical and physiological evidences for antiserotonergic properties of naftidrofuryl." *Arzneimittelforschung* 36(8): 1194-8.
- Meru, A. V., S. Mitra, et al. (2006). "Intermittent claudication: an overview." *Atherosclerosis* 187(2): 221-37.
- Miki I., Kase H., Ishii A. (1992). "Differences in activities of thromboxane A2 receptor antagonists in smooth muscle cells" *Eur J Pharmacol* 227(2): 199-204
- Miyata, A., C. Yokoyama, et al. (1994). "Characterization of the human gene (TBXAS1) encoding thromboxane synthase." *Eur J Biochem* 224(2): 273-9.
- Mohammad-Zadeh, L. F., L. Moses, et al. (2008). "Serotonin: a review." *J Vet Pharmacol Ther* 31(3): 187-99.
- Moore, F., G. Asboth, et al. (2002). "Thromboxane receptor signalling in human myometrial cells." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 67(1): 31-47.
- Nagatomo, T., M. Rashid, et al. (2004). "Functions of 5-HT2A receptor and its antagonists in the cardiovascular system." *Pharmacol Ther* 104(1): 59-81.
- Nakahata, N. (2008). "Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology." *Pharmacol Ther* 118(1): 18-35.
- Noble, M. I. and A. J. Drake-Holland (1990). "Evidence for a role of serotonin in initiation of coronary arterial thrombosis in dog and man." *Clin Physiol Biochem* 8 Suppl 3: 50-5.
- Noguchi, T., M. Nishino, et al. (1973). "Tryptophan 5-hydroxylase in rat intestine." *Biochem J* 131(2): 375-80.
- Nuccitelli et al. (1994). "A Practical Guide to the Study of Calcium in Living Cells" *Methods in Cell Biology* 40.
- O'Brien, J. R. (1964). "The Mechanism and Prevention of Platelet Adhesion and Aggregation Considered in Relation to Arterial Thrombosis." *Blood* 24: 309-14.
- Oliveira, L., N. A. Stallwood, et al. (2000). "Effects of some isoprostanes on the human umbilical artery in vitro." *Br J Pharmacol* 129(3): 509-14.
- Page, Curtis et al. (1999). "Pharmacologie intégrée.", Traduction française de "Integrated Pharmacology First Edition", De Boeck Université.

- Patel, M. K., G. F. Clunn, et al. (2005). "Effect of serum withdrawal on the contribution of L-type calcium channels (CaV1.2) to intracellular Ca²⁺ responses and chemotaxis in cultured human vascular smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* 145(6): 811-7.
- Patil, P. A. and M. A. Kothekar (2006). "Development of safer molecules through chirality." *Indian J Med Sci* 60(10): 427-37.
- Patrono, C. and G. A. FitzGerald (1997). "Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2309-15.
- Patrono, C. and B. Rocca (2007). "Drug insight: aspirin resistance--fact or fashion?" *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4(1): 42-50.
- Peroutka, S. J. and T. A. Howell (1994). "The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors." *Neuropharmacology* 33(3-4): 319-24.
- Pitré, C., Staerman, Piriou, Saïag (1998). "Endothelial dysfunction and therapeutic approaches applied to vasomotor regulation: recent innovations and future perspectives." *Sang Thrombose Vaisseaux* 10(1, 20-8).
- Rolin, S., J. M. Dogne, et al. (2001). "Activity of a novel dual thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65(2): 67-72.
- Rolin, S., J. Hanson, et al. (2007). "BM-520, an original TXA₂ modulator, inhibits the action of thromboxane A₂ and 8-iso-prostaglandin F₂α in vitro and in vivo on human and rodent platelets, and aortic vascular smooth muscles from rodents." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84(1-2): 14-23.
- Sametz, W., S. Hennerbichler, et al. (2000). "Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE₂ and 8-iso-PGF₂α, in some isolated smooth muscle preparations." *Br J Pharmacol* 130(8): 1903-10.
- Seibert, K., Y. Zhang, et al. (1994). "Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 12013-7.
- Sharma, S. K., P. Zahradka, et al. (1999). "Inhibition of serotonin-induced vascular smooth muscle cell proliferation by sarpogrelate." *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1475-81.
- Siess, W. (1989). "Molecular mechanisms of platelet activation." *Physiol Rev* 69(1): 58-178.
- Slominski, A., T. W. Fischer, et al. (2005). "On the role of melatonin in skin physiology and pathology." *Endocrine* 27(2): 137-48.
- Smith, W. L. (2008). "Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases." *Trends Biochem Sci* 33(1): 27-37.

- Takahashi, A., P. Camacho, et al. (1999). "Measurement of intracellular calcium." *Physiol Rev* 79(4): 1089-125.
- Tamir, H. and M. D. Gershon (1990). "Serotonin-storing secretory vesicles." *Ann N Y Acad Sci* 600: 53-66; discussion 67.
- Toh, C. C. (1954). "Release of 5-hydroxytryptamine (serotonin) from the dog's gastrointestinal tract." *J Physiol* 126(2): 248-54.
- Tong, J. H. and S. Kaufman (1975). "Tryptophan hydroxylase. Purification and some properties of the enzyme from rabbit hindbrain." *J Biol Chem* 250(11): 4152-8.
- Tournois, C., V. Mutel, et al. (1998). "Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism." *J Biol Chem* 273(28): 17498-503.
- Tsien, R. and T. Pozzan (1989). "Measurement of cytosolic free Ca²⁺ with quin2." *Methods Enzymol* 172: 230-62.
- Tyce, G. M. (1990). "Origin and metabolism of serotonin." *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 3: S1-7.
- Uchida, T., H. Kido, et al. (1992). "A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A₂-induced contraction in the isolated canine coronary artery." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45(2): 121-4.
- Verheggen, R. and K. Schror (1988). "The effect of naftidrofuryl on PGF₂ alpha, U 46.619, 5-HT and thromboxane A₂ (TXA₂) induced vasoconstriction." *Biomed Biochim Acta* 47(10-11): S264-7.
- Verheggen, R. and K. Schror (1993). "Effect of naftidrofuryl on platelet-induced vasospasm in vitro. Role of antiserotonergic actions." *Arzneimittelforschung* 43(3): 330-4.
- Watts, S. W. and J. M. Thompson (2004). "Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the renal artery of the normotensive rat." *J Pharmacol Exp Ther* 309(1): 165-72.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1999). "The discovery of serotonin and its role in neuroscience." *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl): 2S-8S.
- Wilson, R. J., G. M. Giblin, et al. (2006). "GW627368X ((N-{2-[4-(4,9-diethoxy-1-oxo-1,3-dihydro-2H-benzo[f]isoindol-2-yl)phenyl] acetyl} benzene sulphonamide): a novel, potent and selective prostanoid EP₄ receptor antagonist." *Br J Pharmacol* 148(3): 326-39.
- Worth, N. F., C. L. Berry, et al. (2005). "S18886, a selective TP receptor antagonist, inhibits development of atherosclerosis in rabbits." *Atherosclerosis* 183(1): 65-73.

Xie, L., G. F. Clunn, et al. (1998). "Role of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) and tyrosine phosphorylation in adhesion of cultured vascular smooth muscle cells to fibrinogen." *Cardiovasc Res* 39(2): 475-84.

Yamagata, K., K. I. Andreasson, et al. (1993). "Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids." *Neuron* 11(2): 371-86.

Yoshimi, Y., M. Fujimura, et al. (2001). "Effect of thromboxane A₂ (TXA₂) synthase inhibitor and TXA₂ receptor antagonist alone and in combination on antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 65(1): 1-9.

Zhang, R., M. L. Ogletree, et al. (1996). "Characterization of thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptors in aorta." *Eur J Pharmacol* 317(1): 91-6.

Zhang, L., H. Xiao, et al. (1997). "Genomic organization, chromosomal localization, and expression of the murine thromboxane synthase gene." *Genomics* 45(3): 519-28.

Zhang, X., J. M. Beaulieu, et al. (2006). "Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2." *Cell Mol Life Sci* 63(1): 6-11.

Zhang, M., Y. Dong, et al. (2008). "Thromboxane receptor activates the AMP-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells via hydrogen peroxide." *Circ Res* 102(3): 328-37.

Zill, P., A. Buttner, et al. (2007). "Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study." *J Psychiatr Res* 41(1-2): 168-73.

Zmijewski, J. W., D. R. Moellering, et al. (2005). "Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(2): H852-61.

I. Introduction

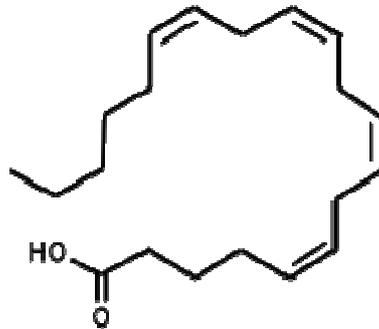


Figure I.1 : Structure chimique de l'acide arachidonique

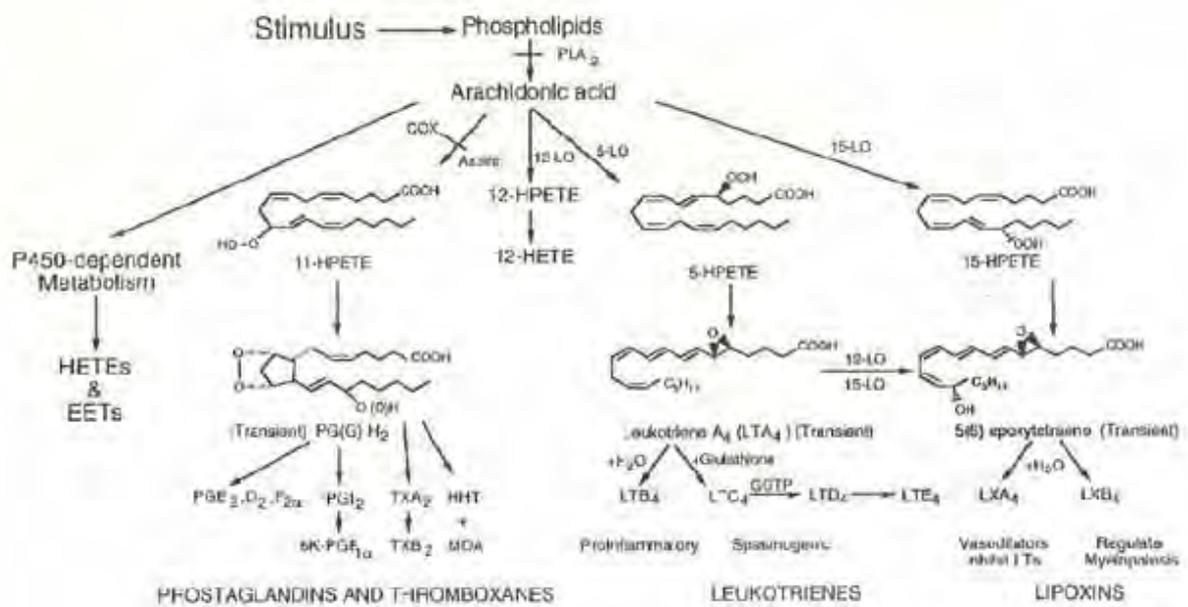


Figure I.2 : Cascade de l'acide arachidonique à l'origine des prostanoïdes, des leucotriènes et des époxydes

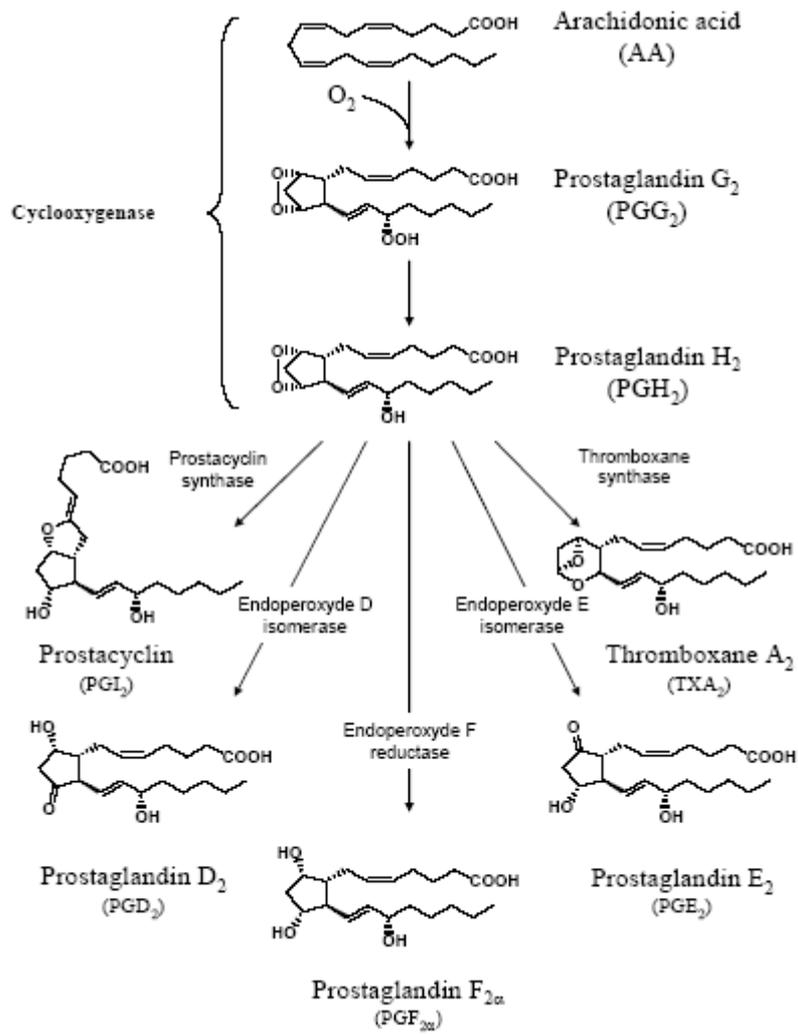


Figure I.3 : Voie des cyclooxygénases à l'origine des prostanoides

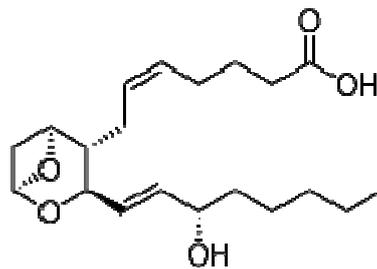


Figure I.4 : Structure chimique du thromboxane A_2

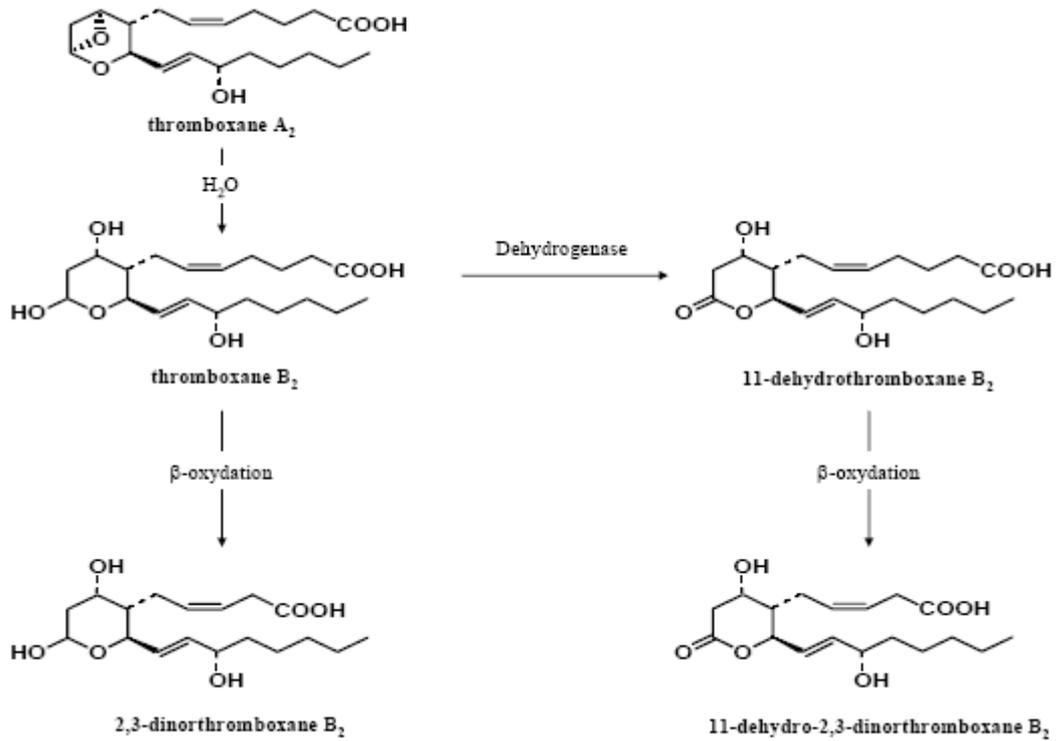


Figure I.5 : Dégradation du thromboxane A₂ en TXB₂, 11-déhydroTXB₂ et 2,3-dinorTXB₂

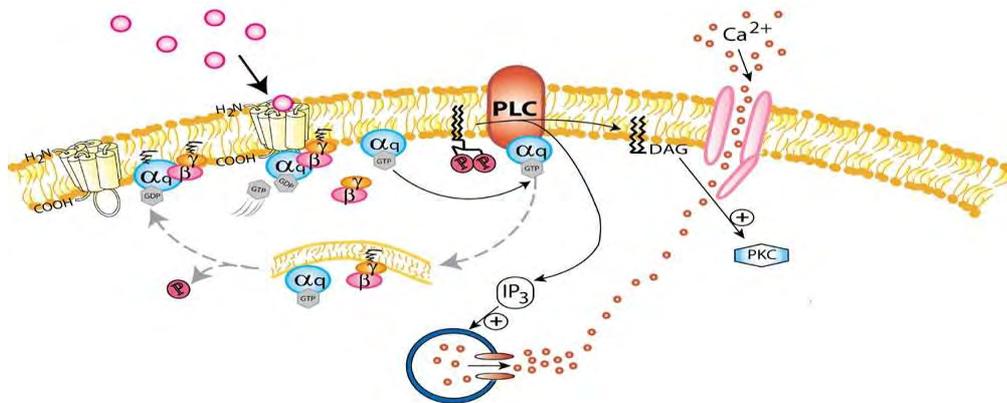


Figure I.6 : Dès sa liaison à l'agoniste, le récepteur change de conformation, ce qui constitue un signal pour l'acquisition d'un GTP par la sous-unité α (α_q) qui se dissocie alors du complexe formé par les sous unités β et γ . La sous-unité α active l'effecteur phospholipase C libérant les messagers secondaires : inositol-3-phosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ en se fixant sur son récepteur permet la mobilisation du calcium intracellulaire. Le DAG resté ancré à la membrane, et le calcium sont à l'origine de l'activation et de la translocation en membrane de la protéine kinase C.

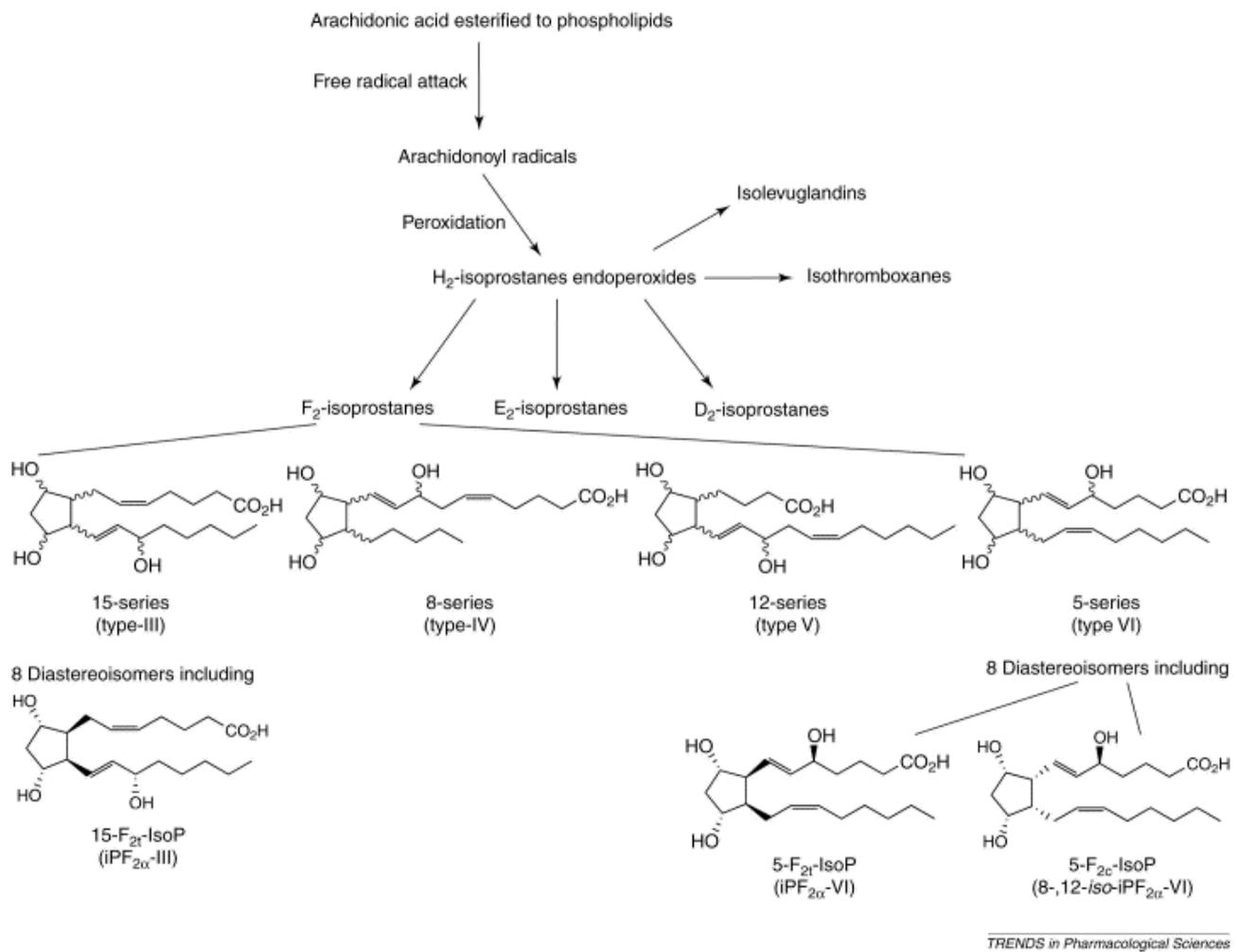
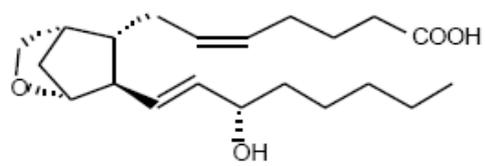
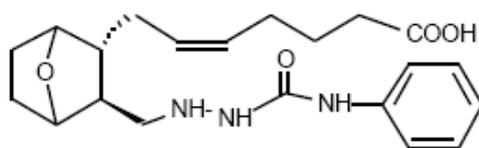


Figure I.7 : Génération des isoprostanes



U 46619

Figure I.8 : Structure chimique du U-46619



SQ-29,548

Figure I.9 : Structure chimique du SQ-29548

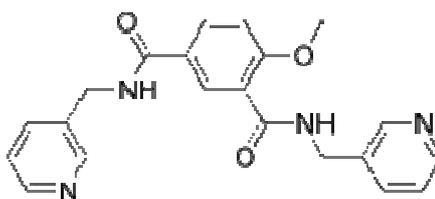


Figure I.10: Structure chimique du Picotamide

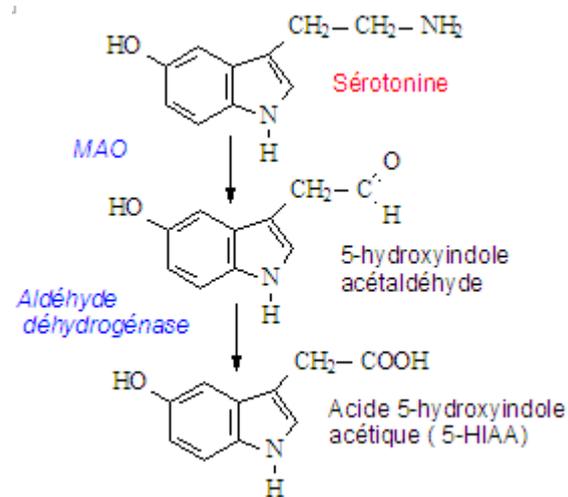


Figure I.14 : Voie de la dégradation de la sérotonine

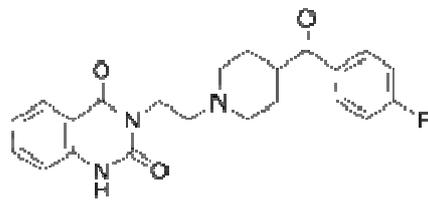


Figure I.16 : Structure de la kétansérine

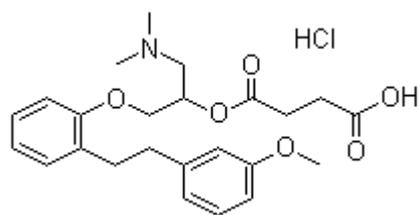


Figure I.17 : Structure chimique du sarpogrelate

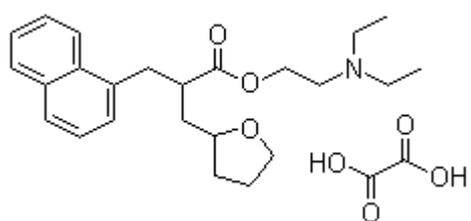


Figure I.18 : Structure chimique du Nafidrofuryl

II. Matériels et méthodes

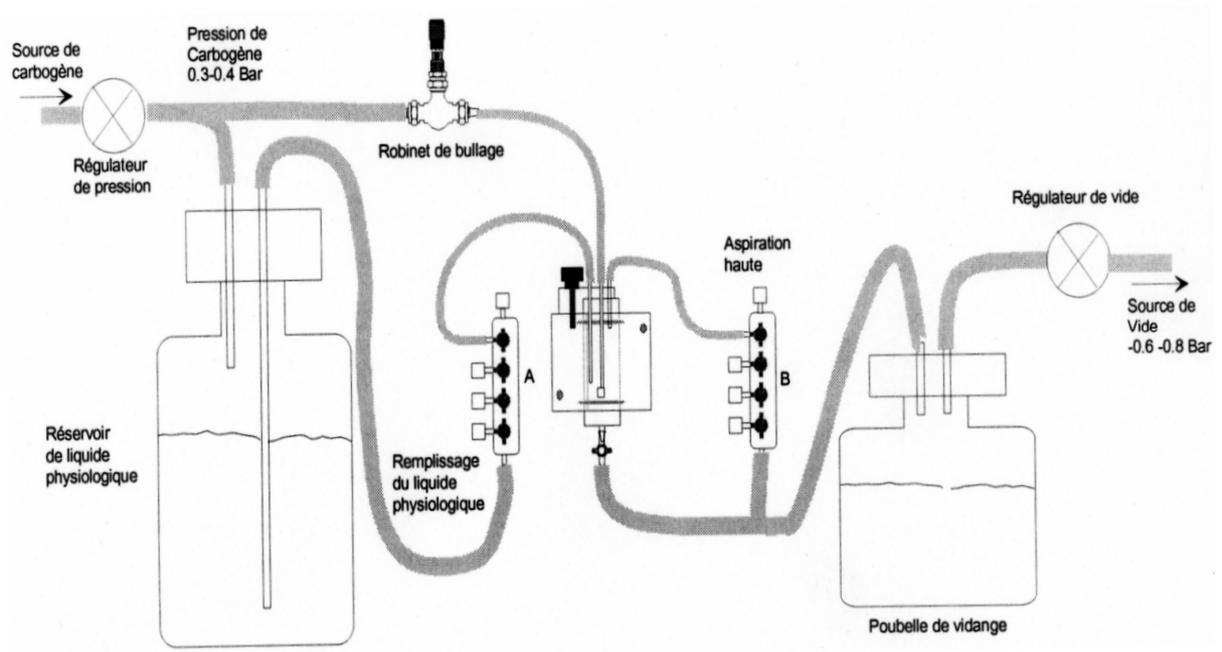


Figure II.1 : Représentation schématique du matériel utilisé lors des expériences *ex vivo*

III. Résultats

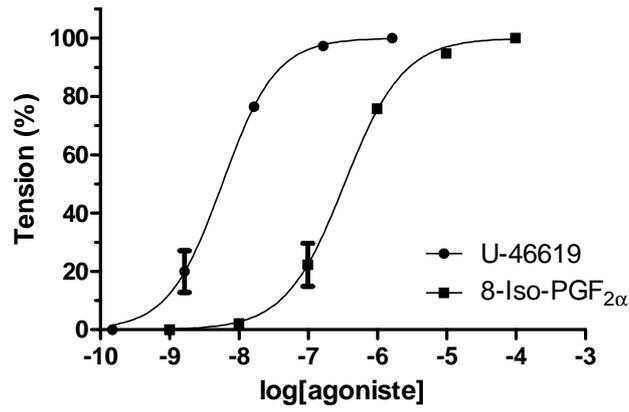


Figure III.1 : Courbes doses-réponses obtenues sur aorte de rat après stimulation par des concentrations croissantes en U-46619 et le 8-iso-PGF_{2α}.

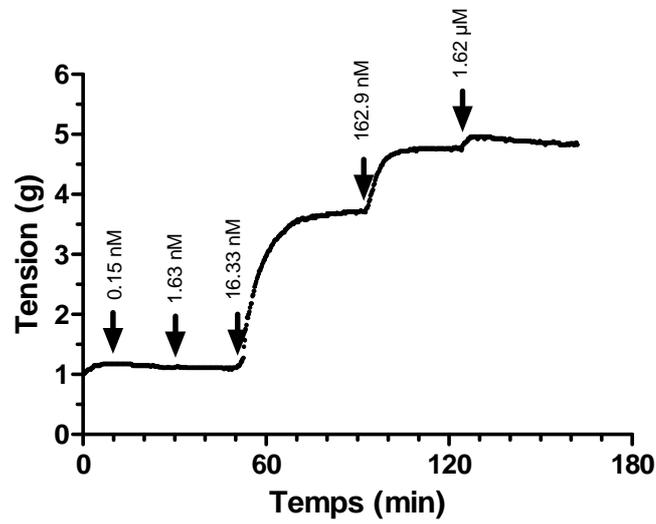


Figure III.2 : Exemple de tracé représentant l'évolution de la tension en fonction du temps après l'ajout de concentrations croissantes en U-46619.

	U-46619	8-Iso-PGF_{2α}	5-HT
contrôle (véhicule)	5,71 nM (IC ₉₅ : 4,55-7,17 nM)	0,33 μM (IC ₉₅ : 0,26-0,41 μM)	1,74 μM (1,47-2,05 μM)
SQ-29548 10 nM	105,00 nM (IC ₉₅ : 98,09-113,50 nM)	5,28 μM (IC ₉₅ : 5,02-5,55 μM)	2,36 μM (1,76-3,15 μM)
BM-520 1 μM	91,22 nM (IC ₉₅ : 63,66-130,70 nM)	11,88 μM (IC ₉₅ : 10,40-13,57 μM)	1,34 μM (0,86-2,10 μM)
picotamide 50 μM	18,86 nM (IC ₉₅ : 13,52-26,31 nM)	3,25 μM (IC ₉₅ : 3,06-3,44 μM)	3,74 μM (2,62-5,33 μM)
naftidrofuryl 50 μM	60,22 nM (IC ₉₅ : 41,87-86,61 nM)	3,37 μM (IC ₉₅ : 3,02-3,73 μM)	14,24 μM (0,96-211,30 μM)

Tableau III.1 : Tableau reprenant les valeurs d'EC₅₀ déterminées à partir des courbes doses-réponses obtenues après l'ajout de concentrations croissantes en agoniste du récepteur TP (U-46619, 8-iso-PGF_{2α}) ou en agoniste du récepteur 5-HT_{2A} (5-HT) en présence ou en absence (*véhicule*) de différents antagonistes du récepteur TP (SQ-29548, picotamide, BM-520) ou d'antagoniste du récepteur 5-HT_{2A} (naftidrofuryl) pré-incubés avec l'aorte. Les résultats sont exprimés en moyennes suivies des intervalles de confiance à 95% (IC₉₅) (n=3).

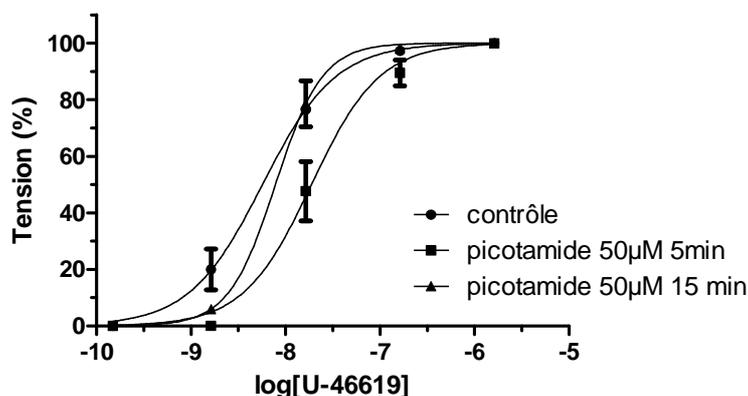


Figure III.3 : Courbes doses-réponses obtenues sur aorte de rat après stimulation par des concentrations croissantes en U-46619 en présence de picotamide 50 μM pré-incubé avec l'aorte 5 minutes ou 15 minutes.

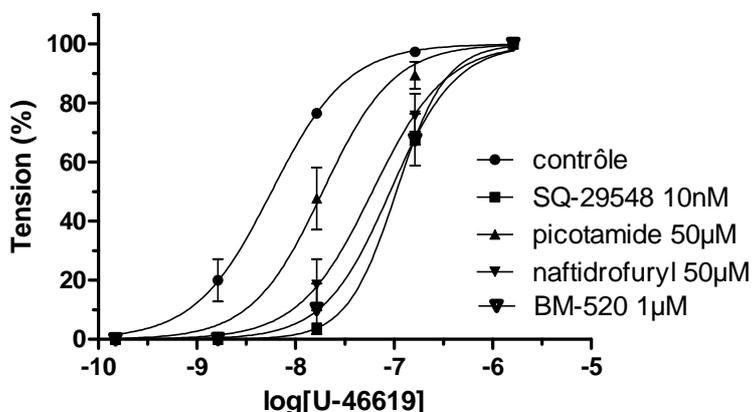


Figure III.4 : Courbes doses-réponses obtenues sur aorte de rat après stimulation par des concentrations croissantes en U-46619 en présence ou non (*véhicule*) de différents antagonistes du récepteur TP (SQ-29548, picotamide, BM-520) ou d'antagoniste du récepteur 5-HT_{2A} (naftidrofuryl).

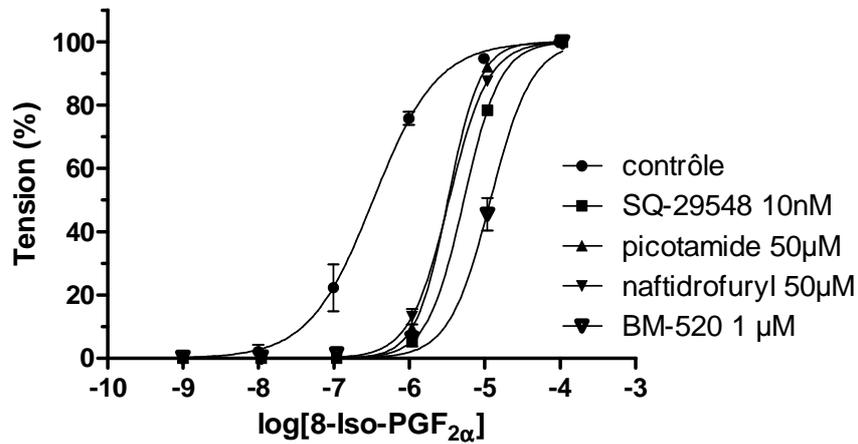


Figure III.5 : Courbes doses-réponses obtenues sur aorte de rat après stimulation par des concentrations croissantes en 8-iso-PGF_{2α} en présence ou non (*véhicule*) de différents antagonistes du récepteur TP (SQ-29548, picotamide, BM-520) ou d'antagoniste du récepteur 5-HT_{2A} (naftidrofuryl).

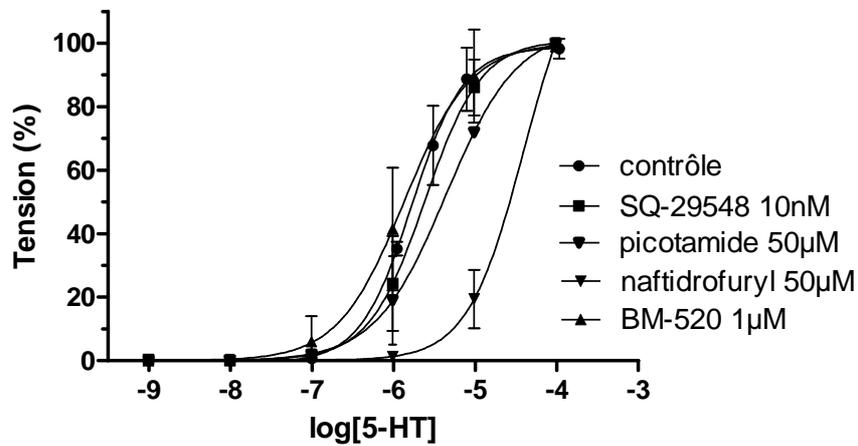


Figure III.6 : Courbes doses-réponses obtenues sur aorte de rat après stimulation par des concentrations croissantes en 5-HT en présence ou non (*véhicule*) d'un antagoniste du récepteur 5-HT_{2A} (naftidrofuryl) ou de différents antagonistes du récepteur TP (SQ-29548, picotamide, BM-520).

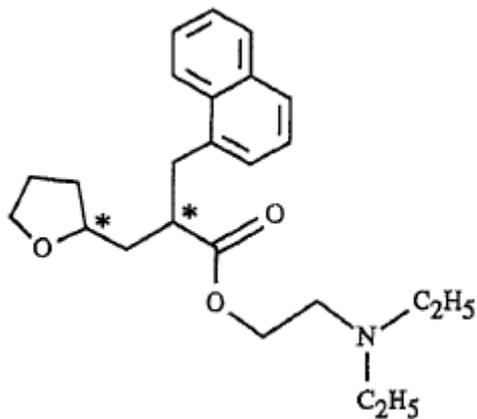


Figure III.7 : Structure chimique du nalfidrofuryl. Les étoiles indiquent montrent la position des deux carbones asymétriques.

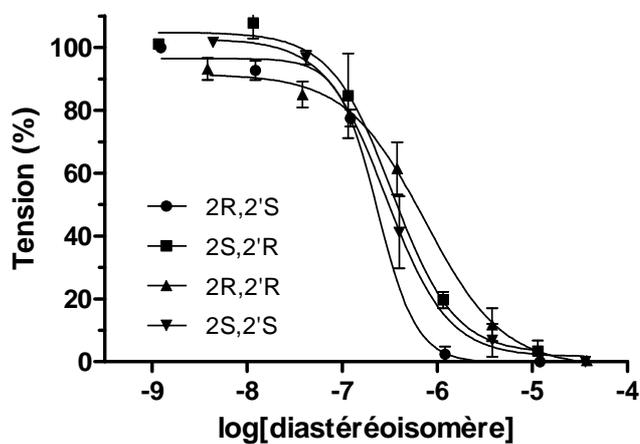


Figure III.8 : Courbes doses-réponses des quatre diastéréoisomères du nalfidrofuryl obtenues sur aorte de rat contractée au préalable par le 5-HT à 2 μ M.

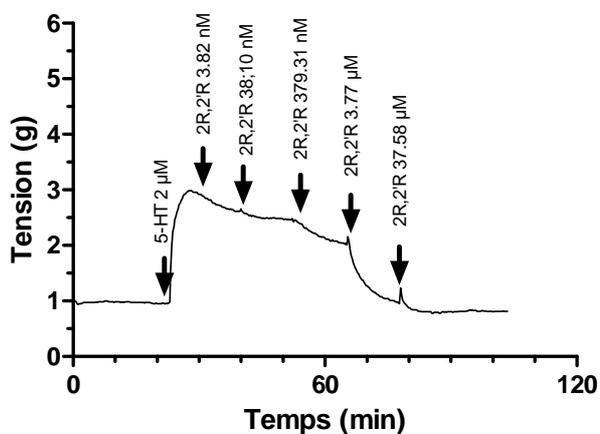


Figure III.9 : Exemple de tracé représentant l'évolution de la tension en fonction du temps lors de la relaxation de l'aorte préalablement contractée au 5-HT [2 μ M]_F au moyen de concentrations croissantes en diastéréoisomère du nalfidrofuryl (ici 2R,2'R).

	EC50	IC95
2R,2'S	236 nM	141-395 nM
2S,2'R	338 nM	163-700 nM
2R,2'R	738 nM	389-1397 nM
2S,2'S	291nM	175-483 nM

Tableau **III.2** : Tableau reprenant les valeurs d'IC₅₀ déterminées à partir des courbes doses-réponses des quatre diastéréoisomères du naftidrofuryl obtenues sur aorte de rat contractée au préalable par le 5-HT à 2 µM. Les résultats sont exprimés en moyennes suivies des intervalles de confiance à 95% (n=3).

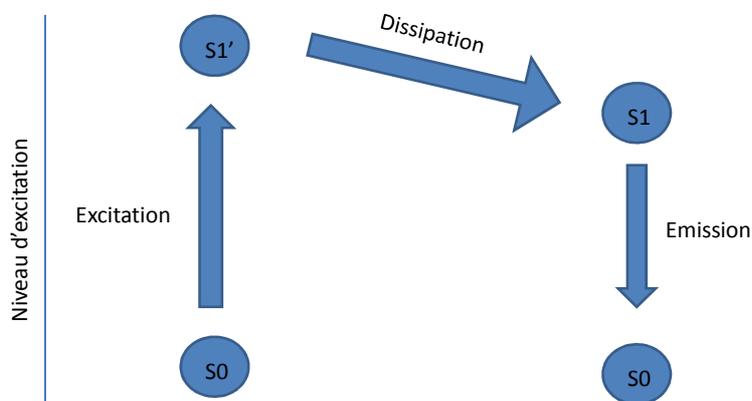


Figure **III.10** : Origine de la fluorescence

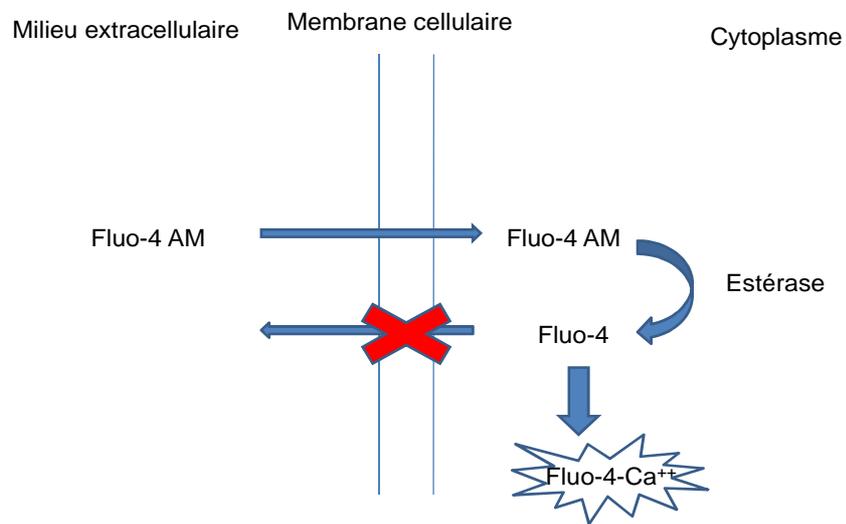


Figure III.11 : Principe de *loading* d'une sonde fluorimétrique à l'intérieur d'une cellule. Exemple du *Fluo-4 AM*

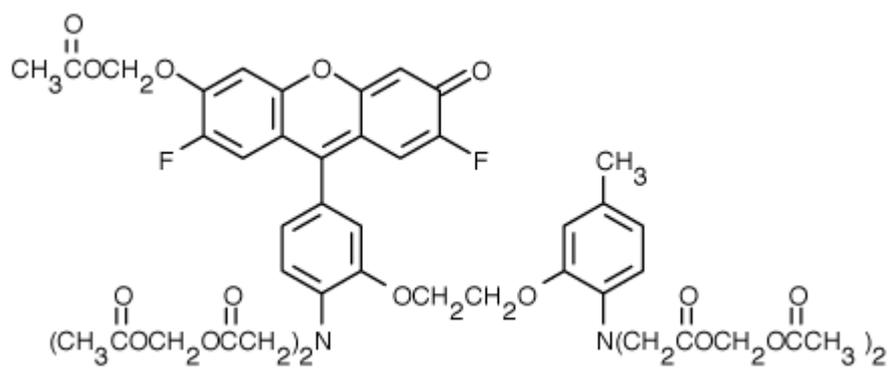


Figure III.12 : Structure chimique du Fluo-4 AM

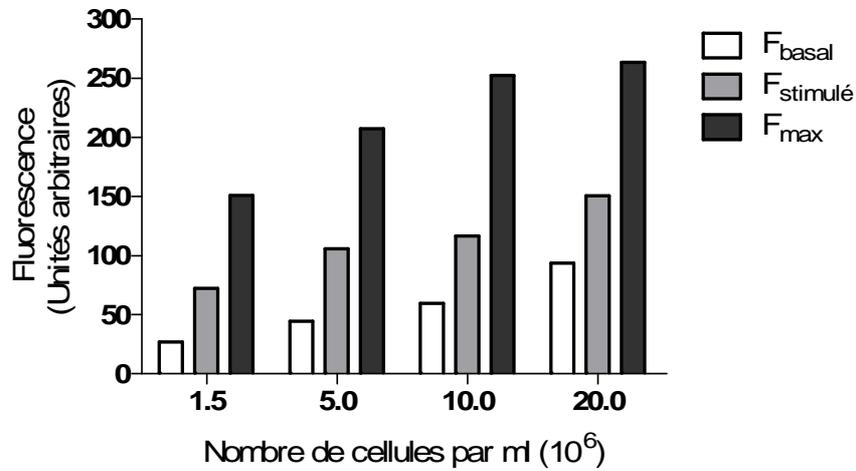


Figure III.13 : Effet du nombre de cellules sur le signal fluorescent émis par les HEK 293 TP β stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F. Les valeurs de F_{min} ont été soustraites aux valeurs des F_{basal} , $F_{\text{stimulé}}$ et F_{max} ($n=1$).

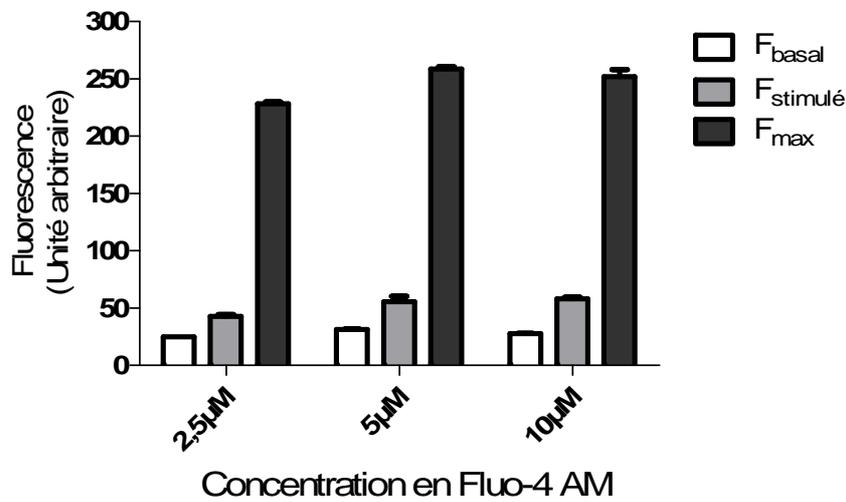


Figure III.14 : Effet de la concentration en Fluo-4 AM sur le signal fluorescent émis par les HEK 293 TP β ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml) stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F. Les valeurs de F_{min} ont soustraites aux valeurs des autres paramètres de fluorescence. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD ($n=3$).

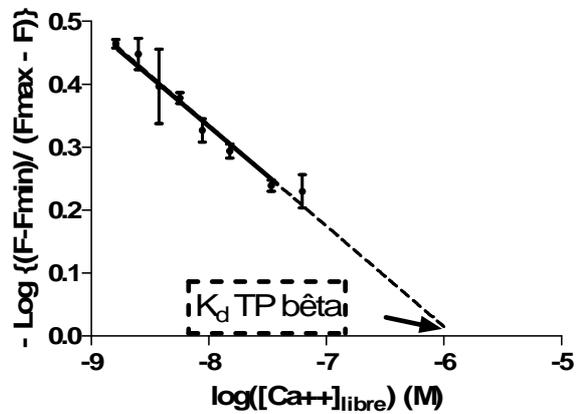


Figure III.15 : Détermination *in situ* du K_d du Fluo-4 AM dans les cellules HEK 293 TP β ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml). Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD ($n=3$).

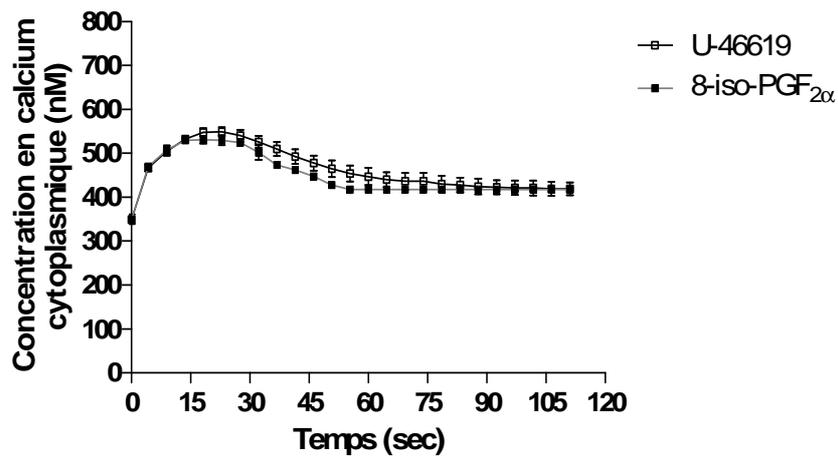


Figure III.16 : Cinétique de mobilisation du calcium dans les cellules HEK 293 TP β stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F et au 8-iso-PGF_{2 α} [$100 \mu\text{M}$]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD ($n=2$).

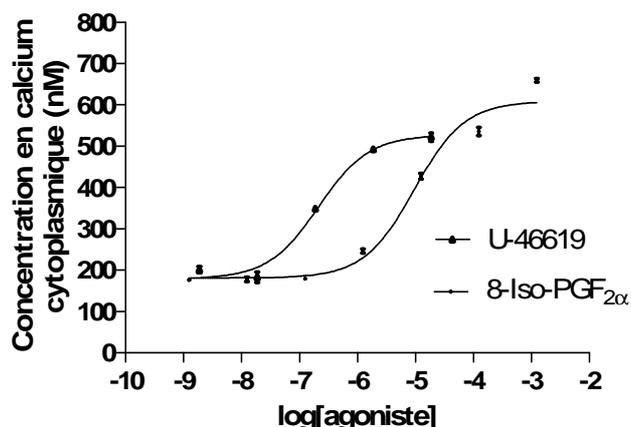


Figure III.17 : Effet de différentes concentrations en U-46619 et en 8-Iso-PGF_{2α} sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TP β. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

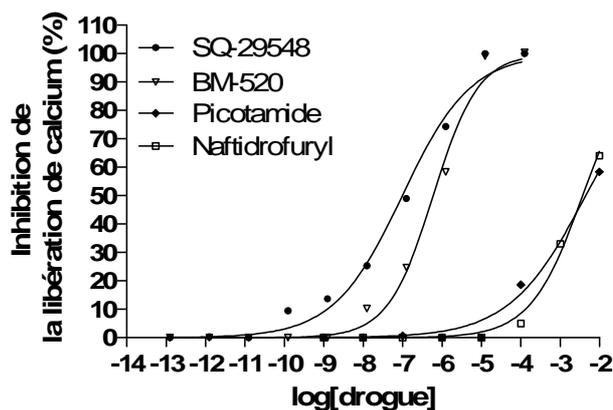


Figure III.18 : Effet des drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TPβ stimulée par le U-46619 [1μM]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

	HEK 293 TPβ		HEK 293 TPα	
	U-46619	8-iso-PGF _{2α}	U-46619	8-iso-PGF _{2α}
SQ-29548	98,95 nM (IC ₉₅ : 72,44-135,20 nM)	21,60 nM (IC ₉₅ : 76,70-191,60 nM)	17,27 nM (IC ₉₅ : 12,67-23,55 nM)	17,75 nM (IC ₉₅ : 11,37-27,69 nM)
BM-520	602,50 nM (IC ₉₅ : 471,30-770,2 nM)	121,20 nM (IC ₉₅ : 76,70-191,60 nM)	301,50 nM (IC ₉₅ : 206,80-439,50 nM)	117,30 nM (IC ₉₅ : 48,32 -284,60 nM)
Picotamide	4,45 mM (IC ₉₅ : 3,16-6,27 mM)	7,33 mM (IC ₉₅ : 6,23-8,63 mM)	8,60 mM (IC ₉₅ : 7,69-9,61 mM)	7,06 mM (IC ₉₅ : 5,86-8,52 mM)
Naftidrofuryl	3,72 mM (IC ₉₅ : 2,84-4,89 mM)	4,39 mM (IC ₉₅ : 3,40-5,65 mM)	1,47 mM (IC ₉₅ : 0,99-21,71 mM)	1,87 mM (IC ₉₅ : 0,83-4,24 mM)

Tableau III.3 : Valeurs des IC₅₀ obtenus lors de l'étude de l'effet des drogues sur l'inhibition de la mobilisation de calcium dans les cellules HEK 293 TPα et TPβ. Valeurs exprimées en moyennes suivies des intervalles de confiance à 95% (IC₉₅) (n=3).

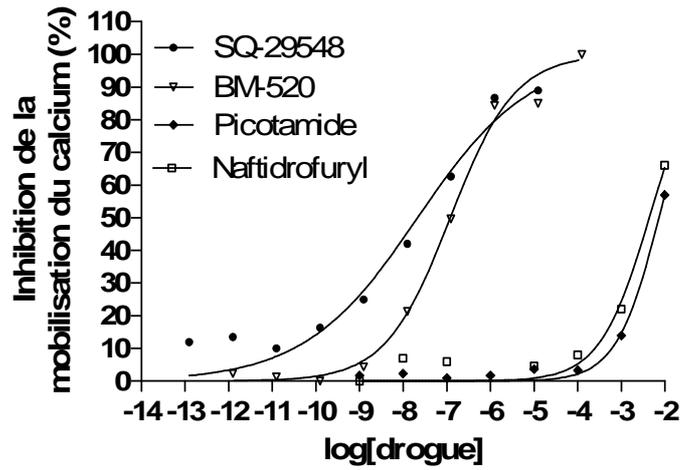


Figure III.19 : Effet des drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TP β stimulée par le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ [100 μ M]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

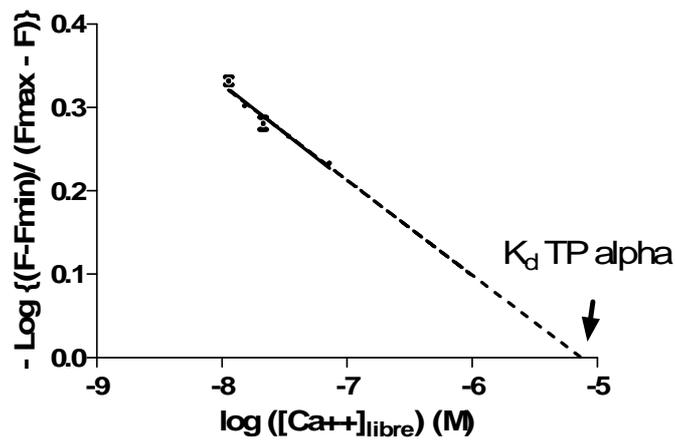


Figure III.20 : Détermination du K_d du Fluo-4 dans les cellules HEK 293 TP α . ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml). Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

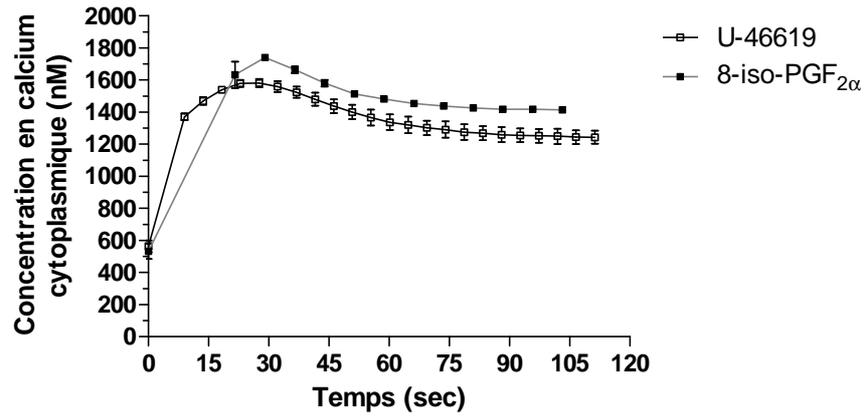


Figure III.21 : Cinétique de mobilisation du calcium dans les cellules HEK 293 TP α stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F et au 8-*iso*-PGF_{2 α} [$100 \mu\text{M}$]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=2).

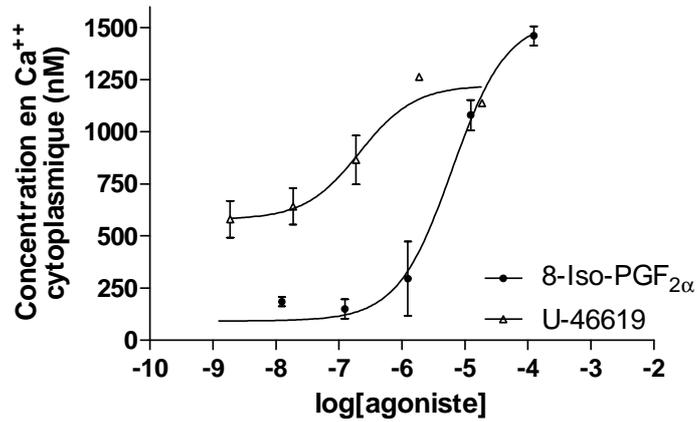


Figure III.22 : Effet de différentes concentrations en U-46619 et en 8-*iso*-PGF_{2 α} sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HEK 293 TP α . Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

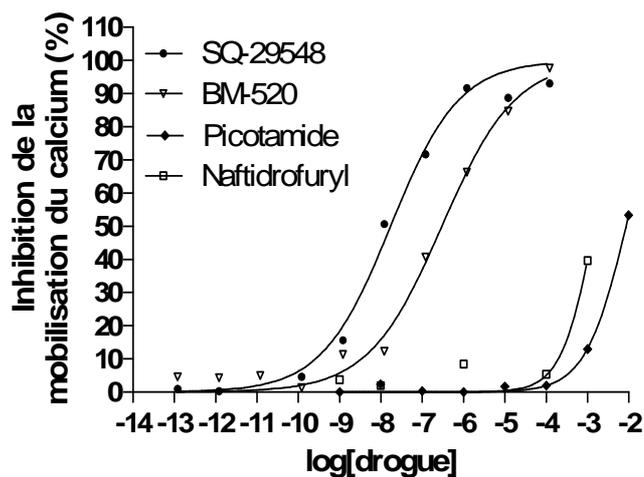


Figure III.23 : Effet de différentes drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite suite à l'activation du récepteur TP α par le U-46619 [1 μ M]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

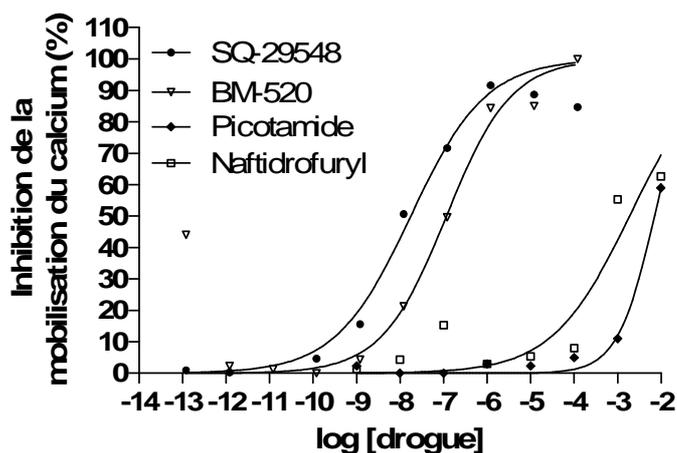


Figure III.24 : Effet de différentes drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite après l'activation du récepteur TP α par le 8-*iso*-PGF_{2 α} [100 μ M]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

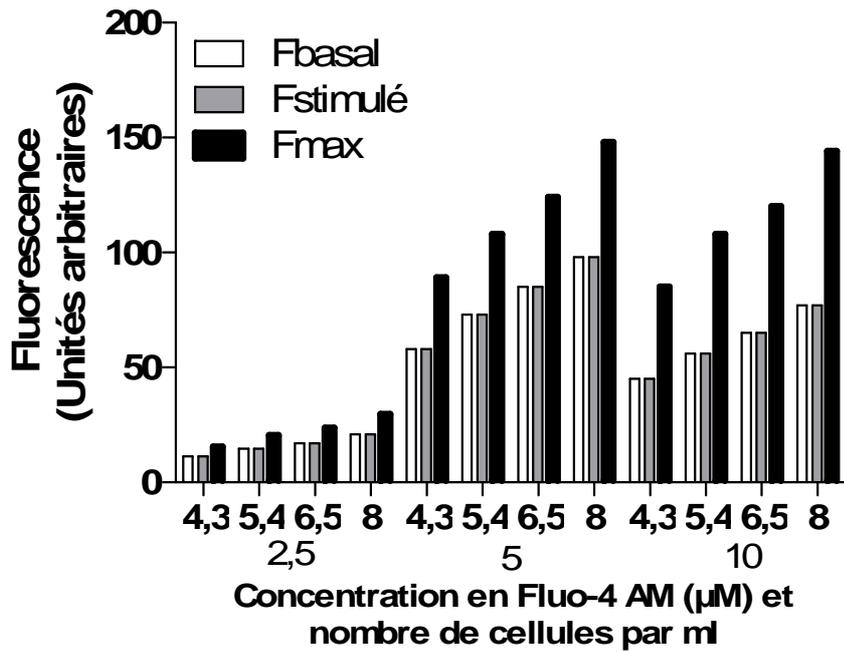


Figure III.25 : Effet de la concentration en Fluo-4 AM (caractère standard) et du nombre de cellules (**caractère en gras**) sur le signal fluorescent émis par les HVSMC stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F. Les valeurs du F_{min} ont été retirées aux valeurs des autres paramètres de fluorescence. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

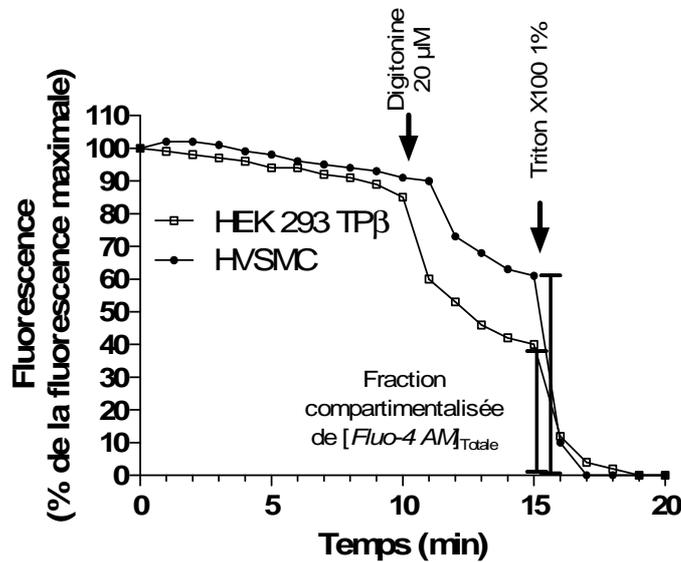


Figure III.26 : Etude de la distribution cellulaire du *Fluo-4 AM* ($5 \mu\text{M}$) dans les cellules HEK 293 TPβ et les HVSMC ($5 \cdot 10^6$ cellules/ml) (n=1).

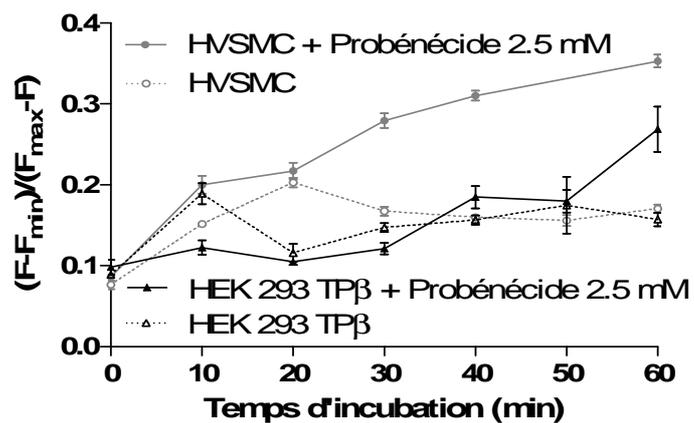


Figure III.27 : Etude du leakage du *Fluo-4 AM* ($5 \mu\text{M}$) dans les cellules HEK 293 TP β et les cellules HVSMC (1.10^6 cellules/ml). Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD ($n=3$).

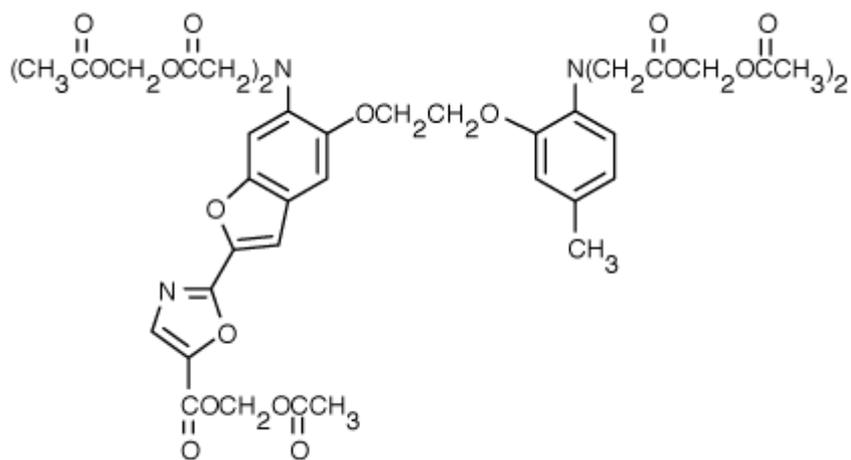


Figure III.28 : Structure chimique du *Fura-2 AM*

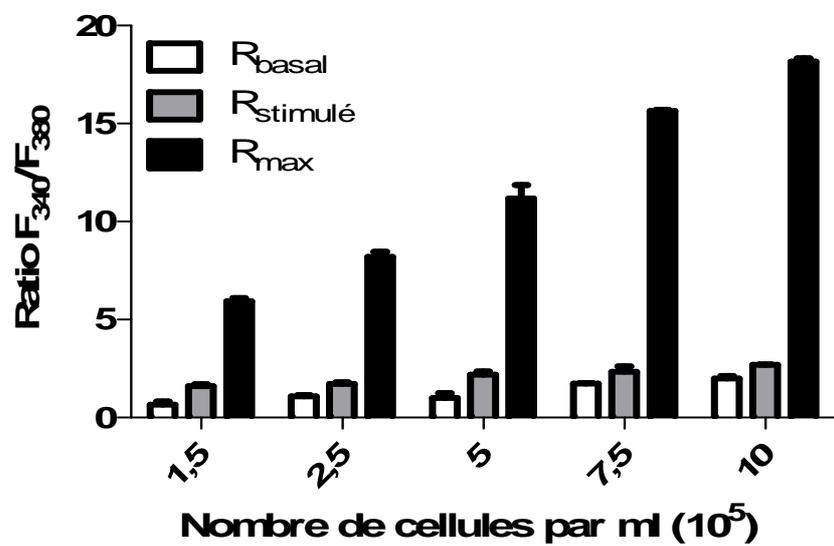


Figure III.29 : Effet du nombre de cellules sur le signal fluorescent émis par les cellules HVSMC stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F et incubées au *Fura-2 AM* [$5 \mu\text{M}$]_F. Les valeurs de F_{min} ont été soustraites aux valeurs des autres paramètres de fluorescence. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

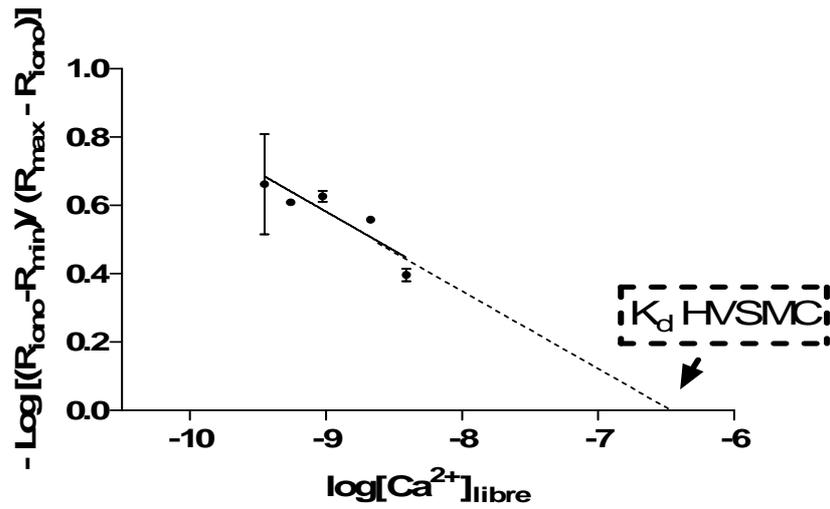


Figure III.30 : Détermination du K_d du Fura-2 dans les cellules HVSMC. ($5 \cdot 10^5$ cellules/ml). Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD ($n=3$)

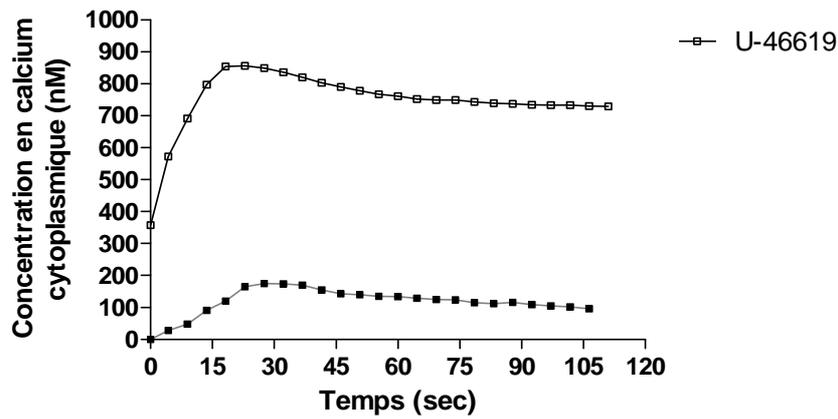


Figure III.31 : Cinétique de mobilisation du calcium dans les cellules HVSMC stimulées au U-46619 [$1 \mu\text{M}$]_F et au 8-*iso*-PGF_{2α} [$100 \mu\text{M}$]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD ($n=2$).

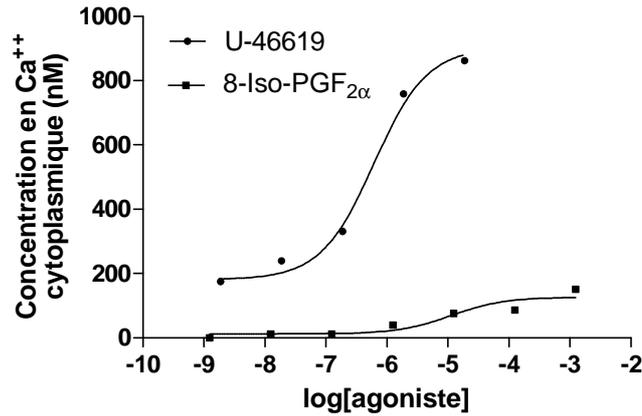


Figure III.32 : Effet de différentes concentrations en U-46619 et en 8-Iso-PGF_{2α} sur la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HVSMC. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=2).

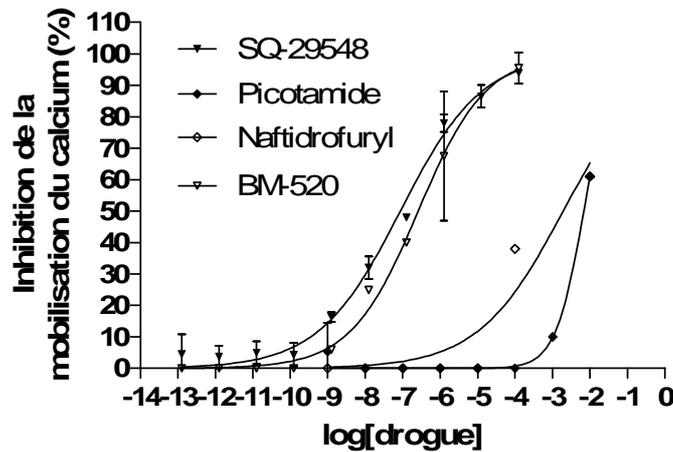


Figure III.33 : Effet de différentes drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite suite à la stimulation des cellules HVSMC par le U-46619 [1 μM]F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

HVSMC		
	U-46619	8-iso-PGF _{2α}
SQ-29548	86,58 nM (IC95: 61,29-122,30 nM)	50,10 nM (IC95: 16,64-150,80 nM)
BM-520	259,8 nM (IC95: 155,90-432,80 nM)	90,33 nM (IC95: 55,11- 148,10 nM)
Picotamide	6,79 mM (IC95: 4,89-9,44 mM)	5,89 mM (IC95: 3,52-9,85 mM)
Naftidrofuryl	1,92 mM (IC95: 0,27 -13,54 mM)	2,07 mM (IC95: 1,18-3,62 mM)

Tableau III.4 : Valeurs des IC₅₀ obtenus lors de l'étude de l'effet des drogues sur l'inhibition de la mobilisation de calcium dans les cellules HVSMC. Valeurs exprimées en moyennes suivies des intervalles de confiance à 95% (IC₉₅) (n=3).

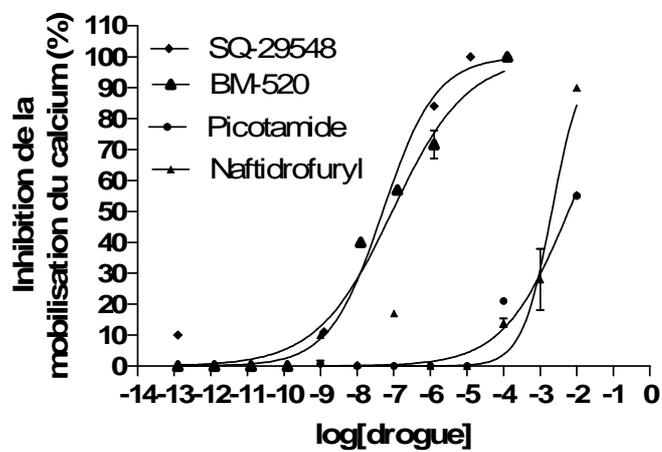


Figure III.34 : Effet de différentes drogues sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite suite à la stimulation des cellules HVSMC par le 8-iso-PGF_{2α} [100 μM]_F. Graphique représentant les moyennes avec les écarts-types exprimés en SD (n=3).

IV. Discussion

V. Conclusion et perspectives

VI. Bibliographie