

Courte communication

Inhibiteurs mixtes des voies de la cyclooxygénase et des lipoxygénases: synthèse et activité de dérivés hydrazoniques

Chantal GHIGLIERI-BERTEZ¹, Claude COQUELET^{2*}, Alain ALAZET² et Claude BONNE¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Faculté de Pharmacie (Université Montpellier 1),
15, av. Charles Flahault, F-34060, Montpellier cedex, and

²Centre de Recherche Chauvin-Blache, 104, rue de la Galéra, BP 1174, F-34009, Montpellier cedex, France

(Reçue le 20 mai 1986, acceptée le 16 décembre 1986)

Résumé — L'inhibition de la synthèse des prostaglandines est le principal mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) actuellement utilisés en thérapeutique. Des composés susceptibles d'inhiber simultanément la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes pourraient être des médicaments anti-inflammatoires à plus large spectre d'action que les AINS classiques. La synthèse d'une série d'hydrazones est décrite, ainsi que l'influence des substitutions hydrazoniques sur l'activité biologique.

Summary — **Dual inhibitors of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways: synthesis and activity of hydrazone derivatives.** *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) act by preventing prostaglandin production. In recent years, research on non-steroid dual inhibitors of prostaglandin and leukotriene biosyntheses has been developed. These compounds should represent a new class of anti-inflammatory drugs, with a wider spectrum of activity than classical NSAIDs. The present paper reports the synthesis of hydrazone derivatives. The effect of various substitutions is studied on platelet cyclooxygenase (i.e. prostaglandin synthesis) and on leukocyte 5-lipoxygenase (i.e. leukotriene synthesis). Among the 50 tested compounds, 2 hydrazone derivatives were selected for their significant dual inhibitory potency: 2-acetylthiophene-2-thiazolyhydrazone 5g, and N-phenyl benzamidrazone 6c.*

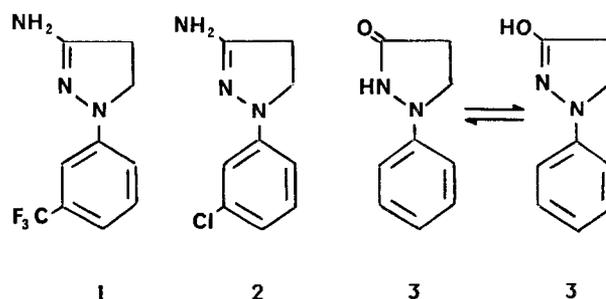
non-steroidal anti-inflammatory drugs / hydrazones / dual inhibitor / cyclooxygenase / lipoxygenase

Introduction

Les métabolites de l'acide arachidonique sont des modulateurs de nombreuses fonctions cellulaires. Par ailleurs, ces médiateurs sont impliqués dans les réactions inflammatoires et allergiques [1]. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines issues de la voie de la cyclooxygénase a été reconnue comme étant le principal mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine [2]. Cependant, les cellules inflammatoires: leucocytes polynucléaires, macrophages, mastocytes et plaquettes métabolisent l'acide arachidonique, sous l'action de lipoxygénases, en acides hydroperoxy- (HPETE) et hydroxy-icosatétraénoïques (HETE) ainsi qu'en leucotriènes. Ces dérivés jouent également un rôle important dans les processus inflammatoires, soit par leur effet chimiotactique et activateur de la sécrétion leucocytaire, soit par leurs effets vasculaires [3—5]. Les leucotriènes C₄ et D₄, constituants de la «slow reacting substance of anaphylaxis» (SRS-A) sont aussi impliqués dans les réactions allergiques

telles que l'asthme, en particulier par leur activité bronchoconstrictrice [6, 7].

Les inhibiteurs mixtes de cyclooxygénase/lipoxygénases pourraient être des médicaments anti-inflammatoires à plus large spectre d'action que les AINS actuels. Parmi les produits possédant cette double activité, des séries de phénylhydrazones ont été décrites [8, 9]. D'autre part, trois dérivés pyrazoliniques: BW 755 C (1), CLI (2) et phénidone (3), qui peuvent être considérés comme des hydrazones cycliques, présentent également ce profil [10—13].

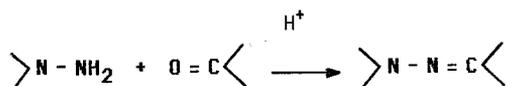


* Auteur à qui la correspondance doit être adressée.

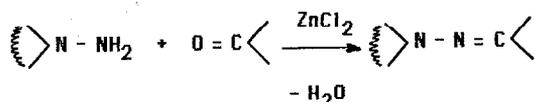
La recherche de nouveaux inhibiteurs mixtes nous a conduit à étudier l'influence des substitutions hydrazoniques sur l'activité biologique (4—11).

Chimie

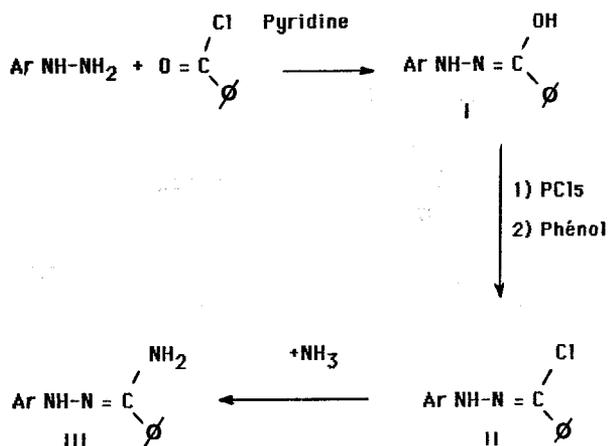
La plupart des hydrazones sont synthétisées suivant un procédé largement décrit: reflux d'un mélange équimolaire d'hydrazine et de cétone en solution alcoolique en présence d'un catalyseur acide (protocoles expérimentaux, méthodes A—C).



Pour les hydrazines *N,N* cycliques, les condensations avec les cétones sont menées en présence de chlorure de zinc comme catalyseur, en piégeant l'eau libérée au cours de la réaction (méthode D).



Les acides *N*-aryl-benzhydrazoniques I sont obtenus par condensation d'une aryl-hydrazine sur un chlorure d'acide en présence de pyridine à température ambiante (méthode E). Par reflux en présence de PCl_5 , les composés I conduisent à un intermédiaire chlorophosphinyl qui est ensuite transformé en chlorure d'acide *N*-aryl-benzhydrazonique II par addition de phénol à 0°C (méthode F). Les *N*-aryl-benzamidrazones III sont synthétisées par addition d'ammoniac à basse température sur les composés II (méthode G).



Activité biologique et Discussion

Les produits de la série 4 sont inhibiteurs de la cyclooxygénase et des lipoxygénases (l'inhibition est supérieure à 50% à la concentration de $50 \mu\text{mol} \times 1^{-1}$). Toutefois,

la substitution d'un groupe méthoxy en *para* du noyau phényle Y diminue fortement l'activité sur la 5-lipoxygénase (4c). Inversement, le dérivé 4i n'est pas actif sur les enzymes plaquettaires, et le dérivé 4k présentant un groupement Z = furyl-2 présente peu d'activité sur toutes les enzymes.

Les produits de la série 5, qui diffèrent des précédents par la nature hétérocyclique du groupement aromatique Y, sont actifs, sauf les dérivés 5b et 5f dont l'hétérocycle est un groupement 7-chloro, quinolyl-4, et le dérivé 5a (Y = pyridyl-2) qui inhibe spécifiquement la cyclooxygénase. Par ailleurs, l'introduction d'un groupement acétyle sur le noyau thiényl en Z fait également disparaître l'activité (5h vs 5g).

L'allongement de la chaîne alkyle en R1 ou l'introduction d'un cycle aromatique ou non n'apporte que peu de modification à l'activité (6d—i vs 4d) qui est fonction par ailleurs de l'effet électronique du substituant R₁: $\text{NH}_2 = \text{CH}_3 > \text{OH} > \text{COOH} = \text{COCH}_3 > \text{Cl}$; $6c = 4d > 6b > 6j = 6k = 6a$.

Lorsqu'en série 7, Z est un groupement vinyl—aromatique, les produits (7c, 7d) ont une plus grande spécificité pour la 5-lipoxygénase. Les autres dérivés de la série, dont le groupement Z est une fonction alkyl—carboxylique, ne sont pas actifs sur la 5-lipoxygénase (7b, 7e) alors que leurs esters éthyliques (7a, 7f) le sont.

Les arylhydrazones de cétones cycliques (8b—8e) sont de bons inhibiteurs, par analogie structurale avec les composés 4a—d et 6d, 6e, 6g, 6h. Le dérivé 8a, par contre, qui ne porte pas le carbone fonctionnel en alpha du noyau benzénique, perd l'activité sur les enzymes plaquettaires.

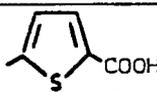
Les amide—hydrazones (9) ne sont pas des inhibiteurs mixtes. Les composés 10 obtenus à partir d'hydrazines disubstituées sont totalement inactifs, ainsi que les dérivés d'hydrazines cycliques 11.

Cette étude de la cyclooxygénase plaquettaire et de la 5-lipoxygénase leucocytaire permet de conclure à l'activité inhibitrice mixte de la structure générale où Y est aromatique, R₁ est un groupement alkyle ou un groupement NH₂ et Z un noyau aromatique ou un ester d'acide alkyl-carboxylique. Ces conclusions sont en accord avec les travaux précédents portant sur l'inhibition de la 15-lipoxygénase de soja par des hydrazones [15] et des hydrazines [16].

Dans la présente étude, les variations d'activité de la 12-lipoxygénase plaquettaire ne peuvent être interprétées avec certitude en raison de la présence simultanée dans la cellule étudiée de la cyclooxygénase. L'inhibition de celle-ci conduit en effet par une plus grande disponibilité du substrat [17] à une biosynthèse accrue de 12-HETE, susceptible de masquer une inhibition directe de la 12-lipoxygénase. La raison de cet effet pourrait être cependant plus complexe. Une stimulation sélective de la production de 12-HETE par la plaquette a été en effet observée avec des composés connus pour interférer avec le calcium intracellulaire. Il n'est pas exclu que les hydrazones interagissent avec le calcium, indépendamment de leurs effets sur le métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique.

Le dérivé apparenté BW 755 C (I) largement utilisé comme inhibiteur de référence de la voie 5-lipoxygénase [18], s'avère beaucoup moins actif ($IC_{50} = 100 \mu\text{mol} \times 1^{-1}$).

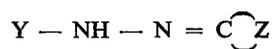


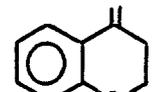
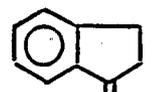
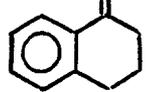
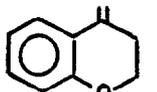
N°	Y	R ₁	Z	Formule brute	Fusion (°C) Solvant	Méthode (Rdt %)	% inhibition à 50 µM			
							LTB ₄	5-HETE	TxB ₂	12-HETE
4 a	Phényl	CH ₃	Phényl	C ₁₄ H ₁₄ N ₂	110-12 (EtOH)	A (50)	100	100	100	100
4 b	4-Cl phényl	CH ₃	Phényl	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂	100- 2 (EtOH)	A (50)	100	100	100	100
4 c	4-OCH ₃ phényl	CH ₃	Phényl	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O	120-22 (EtOH)	A (75)	50	31	100	100
4 d	3-Cl phényl	CH ₃	Phényl	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂	62- 4 (MeOH)	A (52)	100	100	77	62
4 e	3-Cl phényl	CH ₃	4-OCH ₃ phényl	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O	101- 3 (EtOH)	A (74)	100	85	100	100
4 f	3-Cl phényl	CH ₃	2-OH phényl	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂ O	90- 2 (EtOH)	A (65)	100	69	100	100
4 g	3-Cl phényl	CH ₃	3,5-diOH phényl	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	106- 8 (EtOH)	A (55)	100	100	100	n i *
4 h	3-Cl phényl	CH ₃	2,3,4-triOH phényl	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ HCl	160- 2 (EtOH)	A (58)	100	100	100	100
4 i	3-Cl phényl	CH ₃	4-F phényl	C ₁₄ H ₁₂ ClFN ₂	90- 2 (EtOH)	A (76)	100	96	0	0
4 j	3-Cl phényl	CH ₃	4-biphényl	C ₂₀ H ₁₇ ClN ₂	158-60 (EtOH)	A (78)	62	69	90	69
4 k	3-Cl phényl	CH ₃	2-furyl	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O	80- 2 (EtOH)	A (36)	33	45	77	50
4 l	3-Cl phényl	CH ₃	2-thiényl	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ S	76- 8 (EtOH)	A (66)	100	100	73	50
5 a	2-Pyridyl	CH ₃	Phényl	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	90- 2 (EtOH)	A (62)	0	0	90	0
5 b	7-Cl 4-Quinolyl	CH ₃	Phényl	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃	180- 2 (EtOH)	A (40)	0	25	100	30
5 c	2-Thiazolyl	CH ₃	Phényl	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ S	142- 4 (EtOH)	A (80)	60	100	75	100
5 d	2-Thiazolyl	CH ₃	2-OH phényl	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ OS HCl	173- 5 (EtOH)	A (40)	50	70	67	8
5 e	2-Thiazolyl	CH ₃	3,5-diOH phényl	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S HCl	235- 7 (MeOH)	A (50)	40	50	80	n i
5 f	7-Cl 4-Quinolyl	CH ₃	4-Pyridyl	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₄	184- 6 (EtOH)	A (43)	25	23	48	45
5 g	2-Thiazolyl	CH ₃	2-Thiényl	C ₉ H ₉ N ₃ S ₂	164- 6 (MeOH)	A (56)	100	100	84	78
5 h	2-Thiazolyl	CH ₃		C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S ₂	> 250 (MeOH)	C (20)	n i	n i	n i	n i
6 a	Phényl	Cl	Phényl	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂	130-2 (Benzène)	F (77)	0	0	65	90
6 b	Phényl	OH	Phényl	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	168-70 (EtOH)	E (76)	45	39	50	80
6 c	Phényl	NH ₂	Phényl	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ HCl	190- 2 (EtOH)	G (67)	100	100	64	83
6 d	3-Cl phényl	C ₂ H ₅	Phényl	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂	94- 6 (EtOH)	A (64)	100	100	58	0
6 e	3-Cl phényl	C ₃ H ₇	Phényl	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₂	70- 2 (EtOH)	A (35)	13	36	98	27
6 f	3-Cl phényl	-CHOH	Phényl	C ₂₀ H ₁₇ ClN ₂ O	90- 2 (EtOH)	A (33)	100	100	62	0

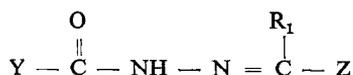
* Non inhibé

(suite)

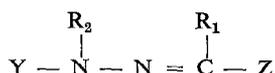
6 g	3-Cl phényl	Cyclopropyl	Phényl	$C_{16}H_{15}ClN_2$	68-70 (EtOH)	A (38)	100	100	86	0
6 h	3-Cl phényl	Cyclohexyl	Phényl	$C_{19}H_{21}ClN_2$	69-71 (EtOH)	A (33)	100	100	48	18
6 i	3-Cl phényl	2-Pyridyl	Phényl	$C_{18}H_{14}ClN_3$	130- 2 (EtOH)	A (25)	100	100	58	0
6 j	3-Cl phényl	COOH	Phényl	$C_{14}H_{11}ClN_2O_2$	185- 7 (EtOH)	C (55)	0	0	35	9
6 k	3-Cl phényl	$\begin{array}{c} O \\ \\ -C-CH_3 \end{array}$	Phényl	$C_{15}H_{13}ClN_2O$	174- 6 (EtOH)	A (51)	0	0	32	32
7 a	4-OCH ₃ phényl	CH ₃	$\begin{array}{c} O \\ \\ -(CH_2)_2-COC_2H_5 \end{array}$	$C_{14}H_{20}N_2O_3$	82- 4 (EtOH)	B (70)	100	100	100	93
7 b	3-Cl phényl	CH ₃	COOH	$C_9H_9ClN_2O_2$	156- 8 (EtOH)	C (62)	0	0	13	n i
7 c	3-Cl phényl	CH ₃	-CH=CH-Ø	$C_{16}H_{15}ClN_2$	104- 6 (EtOH)	A (70)	100	100	0	0
7 d	3-Cl phényl	C ₂ H ₅	-CH=CH- 	$C_{15}H_{15}ClN_2S$	123- 5 (EtOH)	A (27)	100	100	42	9
7 e	2-Thiazolyl	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -COOH	$C_9H_{13}N_3O_2S$	188-90 (MeOH)	C (56)	0	0	0	28
7 f	2-Thiazolyl	CH ₃	$\begin{array}{c} O \\ \\ -(CH_2)_3-COC_2H_5 \end{array}$	$C_{11}H_{17}N_3O_2S$	92-94 (MeOH)	A (54)	100	100	24	0



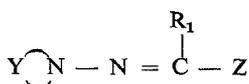
N°	Y	$=\overset{\circ}{C} - Z$	Formule brute	Fusion (°C) Solvant	Méthode (Rdt %)	% inhibition à 50 µM			
						LTB ₄	5HETE	TxB ₂	12HETE
8 a	3-Cl phényl		$C_{15}H_{13}ClN_2$	140- 2 (EtOH)	A (80)	65	87	10	n i
8 b	3-Cl phényl		$C_{15}H_{13}ClN_2O$	118-20 (EtOH)	A (70)	100	100	100	n i
8 c	2-Thiazolyl		$C_{12}H_{11}N_3S$	178-80 (MeOH)	A (57)	100	100	81	63
8 d	2-Thiazolyl		$C_{13}H_{13}N_3S$	176- 8 (DMF)	A (37)	100	100	81	68
8 e	2-Thiazolyl		$C_{12}H_{11}N_3OS$	200- 2 (MeOH)	A (58)	100	100	70	66

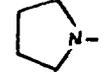
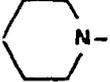
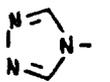


N°	Y	R ₁	Z	Formule brute	Fusion (°C) Solvant	Méthode (Rdt %)	% inhibition à 50 µM			
							LTB ₄	5 HETE	TxB ₂	12 HETE
9 a	Benzyl	CH ₃	Phényl	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O	155- 7 (MeOH)	A (57)	0	0	100	0
9 b	3-Cl phényl	CH ₃	Phényl	C ₁₅ H ₁₃ ClN ₂ O	148-50 (MeOH)	A (52)	62	100	n i	28
9 c	4-Pyridyl	CH ₃	Phényl	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O	168-70 (EtOH)	A (30)	n i	n i	0	0



N°	Y	R ₂	R ₁	Z	Formule brute	Fusion (°C) Solvant	Méthode (Rdt %)	% inhibition à 50 µM			
								LTB ₄	5 HETE	TxB ₂	12 HETE
10 a	Phényl	CH ₃	CH ₃	Phényl	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ HCl	98-100 (EtOH)	C (77)	0	0	38	0
10 b	Phényl	Phényl	CH ₃	Phényl	C ₂₀ H ₁₈ N ₂	96- 8 (EtOH)	C (28)	7	10	12	0
10 c	Phényl	Phényl	CH ₃	2-Thiényl	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ S	97- 9 (MeOH)	C (25)	10	40	7	24



N°	Y - N -	R ₁	Z	Formule brute	Fusion (°C) Solvant	Méthode (RDT %)	% inhibition à 50 µM			
							LTB ₄	5 HETE	TxB ₂	12 HETE
11 a		CH ₃	Phényl	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	Huile	D (70)	0	20	0	12
11 b		CH ₃	Phényl	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ HCl	121- 3 (MeOH)	D (80)	13	40	32	n i
11 c		CH ₃	Phényl	C ₁₀ H ₁₀ N ₄	118-20 (MeOH)	D (30)	3	30	6	0

Une analyse plus approfondie des activités inhibitrices enzymatiques et anti-inflammatoires a permis de retenir les dérivés **5g** et **6c** pour un développement pharmaceutique [17, 19-20].

Protocoles expérimentaux

Chimie

Méthode A

Porter à ébullition 0,01 mol d'hydrazine et de cétone dans 25 ml d'étha-

nol en présence de 5 gouttes d'acide acétique. Triturer les cristaux obtenus après évaporation du solvant au bain-marie sous vide dans 20 ml de NH₄OH, essorer, laver par l'eau et recristalliser dans le solvant correspondant (Voir tableau).

Méthode B

Ajouter en une seule fois 0,05 mol de cétone à une solution de 0,05 mol d'hydrazine dans 10 ml d'acide acétique et 40 ml d'eau. Agiter encore 5 min à température ambiante, essorer, laver par l'eau et recristalliser.

Méthode C

Porter à ébullition pendant 10 min 0,01 mol de cétone et d'hydrazine dans 25 ml d'éthanol à 95°C. Après évaporation du solvant au bain-marie sous vide, recristalliser le résidu.

Méthode D

Chauffer à reflux 0,02 mol d'amine, 0,02 mol d'acétophénone et 0,001 mol de chlorure de zinc en solution dans 100 ml de benzène, dans un ballon surmonté d'un piège à eau, jusqu'à élimination totale de l'eau. Après évaporation du benzène au bain-marie sous vide, fractionner sous vide le résidu ou le cristalliser dans le solvant approprié.

Méthode E: Benzoyl phenylhydrazide 6b

Ajouter 0,05 mol de chlorure d'acide benzoïque goutte à goutte entre 5 et 15°C à une solution de 0,05 mol de phénylhydrazine dans 40 ml de pyridine. Laisser reposer 48 h à température ambiante. Concentrer de moitié au bain-marie sous pression réduite et verser dans 200 ml d'eau glacée. Essorer et recristalliser le précipité ainsi obtenu dans l'éthanol.

Méthode F: Chlorure de l'acide N-phenyl benzhydrazonique 6a

Chauffer à reflux pendant 3 h 0,07 mol de benzoyl phénylhydrazide et 0,077 mol de pentachlorure de phosphore dans 200 ml de tétrachlorure de carbone. Refroidir ensuite à 0°C et ajouter goutte à goutte à cette température 0,37 mol de phénol dans 100 ml de tétrachlorure de carbone. Maintenir l'agitation à 0°C 1 h après l'addition. Après évaporation du solvant sous pression réduite, cristalliser le résidu dans le méthanol à 0°C et recristalliser dans du benzène.

Méthode G: N-phenyl benzamidrazone 6c

Faire passer un courant d'ammoniac sec pendant 2 h à 0°C dans une solution de 0,2 mol de chlorure de l'acide N-phenyl benzhydrazonique dans 400 ml de tétrahydrofurane anhydre. Filtrer l'insoluble et évaporer le filtrat à sec sous pression réduite. Dissoudre le résidu dans l'éther et saturer la solution avec un courant d'acide chlorhydrique. Essorer le précipité formé et recristalliser dans l'éthanol.

Biologie**Métabolisme du [¹⁴C]acide arachidonique dans les leucocytes péritonéaux de lapin**

Les leucocytes sont obtenus selon la technique décrite par Borgeat et coll. [14] avec quelques modifications. En bref, 100 ml d'une solution de glycogène à 0,2 % sont injectés dans la cavité péritonéale de lapins albinos New Zealand mâles. 5 h après, les animaux sont anesthésiés et 100 ml de PBS Dulbecco hépariné, sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ sont injectés dans la cavité péritonéale. L'abdomen est incisé et le liquide péritonéal est recueilli, filtré et centrifugé (220 × g, 15 min, 20°C). Le culot cellulaire est lavé 2 fois dans le même milieu. La viabilité (96 %) est mesurée par le test d'exclusion au bleu trypan. Le volume de la suspension est ajusté de façon à obtenir 2–2,5 × 10⁷ leucocytes/ml. Un ml de suspension est préincubé 15 min à 37°C en présence de 10 µl de DMSO (témoin) ou du produit testé dissous dans 10 µl de DMSO. La réaction est déclenchée par addition de [¹⁴C]arachidonate de Na (1 µCi, 18 µM) et de A23187 (1 µM). Elle est bloquée au bout de 5 min par addition de 3 vol d'eau glacée. Les incubats sont acidifiés à pH 3 et la radioactivité extraite par 2 fois 10 vol d'acétate d'éthyle. La phase organique est évaporée à sec et le résidu, redissous dans 50 µl d'acétate d'éthyle, est déposé sur plaque de gel de silice (Merck). Les chromatogrammes sont développés par double migration dans le système éther diéthylique:éther de pétrole:acide acétique (50:50:1, v/v) et lus sur radioscaner. Les métabolites de la 5-lipoxygénase LTB₄ (R_f: 0,09) et 5-HETE (R_f: 0,50) sont quantifiés.

Métabolisme du [¹⁴C]acide arachidonique dans les plaquettes de lapin
Le sang est prélevé par ponction cardiaque sur anti-coagulant et centrifugé (200 × g, 10 min, 20°C). Le surnageant (PRP) collecté est recentrifugé (1500 × g, 15 min, 20°C). Le culot plaquettaire est lavé dans un tampon Tris-HCl (10 mM), pH 7,4, contenant NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), gélatine (0,25 %), glucose (1 g/l) et EDTA (0,2 mM). Il est repris pour l'étude du métabolisme dans le même tampon sans EDTA et supplémenté en CaCl₂ (1,3 mM) et MgCl₂ (2 mM) à la concentration plaquettaire du PRP initial (5 × 10⁸ plaquettes/ml). La suspension plaquettaire (500 µl) est préincubée 15 min à 37°C en présence de 10 µl de DMSO ou du composé à tester. L'incubation débute par l'addition de [¹⁴C]arachidonate de Na (0,18 µCi, 6,5 µM). Elle est bloquée au bout de 15 min par l'addition de 50 µl d'acide citrique 0,5 M. L'extraction et le dépôt sur plaque s'effectuent comme précédemment. Les extraits secs sont développés par migration dans le système chloroforme:méthanol:acide acétique:eau (90:8:1:0,8, v/v) puis lus sur radioscaner. Les métabolites de la cyclooxygénase (TxB₂) et de la 12-lipoxygénase (12-HETE) sont quantifiés.

Références

- Malmsten C. L. (1981) in: *The Inflammatory Process*, Almquist and Wiksell Int., Stockholm, pp. 73
- Vane J. R. (1971) *Nat. (New Biol.)* 231, 232
- Seeger W., Wolf H., Stähler G., Neuhofer H. & Roka L. (1982) *Prostaglandins* 23, 157
- Björk J., Arfors K.-E., Dahlen S.-E. & Hedqvist P. (1981) in: *The Inflammatory Process*, Almquist and Wiksell Int. Stockholm, pp. 103
- Stenson W. F., Parker C. W. & Sullivan T. J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1045
- Leitch A. G. (1984) *Clin. Sci.* 67, 153
- Bisgaard H. (1984) *Allergy* 39, 413
- Wallach D. P. & Brown V. R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 663, 361
- Shinozaki J., Okazaki T., Sugai S., Akaboshi M., Ikegami S., Kajiwara Y., Kimura T., Kambara T. & Naito Y. (1986) *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60 158, 155*
- Higgs G. A., Flower R. J. & Vane J. R. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 1959
- Myers R. F. & Siegel M. I. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 586
- Adcock J. J., Garland L. G., Moncada S. & Salmon J. A. (1978) *Prostaglandins* 16, 179
- Walker J. L. (1980) *Adv. Prostaglandins, Thromboxane Res.* 6, 115
- Borgeat P., Hamberg M. & Samuelsson B. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 7816
- Baumann J. & Wurm G. (1982) *Agents Actions* 12, 360
- Robak J. & Duniec Z. (1980) in: *Prostaglandins and Thromboxanes*, Pergamon Press, Oxford, pp. 341
- Bertez C., Miquel M., Coquelet C., Sincholle D. & Bonne C. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 1757
- Willoughby D. A., Dawson W., Kitchen E. A. & Walker J. R. (1981) *Rhumatologie* 57, 431
- Sincholle D., Bertez C., Légrand A., Conduzorgues J. P. & Bonne C. (1985) *Arzneim. Forsch.* 35, 1260
- Bertez C., Conduzorgues J. P., Sincholle D., Coquelet C. & Bonne C. (1986) *Adv. Inflamm. Res.* 10, 414