

UNIVERSITE DE MONS

FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE



# EVALUATION DE LA CARDIOTOXICITE DES ANTI-INFLAMMATOIRES NON- STEROÏDIENS PAR APPROCHE METABONOMIQUE DANS UN MODELE DE RAT PRESENSIBILISE



Promoteur :

**Dr. J.-M. Colet**

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Service de Biologie humaine et Toxicologie

Rapporteurs :

**Dr. S. Carlier**

**Dr. S. Laurent**

**Dr. G. Doumont**

Co-promoteur :

**Dr. M. Podrecca**

**Dallons Matthieu**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade légal de

Master en Sciences Biomédicales

Année académique 2015-2016



# Remerciements

Je souhaiterais remercier très sincèrement l'ensemble du service de Biologie Humaine et Toxicologie pour cette année riche en enseignement passée à leur côté.

Un merci tout particulier au Docteur Manuel Podrecca, promoteur initial de ce travail, pour ses conseils, sa disponibilité, son partage de connaissances, sa confiance et le suivi porté à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur Jean-Marie Colet pour l'accueil au sein de son service, ses précieux conseils et la supervision de ce travail.

Je remercie également toute l'équipe travaillant dans ce service pour l'aide, le soutien et les bons moments passés en leur compagnie, ce qui m'a permis de réaliser ce travail dans des conditions optimales.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements au service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale et plus particulièrement au Professeur Luce Vander Elst pour le support technique nécessaire à la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements au service d'Histologie du Professeur Denis Nonclercq pour la mise à disposition du matériel et plus spécialement à Madame Françoise Coulon pour sa précieuse aide.

Un merci particulier au service de Biologie Moléculaire du Professeur Declèves pour la mise à disposition du matériel.

Un grand merci au personnel de l'animalerie pour leur travail et leur sympathie.

Je termine en remerciant tous mes proches, famille et amis, pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à l'ensemble des membres du jury pour leur attention portée à ce travail.



# Résumé

**Mots-clés :** AINS, cardiotoxicité, biomarqueur, métabonomique

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) constituent une classe pharmacologique répandue et largement utilisée dans le traitement d'états inflammatoires aigus ou chroniques. Leur utilisation comme médication chronique est particulièrement rencontrée chez les patients atteints d'ostéoarthrite ou d'arthrite rhumatoïde. Les AINS sont connus pour induire une toxicité gastro-intestinale, hépatique et rénale. Cependant, des études épidémiologiques récentes tendent à montrer une augmentation de pathologies cardiovasculaires, dont des infarctus du myocarde, chez les patients traités aux AINS. En 2004, le Rofécoxib, un AINS sélectif, a été retiré du marché en raison d'une incidence d'infarctus du myocarde augmentée chez des patients traités. Ce fait démontre qu'actuellement, les méthodes employées dans les études toxicologiques précliniques ne sont pas assez performantes pour détecter une toxicité cardiaque, surtout si celle-ci est faible. Beaucoup de médicaments sont encore, à l'heure actuelle, responsables d'effets aduerses cardiaques pendant les études cliniques ou après leur mise sur le marché. Le développement de nouveaux outils pour les études précliniques et cliniques destinées à l'évaluation de la cardiotoxicité de médicaments en développement est primordial afin de garantir la sécurité des patients. L'objectif de ce travail consiste en la caractérisation par une approche métabonomique de potentiels nouveaux biomarqueurs de toxicité cardiaque, dans un modèle de rats hypertendus.

Deux molécules ont été sélectionnées pour la réalisation de ce travail : le Diclofénac et le Rofécoxib. Les souches de rats SHR et DAHL/SS ont été employées comme modèle d'hypertension afin de potentialiser la cardiotoxicité des AINS. Une étude a été réalisée pour le Diclofénac sur des rats SHR. Pour le Rofécoxib, une étude sur des rats SHR et une étude sur des rats DALH/SS ont été effectuées. Les rats ont été exposés aux molécules pendant 28 jours, à deux doses différentes. Des prélèvements d'urine et de sang ont été effectués régulièrement au cours de l'exposition, ainsi que la mesure de paramètres physiologiques. Les rats ont été euthanasiés à différents moments des études afin de réaliser une analyse histologique du cœur. Pour chaque étude, une analyse métabonomique a été réalisée sur les échantillons d'urine. Ces données ont été confrontées à celles de l'étude histologique ainsi qu'au dosage des biomarqueurs protéiques conventionnels de toxicité cardiaque.



Les études métabonomiques ont identifié des changements métaboliques chez les rats exposés à la forte dose. Ces changements ont permis d'établir des hypothèses sur des perturbations de voies biochimiques pouvant être en lien avec des phénomènes de nécrose cardiaque : altération du cycle de Krebs, augmentation de la synthèse de la créatinine, stress oxydatif, stress osmotique, altération du métabolisme de la choline et des purines, mécanismes adaptatifs de protection. Ces hypothèses ainsi que leur localisation tissulaire restent à être confirmées par des analyses et études supplémentaires.



# Summary

**Keywords :** NSAID, cardiotoxicity, biomarker, metabonomics

Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used worldwide to deal with several pathological conditions such as acute and chronic inflammation. They are mainly used in the chronic treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. NSAIDs are known to induce gastrointestinal tract, liver and kidney toxicities. However, recent epidemiological studies revealed worrying cardiovascular events for patients treated with NSAIDs, particularly myocardial infarction. In 2004 Rofecoxib, a selective NSAID, was withdrawn from the worldwide market due to a significant increase of myocardial infarction incidence. This demonstrates again that current preclinical toxicological studies are not sensitive enough to detect such toxic event, when nascent. Today a lot of drugs are responsible for cardiovascular events during the clinical trials or after their marketing. So there is a need for a method that can detect these events during the preclinical and clinical trials in order to ensure patient safety. The aim of this work is the characterization of the new possible cardiotoxicity biomarkers in hypertensive rats by metabonomics.

Two molecules were selected for this work : Diclofenac and Rofecoxib. The SHR and DAHL/SS rat strains were used as a hypertension model in view to potentiate the NSAIDs cardiotoxicity. One study was performed for the Diclofenac in SHR rats. For the Rofecoxib, one study in SHR rats and one study in DAHL/SS rats were carried out. The rats were exposed to the molecules for a 28-day period at two different doses. Urine and blood samples were collected at different study time points. Physiological measurements were also performed. The rats were euthanized at different times of the studies for cardiac histological investigations. For each study, a metabonomics analysis was carried out on urine samples. The data obtained were compared to data from histological and conventional biomarkers measurement.

The metabonomics studies identified metabolic changes in rats exposed to the high dose. These changes allowed us to make hypothesis about biochemical pathways alterations, which could be linked to myocardial necrosis events : Krebs cycle alteration, creatinine synthesis increase, oxidative stress, osmotic stress, choline and purines metabolism disturbance, as



well as cellular adaptative mechanisms. These hypotheses and their tissue localization need confirmation by additional analysis and studies.



# Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien

AST : Aspartate aminotransférase

CMLC-1 : Chaîne légère de la myosine-1 cardiaque (Myosin light chain-1)

COX-1 : Cyclo-oxygénase-1

COX-2 : Cyclo-oxygénase-2

cTnI : Troponine I cardiaque

CYP2C9 : Cytochrome P450 2C9

DMA : Diméthylamine

ECLIA : Dosage immunologique par électro-chimiluminescence (Electro-chemiluminescence immunoassay)

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-linked immunosorbent assay)

eNOS : NO synthase endothéliale

FABP : Protéine de liaison aux acides gras (Fatty acid binding protein)

FID : Free induction decay

<sup>1</sup>H-RMN : Résonance magnétique nucléaire du proton

LD : Lactate déshydrogénase

LDL : Lipoprotéine de faible densité (Low density lipoprotein)

MA : Méthylamine

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NO : Oxyde nitrique

ox-LDL : LDL oxydé

PCA : Analyse en composantes principales (Principal component analysis)

PGE2 : Prostaglandine E2

PGI2 : Prostaglandine I2

PLS : Régression des moindres carrés partiels (Partial least squares regression)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)

TMA : Triméthylamine

TAM N-ox : Triméthylamine N-oxyde

TSP : Triméthylsilyl propionate

TXA2 : Thromboxane 2

VIP : Liste des variables selon leur importance (Variable importance plot)



# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON-STEROÏDIENS .....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Mécanisme d'action .....	3
1.3 Classification.....	5
2. TOXICOLOGIE DES AINS.....	5
2.1 Effets adverses principaux.....	5
2.2 Toxicité cardiovasculaire.....	7
2.3 Toxicologie mécanistique des effets adverses cardiovasculaires.....	9
2.4 Facteurs de risque .....	13
2.5 Biomarqueurs protéiques de toxicité cardiaque.....	15
3. LA METABONOMIQUE .....	19
3.1 Définition et champs d'application.....	19
3.2 La résonance magnétique nucléaire du proton (1H-RMN).....	19
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>25</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>29</b>
1. STRATEGIE EXPERIMENTALE.....	31
1.1 Choix de molécules d'intérêt .....	31
1.2 Choix du modèle animal.....	31
1.3 Etude métabonomique : choix de la technique.....	33
1.4 Validation des résultats de l'étude métabonomique .....	33
1.5 Protocole expérimental.....	33
2. HEBERGEMENT ET EXPOSITION DES ANIMAUX.....	35
2.1 Conditions d'hébergement.....	35
2.2 Exposition des animaux aux molécules.....	35
2.3 Sacrifice et prélèvements d'organes.....	37
3. MESURE DE PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES .....	39
3.1 Mesure de la tension artérielle .....	39
3.2 Mesure du poids corporel.....	39
3.3 Mesure de la consommation de nourriture et d'eau.....	39
4. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS .....	39
4.1 Prélèvements sanguins.....	39
4.2 Prélèvements d'urine.....	41



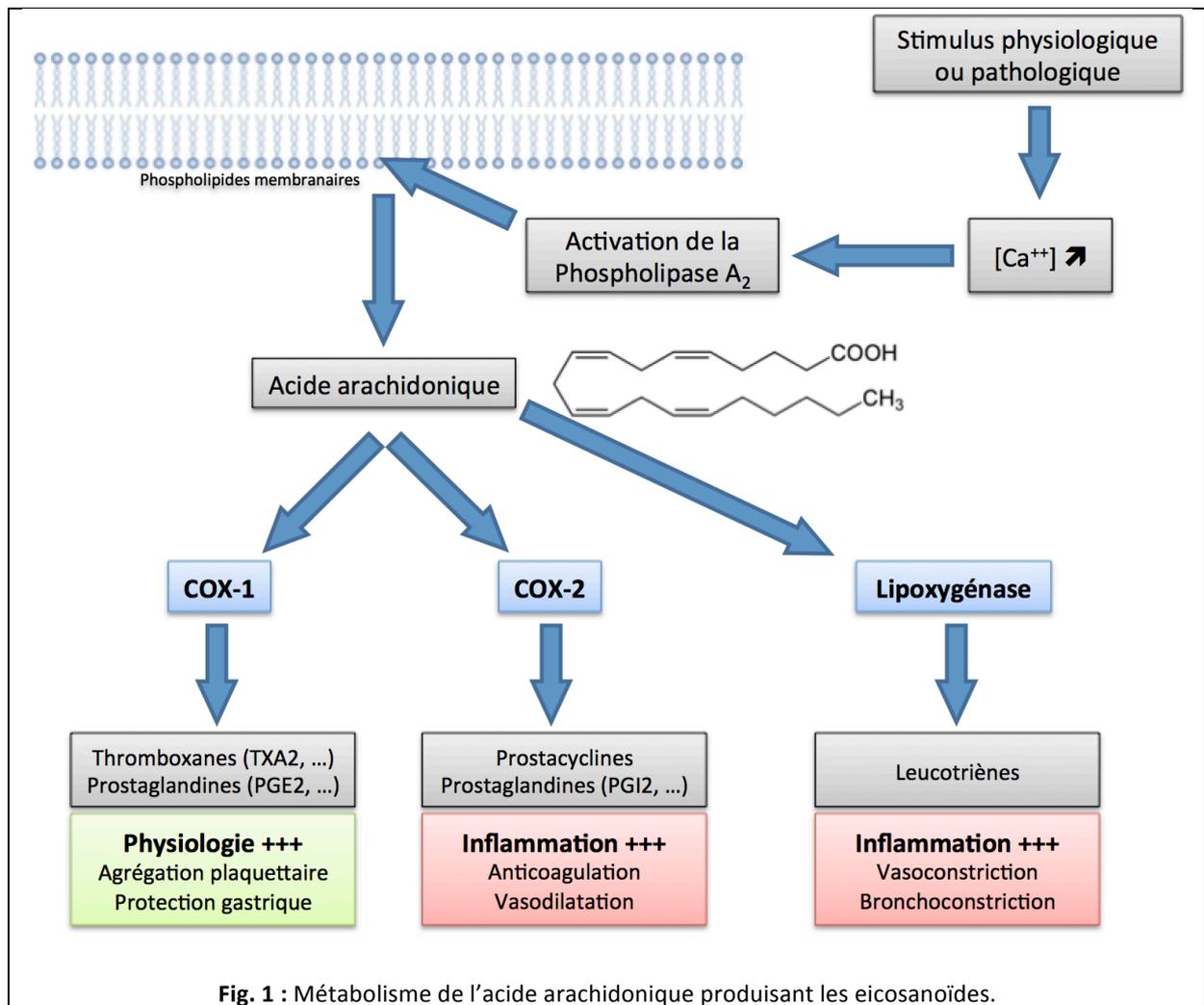
5.	ETUDE METABONOMIQUE .....	41
5.1	<i>Préparation des échantillons</i> .....	41
5.2	<i>Acquisition des spectres</i> .....	41
5.3	<i>Traitement des spectres</i> .....	43
5.4	<i>Analyse multivariée</i> .....	43
5.5	<i>Identification des métabolites</i> .....	45
6.	DOSAGE DES BIOMARQUEURS PROTEIQUES .....	45
6.1	<i>Sélection des échantillons à analyser</i> .....	47
6.2	<i>Protocoles des tests ELISA</i> .....	47
6.3	<i>Détermination de la concentration sérique des protéines</i> .....	47
7.	ETUDE HISTOLOGIQUE .....	47
7.1	<i>Fixation</i> .....	47
7.2	<i>Déshydratation</i> .....	47
7.3	<i>Enrobage dans la paraffine</i> .....	49
7.4	<i>Obtention des coupes</i> .....	49
7.5	<i>Réhydratation</i> .....	49
7.6	<i>Colorations</i> .....	49
8.	STATISTIQUES.....	49
	<b>RESULTATS</b> .....	<b>51</b>
1.	ETUDE SUR RATS SHR EXPOSES AU DICLOFENAC.....	53
1.1	<i>Paramètres physiologiques</i> .....	53
1.2	<i>Dosage des biomarqueurs protéiques de toxicité cardiaque</i> .....	55
1.3	<i>Etude histologique</i> .....	57
1.4	<i>Etude métabonomique sur les urines</i> .....	57
1.5	<i>Etude métabonomique sur les sera</i> .....	63
2.	ETUDE SUR RATS SHR EXPOSES AU ROFECOXIB .....	65
2.1	<i>Paramètres physiologiques</i> .....	65
2.2	<i>Dosage des biomarqueurs protéiques de toxicité cardiaque</i> .....	67
2.3	<i>Etude histologique</i> .....	69
2.4	<i>Etude métabonomique sur les urines</i> .....	71
2.5	<i>Etude métabonomique sur les sera</i> .....	75
3.	ETUDE SUR RATS DAHL/SS EXPOSES AU ROFECOXIB .....	77
3.1	<i>Paramètres physiologiques</i> .....	77
3.2	<i>Etude histologique</i> .....	79
3.3	<i>Etude métabonomique sur les urines</i> .....	79
3.4	<i>Etude métabonomique sur les sera</i> .....	85
4.	SYNTHESE DES CHANGEMENTS METABOLIQUES URINAIRES.....	85



<b>DISCUSSION .....</b>	<b>87</b>
1. EVALUATION DES MODELES D'HYPERTENSION CHRONIQUE .....	89
2. EVALUATION DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES .....	89
2.1 <i>Etude sur les rats SHR exposés au Diclofénac</i> .....	89
2.2 <i>Etude sur les rats SHR exposés au Rofécoxib</i> .....	89
2.3 <i>Etude sur les rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib</i> .....	89
3. EVALUATION DES LESIONS CARDIAQUES PAR DES METHODES CONVENTIONNELLES .....	91
3.1 <i>Mesure de biomarqueurs conventionnels</i> .....	91
3.2 <i>Etude histologique</i> .....	91
4. MODIFICATIONS METABOLIQUES .....	93
4.1 <i>Perturbation des voies énergétiques mitochondriales</i> .....	93
4.2 <i>Augmentation de la synthèse de la créatinine et acidose métabolique</i> .....	95
4.3 <i>Stress oxydatif</i> .....	97
4.4 <i>Altération du métabolisme des purines</i> .....	99
4.5 <i>Protection contre le stress osmotique</i> .....	99
4.6 <i>Perturbation du métabolisme de la phénylalanine</i> .....	101
4.7 <i>Augmentation de la synthèse de glutathion</i> .....	103
4.8 <i>Perturbation du métabolisme de la choline et des amines</i> .....	105
4.9 <i>Putréfaction bactérienne intestinale et lésions gastro-intestinales</i> .....	105
4.10 <i>Contamination bactérienne des échantillons</i> .....	107
5. COMPARAISON ENTRE LES CHANGEMENTS METABOLIQUES DU DICLOFENAC ET DU ROFECOXIB CHEZ LES RATS SHR .....	107
6. COMPARAISON ENTRE LES CHANGEMENTS METABOLIQUES DU ROFECOXIB CHEZ LES RATS SHR ET DAHL/SS .....	107
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>109</b>
1. CONCLUSION .....	111
2. PERSPECTIVES .....	113
2.1 <i>Perspectives à court terme</i> .....	113
2.2 <i>Perspectives à long terme</i> .....	115
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>117</b>



# **INTRODUCTION**



# 1. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens

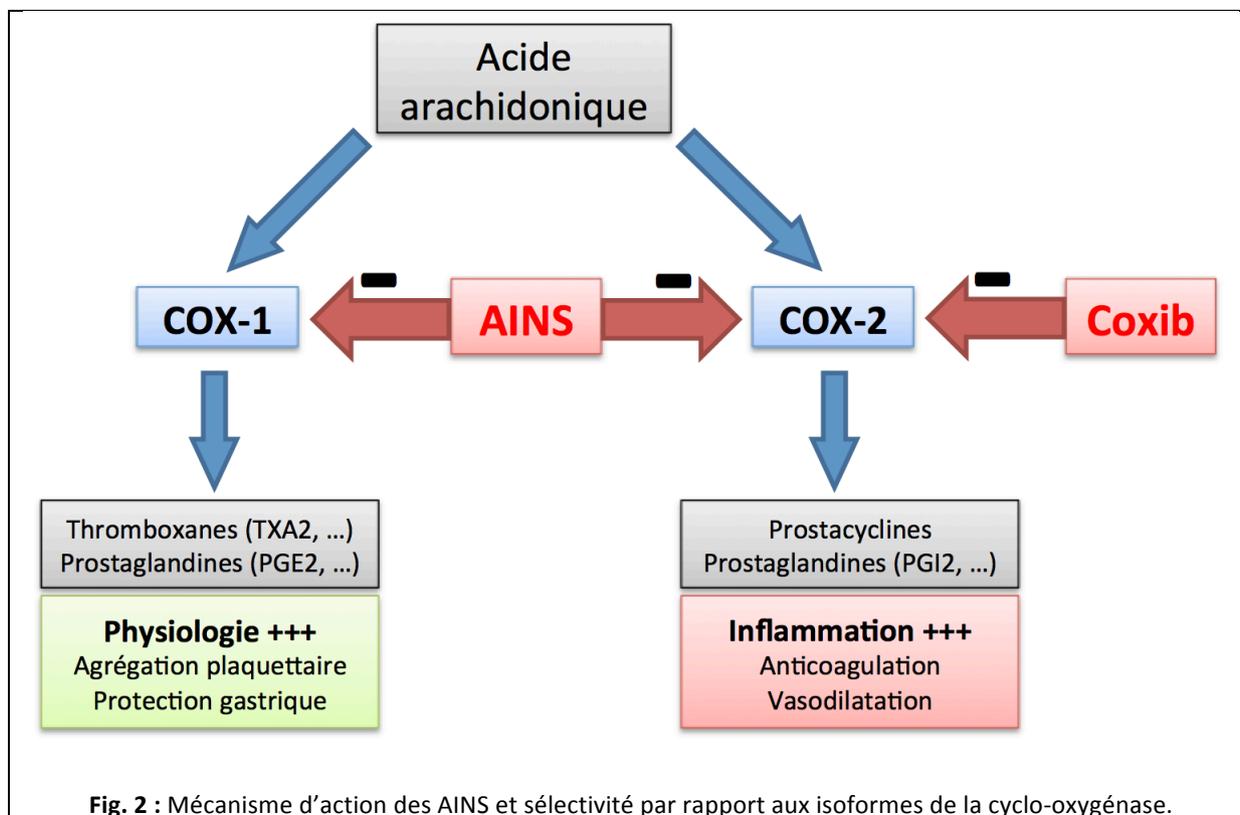
## 1.1 Généralités

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) représentent l'un des groupes de médicaments les plus utilisés, tant par automédication que par prescription médicale (variable selon les pays). Leur emploi est aussi bien indiqué en court terme pour maîtriser une inflammation aiguë qu'en long terme lors de pathologies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde ou l'ostéoarthrite. Outre leur effet anti-inflammatoire, les AINS présentent également des effets antipyrétique et analgésique, ce qui leur confère une utilisation intéressante lors de maladies infectieuses ou lors d'épisodes douloureux. De plus, certains AINS dont l'acide acétylsalicylique montrent une activité d'anti-agrégat plaquettaire, ce qui accroît leur champ d'utilisation thérapeutique (1,2).

## 1.2 Mécanisme d'action

L'utilisation des AINS a pendant longtemps précédé la connaissance de leur mécanisme d'action. A l'heure actuelle, celui-ci est bien connu. Ils inhibent la cyclo-oxygénase, enzyme permettant la synthèse d'eicosanoïdes au départ de l'acide arachidonique (1,2). L'inhibition de la cyclo-oxygénase par les AINS conduit à une réduction de la production de médiateurs inflammatoires, ce qui diminue la réaction inflammatoire. L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé à 20 carbones synthétisé au départ d'acide linoléique apporté par l'alimentation. L'acide arachidonique se retrouve dans les phospholipides des membranes plasmiques de nombreuses cellules de l'organisme. Lors d'un stimulus physiologique ou pathologique, cet acide gras est libéré des phospholipides par la phospholipase A<sub>2</sub> activée par l'augmentation de la concentration calcique intracytoplasmique (Fig. 1). L'acide arachidonique sert de précurseur à la synthèse des eicosanoïdes, médiateurs lipidiques. Cette synthèse se réalise via deux voies enzymatiques principales : la voie de la cyclo-oxygénase et la voie de la lipoxygénase.

La lipoxygénase engendre la formation de leucotriènes dans les globules blancs et est impliquée, entre autres, dans les réactions asthmatiques. La cyclo-oxygénase est une enzyme dont il existe deux isoformes : la cyclo-oxygénase-1 (COX-1) et la cyclo-oxygénase-2 (COX-2). La COX-1 est constitutionnelle, elle intervient principalement dans des processus physiologiques et est exprimée essentiellement dans les plaquettes et l'endothélium vasculaire où elle permet la synthèse de thromboxanes A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) favorisant l'agrégation plaquettaire. Cette isoforme se retrouve également dans le rein et l'estomac où elle régule la sécrétion de mucus protecteur contre l'acidité gastrique via des prostaglandines dont la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).



Sélectivité	Groupes chimiques	Exemples
Non-sélectifs	<b>Acides arylalcanoïques</b>	
	- Hétéro-aryl-acétiques	Diclofénac, Kétorolac
	- Dérivés indoliques	Indométacine, Proglumétacine
	- Dérivés de l'acide arylpropionique	Ibuprofène, Naproxène, Kétoprofène
	<b>Acides arylcarboxyliques</b>	
	- Salicylates	Aspirine, Sulfasalazine
	- Dérivés de l'acide anthranilique	Acide méfénamique
	<b>Acides énoïques</b>	
	- Dérives pyrazolés	Aminopyrine, Métamizole
	- Oxicames	Piroxicam
	- Alkanones	Nabumétone
Sélectifs de la COX-2	<b>Diaryhétérocycles (Coxib)</b>	Célécoxib, Etoricoxib, Rofécoxib

**Tableau 1 :** Classification des AINS selon leur sélectivité pour les isoformes de la COX et selon leur structure chimique.

La COX-2 est inductible, elle intervient principalement dans des processus inflammatoires et est exprimée essentiellement dans l'endothélium vasculaire et dans les globules blancs où elle permet la synthèse de prostacyclines et de prostaglandines dont la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) ayant une action vasodilatatrice et anti-agrégat plaquettaire. En situation physiologique normale, un bas niveau d'eicosanoïdes est produit pour assurer des fonctions physiologiques : équilibre de la coagulation, protection de la muqueuse gastrique, etc... Ceci résulte principalement de l'activité de la COX-1 mais également, dans une moindre mesure, de la COX-2 endothéliale qui permet d'éviter une sur-coagulation. En situation inflammatoire, le taux de prostaglandines augmente de manière importante. Cela engendre des effets pro-inflammatoires tels que la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (1-3).

### **1.3 Classification**

Les AINS peuvent être classés selon leur structure chimique (*tableau 1*) ou selon leur sélectivité (*Fig. 2*) pour l'une des isoformes de la cyclo-oxygénase (1,2) :

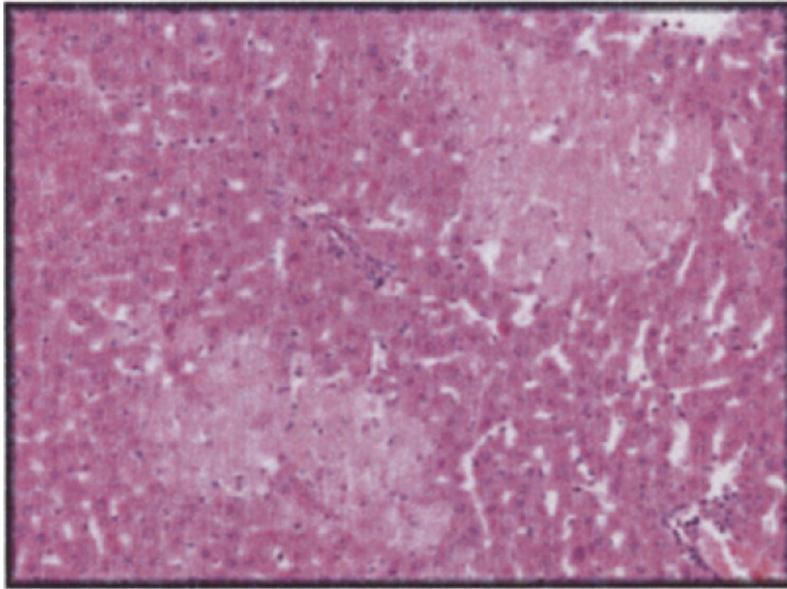
- Les inhibiteurs non-sélectifs : ils inhibent COX-1 et COX-2
- Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 : ils inhibent COX-2 (Coxibs)

Le développement des Coxibs a été motivé d'une part par le fait que la COX-2 est l'isoforme la plus impliquée dans les phénomènes inflammatoires et, d'autre part, par le fait que l'inhibition de COX-1 entraîne des effets toxiques gastro-intestinaux par perturbation de la régulation des sécrétions gastriques. Il est également à souligner que les AINS non-sélectifs peuvent avoir une affinité variable pour l'une des isoformes de COX. Ainsi, certains inhibent davantage COX-1 que COX-2 tandis que d'autres inhibent davantage COX-2 que COX-1. A titre d'exemples, l'Indométacine est connu pour inhiber davantage la COX-1 que la COX-2. A l'inverse, le Diclofénac semble inhiber davantage COX-2 que COX-1 (4).

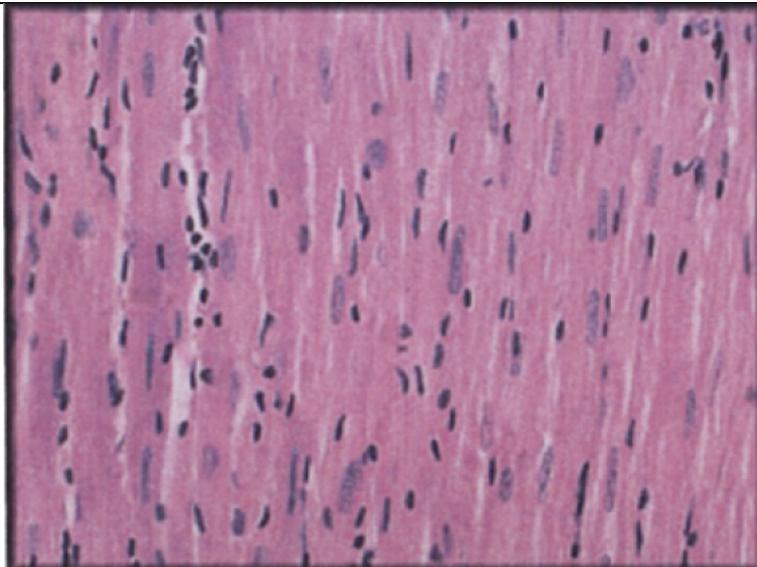
## **2. Toxicologie des AINS**

### **2.1 Effets adverses principaux**

Les AINS induisent plusieurs effets toxiques sur différents organes (1). L'effet le plus connu et fréquent atteint le système gastro-intestinal. Cet effet se manifeste essentiellement par des ulcérations gastro-duodénales responsables de douleurs épigastriques et de saignements digestifs. Le mécanisme toxique sous-jacent semble être l'inhibition de la COX-1 dont le rôle est important dans la régulation des sécrétions gastriques et la protection de la muqueuse stomacale contre l'acidité provoquée par les sécrétions d'acide chlorhydrique produit par les glandes gastriques.



**Fig. 3** : Nécrose de coagulation hépatique chez un rat exposé au Diclofénac par voie intrapéritonéale, après 28 jours d'exposition (5).



**Fig. 4** : Infiltrat lymphocytaire cardiaque chez un rat exposé au Diclofénac par voie orale, après 7 jours d'exposition (5).

Des effets toxiques rénaux peuvent également être rencontrés parmi les utilisateurs d'AINS.

Les principales atteintes sont :

- Défaillance rénale aiguë ou chronique
- Diminution de la filtration glomérulaire
- Nécrose des papilles rénales
- Syndrome néphrotique avec néphrite interstitielle
- Rétention électrolytique et hydrique

Les AINS présentent aussi une toxicité hépatique pouvant se manifester sous différentes formes, variable selon la molécule (*Fig. 3*) :

- Hépatite aiguë
- Hépatite chronique
- Cholestase
- Ductopénie

L'incidence de ces effets hépatiques est cependant faible à modérée.

## **2.2 Toxicité cardiovasculaire**

La toxicité cardiovasculaire des AINS regroupe 3 manifestations principales :

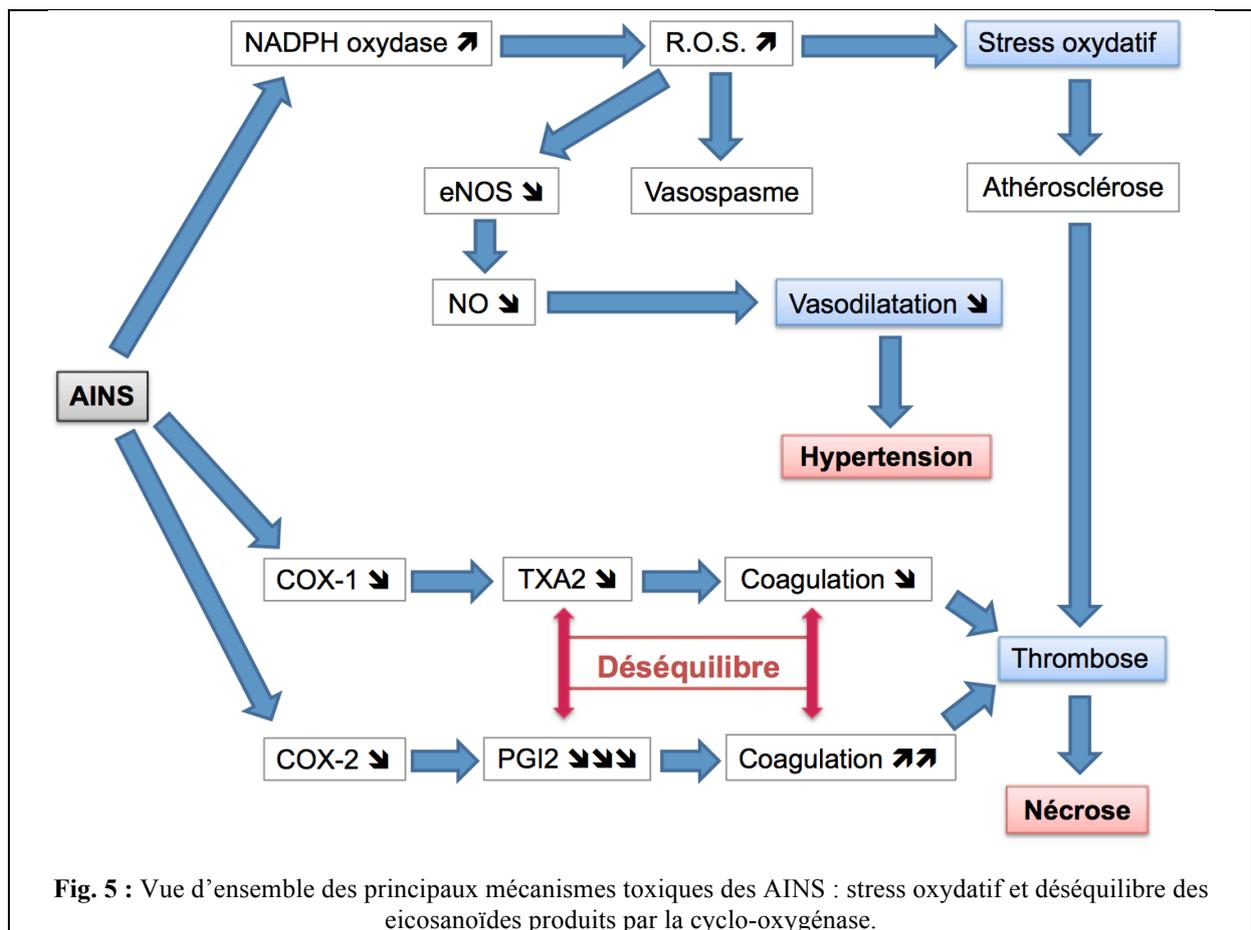
- Nécrose du myocarde (*Fig. 4*)
- Hypertension
- Fibrillation auriculaire

Au regard de la littérature, les AINS les plus toxiques au niveau cardiovasculaire semblent être le Diclofénac, l'Ibuprofène et les Coxibs, plus particulièrement le Rofécocib, le Célécoxib et l'Etoricoxib (3,6–11). Le Naproxène semble être le plus sûr au niveau cardiovasculaire. Il est cependant difficile d'extrapoler cette toxicité au reste des AINS en raison du manque d'études concernant les autres molécules de cette classe pharmacologique. En effet, la littérature offre une abondance de documentation à propos des Coxibs et des AINS traditionnels les plus utilisés mais est relativement pauvre en informations concernant les AINS plus anciens ou moins utilisés. La toxicité cardiaque des AINS semble dépendre de la dose et de la fréquence de prises. L'influence de la durée du traitement est sujette à controverse. En effet, certaines études objectivent une augmentation de la toxicité dans les traitements à long terme alors que d'autres font mention de cas rencontrés lors de traitements de courte durée. Bien que potentiellement sévères, les effets toxiques cardiaques des AINS considérés demeurent peu fréquents.

Molécule	Nécrose cardiaque	Hypertension	Fibrillation auriculaire
<b><u>AINS non sélectifs</u></b>			
Diclofénac	+++	++	+++
Ibuprofène	+	+++	?
Naproxène	+/-	?	?
<b><u>Coxibs</u></b>			
Rofécoxib	+++	+++	?
Célécoxib	+++	+	?
Valdécoxib	+++	?	?
Lumiracoxib	+	?	?
Etoricoxib	+	?	?

? = manque d'information dans la littérature

**Tableau 2 :** Synthèse des effets adverses cardiovasculaires de certains AINS.



Sur base d'études de comparaison et de méta-analyses, les AINS les plus toxiques mentionnés ci-dessus peuvent être classés selon leur(s) effet(s) adverse(s) le(s) plus important(s) (*Tableau 2*) :

- Nécrose du myocarde : Diclofénac, Rofécoxib, Célécoxib, Ibuprofène, Lumiracoxib (1,8)
- Hypertension : Rofécoxib, Ibuprofène, Diclofénac (12–14)
- Fibrillation auriculaire : Diclofénac (15)

Il est important de souligner qu'il est difficile d'établir ce classement en raison d'une certaine hétérogénéité dans les études considérées (groupes de patients différents selon l'existence de facteurs de comorbidité, de la prise simultanée d'aspirine, le type de posologie, la durée du suivi, etc). Dès lors, l'interprétation de ces résultats doit être réalisée avec réserve. Il est de plus difficile d'intégrer à ce classement l'étude de la fibrillation auriculaire, en raison du manque de données disponibles dans certaines études.

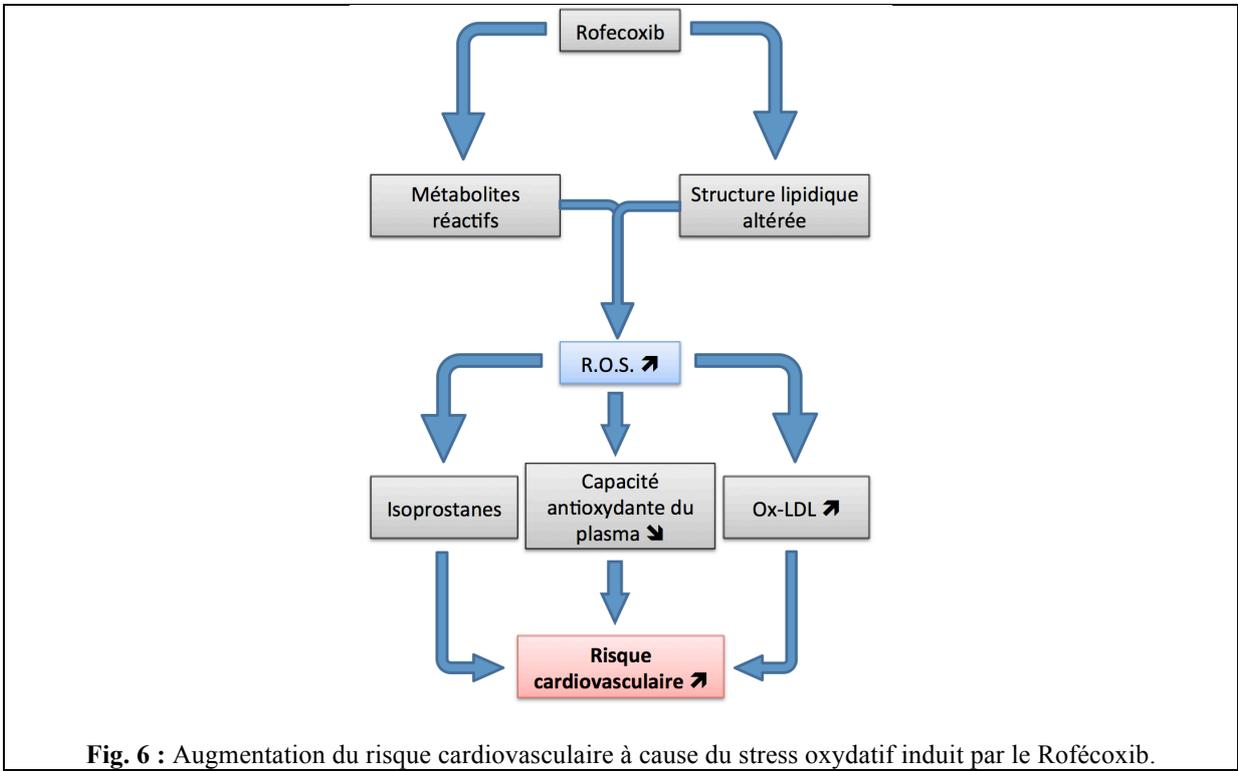
### **2.3 Toxicologie mécanistique des effets adverses cardiovasculaires**

Plusieurs mécanismes toxiques sont suspectés pour expliquer l'effet des AINS au niveau cardiovasculaire :

- Nécrose du myocarde par stress oxydatif
- Nécrose du myocarde par thrombose
- Hypertension par diminution de la production d'oxyde nitrique (NO)
- Hypertension par rétention d'eau (perturbation électrolytique) et diminution de prostaglandines vasodilatatrices
- Fibrillation auriculaire induite par la perturbation électrolytique
- Fibrillation auriculaire induite par perturbation de canaux ioniques cardiaques

#### **2.3.1 Stress oxydatif et diminution de la production de NO**

Une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) après administration de Naproxène, Diclofénac, Rofécoxib et Célécoxib dans l'aorte et le cœur de rats spontanément hypertendus ainsi qu'une diminution de la production de NO, un facteur vasodilatateur endogène puissant ont été mises en évidence (16). Il est suggéré que le stress oxydatif engendré par les ROS pourrait être responsable de nécrose cardiaque (*Fig. 5*). En effet, les taux de NADPH oxydase vasculaire et de nitrotyrosine (marqueur d'oxydation par les ROS) augmentent après administration de ces AINS et plus particulièrement après administration du Diclofénac et du Naproxène. En outre, cette étude montre également une perturbation de la synthèse du NO par la NO synthase endothéliale (eNOS), ce qui suggère que la diminution de la vasodilatation induite par le NO pourrait être responsable de l'hypertension provoquée par ces AINS.



**Fig. 6 :** Augmentation du risque cardiovasculaire à cause du stress oxydatif induit par le Rofécocixib.

En outre, l'accumulation d'acide arachidonique, dont la biotransformation est ralentie par l'inhibition de COX, pourrait être responsable d'une diminution de l'activité de la phosphorylation oxydative mitochondriale, favorisant la production de ROS par augmentation de l'oxygène servant de substrat à cette production (3).

Le Célécoxib semble avoir également une action contraire sur le stress oxydatif en diminuant la production de ROS chez des rats DAHL/Salt sensitive (13).

Le Rofécoxib est suspecté d'induire une susceptibilité des LDL et des lipides membranaires aux dommages oxydatifs (17). Il a été démontré, *in vitro*, l'augmentation du taux d'ox-LDL après exposition de LDL d'origine humaine au Rofécoxib (Fig. 6). Les ox-LDL semblent jouer un rôle important dans la formation des plaques d'athérome et des cellules spumeuses. Le taux de peroxydes lipidiques augmente également après exposition de vésicules lipidiques de composition proche des membranes biologiques au Rofécoxib. L'acide arachidonique est un substrat de la formation non-enzymatique d'isoprostanes, médiateurs à effet pro-inflammatoire. De plus, la capacité antioxydante du plasma, mesurée par l'indice ORAC, diminue après administration de Rofécoxib. Ces 3 phénomènes contribuent à favoriser le développement de plaques d'athérosclérose, augmentant le risque d'infarctus du myocarde. Il est à noter que cette peroxydation lipidique est le fruit d'un métabolite réactif formé au départ du Rofécoxib par voie non-enzymatique en présence d'eau et d'oxygène.

### 2.3.2 Augmentation de risque de thrombose

La nécrose myocardique par thrombose pourrait s'expliquer par le déséquilibre de la production d'eicosanoïdes pro-coagulants (thromboxanes produites par la COX-1) et d'eicosanoïdes anticoagulants (prostacyclines produites par la COX-2) (18). Les thromboxanes sont produites par la COX-1 essentiellement dans les plaquettes et ont un rôle important dans la formation de l'agrégat plaquettaire. Les Coxibs tendent à diminuer la production de prostacyclines à action anticoagulante sans diminuer le taux de thromboxanes. Il en résulte un déséquilibre en faveur de médiateurs pro-coagulants, ce qui augmenterait le risque d'infarctus du myocarde (Fig. 5). Plusieurs Coxibs ont été retirés du marché suite à des effets cardiovasculaires plus prononcés. Le même raisonnement pourrait expliquer la toxicité des AINS non-sélectifs, dont l'affinité pour les isoformes de COX peut être différente. A titre de contre-exemple, l'aspirine possède un effet anticoagulant qui pourrait être cardioprotecteur. Cet effet pourrait s'expliquer par une plus grande affinité de l'aspirine pour COX-1, ce qui provoquerait un déséquilibre en faveur des médiateurs anticoagulants.

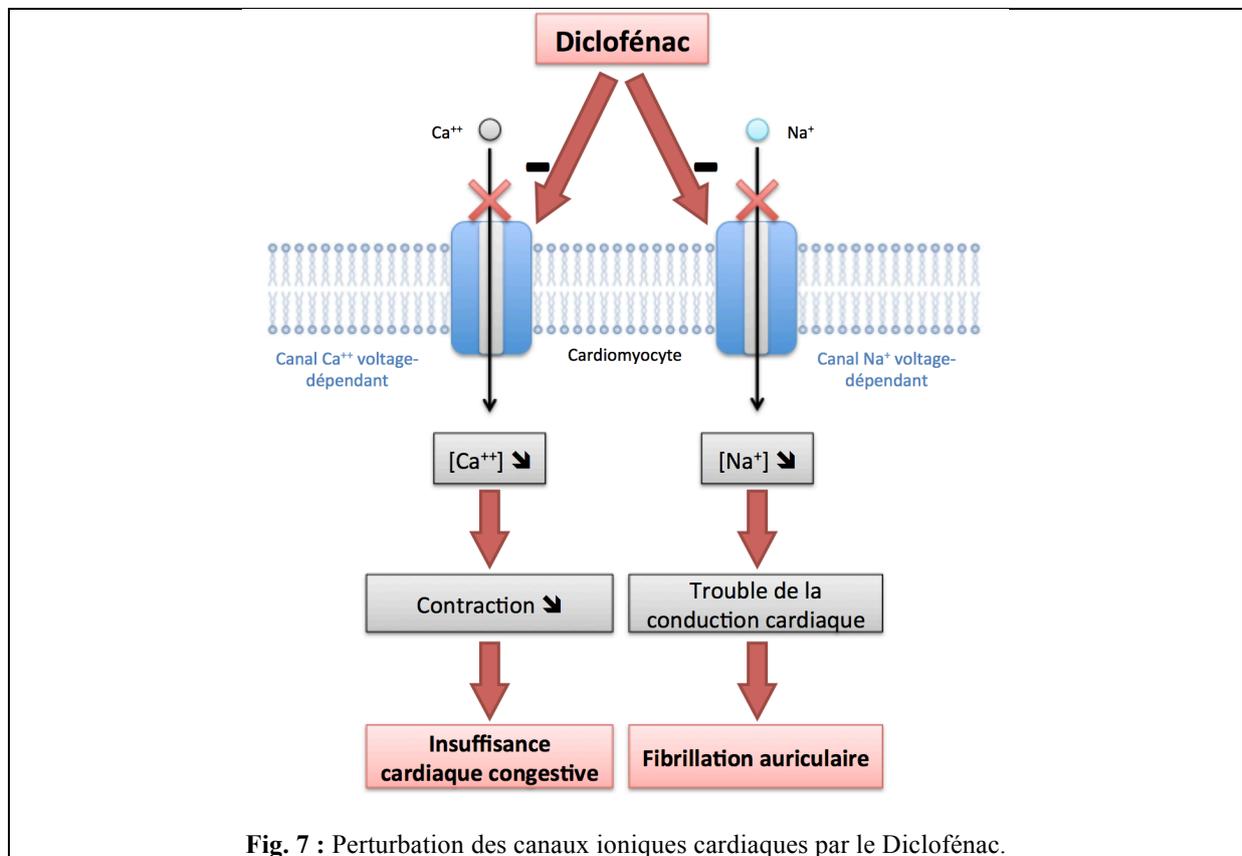


Fig. 7 : Perturbation des canaux ioniques cardiaques par le Diclofenac.

### 2.3.3 Perturbation hydro-électrolytique

Les AINS semblent induire une perturbation électrolytique et une rétention hydrique favorisant l'apparition d'hypertension ou de fibrillation auriculaire. Cette hypothèse soutient l'idée qu'une action combinée sur les reins et le cœur pourrait être responsable de la fibrillation et qu'une action combinée sur les reins et la paroi artérielle pourrait engendrer l'hypertension observée avec certains AINS (19). En effet, la rétention hydroélectrolytique provoque une augmentation de la volémie, ce qui se traduit par une augmentation de la pression artérielle. De même, l'inhibition de la synthèse d'eicosanoïdes à action vasodilatatrice tend à empêcher l'adaptation du diamètre de la lumière artérielle face à l'augmentation de la volémie. En outre, l'acide arachidonique, n'étant plus métabolisé par la voie de la cyclo-oxygénase, s'accumule et provoque une augmentation de la production des produits de la voie de lipoxygénase (3). Les leucotriènes produits par cette voie ont une action de vasoconstriction, celle-ci favorisant à son tour l'hypertension.

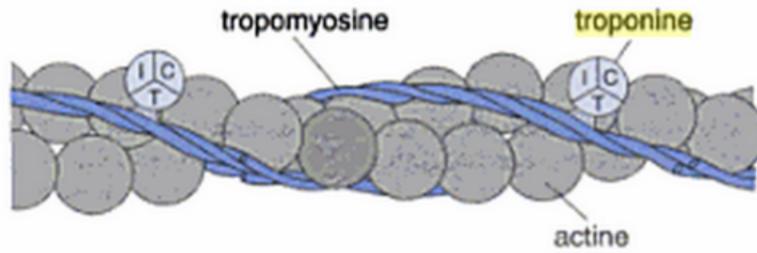
### 2.3.4 Perturbation de canaux ioniques

Le Diclofénac est suspecté d'induire une perturbation de certains canaux ioniques dans les cardiomyocytes. Cela pourrait engendrer des troubles du rythme ainsi qu'une baisse de la contraction cardiaque (15). Après administration de Diclofénac dans une culture de cardiomyocytes extraits de cœur de rats nouveau-nés, l'enregistrement des courants ioniques au travers de la membrane plasmique montre une perturbation de ces courants après stimulation par dépolarisation graduelle. L'étude met en évidence une action inhibitrice réversible du Diclofénac sur les canaux sodiques voltage-dépendants, résultant en une altération de la conduction cardiaque pouvant expliquer le risque de fibrillation auriculaire. De plus, l'étude montre une action inhibitrice irréversible sur les canaux calciques de type L, résultant en une diminution de la contraction cardiaque pouvant entraîner une insuffisance cardiaque congestive (Fig. 7).

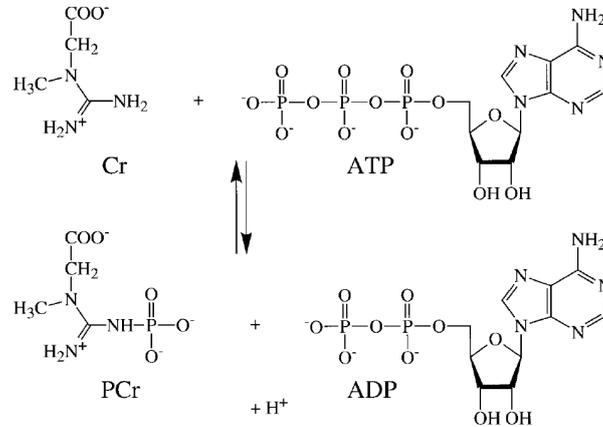
## **2.4 Facteurs de risque**

Certaines conditions pathologiques augmentent le risque de toxicité cardiovasculaire des AINS (11,16,20–22). Certaines sont des facteurs de risque prédisposant à l'infarctus du myocarde :

- Hypertension
- Antécédents cardiovasculaires
- Maladie coronarienne
- Autres facteurs de risque cardiovasculaires (diabète, tabagisme chronique, sédentarité, obésité, etc.)



**Fig. 8** : Schéma représentant l'arrangement du complexe formé des troponines C, I, T, de la tropomyosine et de l'actine (23). Au repos, la troponine I inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine, empêchant ainsi la contraction du sarcomère.



**Fig. 9** : Schéma représentant la réaction de phosphorylation de la créatine catalysée par la créatine kinase (24).

D'autres augmentent le risque de fibrillation auriculaire :

- Insuffisance cardiaque
- Problèmes rénaux induisant des troubles électrolytiques

Des facteurs de risque d'origine génétique semblent également être impliqués dans la prédisposition de certains patients à présenter des effets adverses après administration d'AINS. Des polymorphismes du gène CYP2C9 impliqué dans la métabolisation de certains Coxibs pourraient expliquer une susceptibilité accrue liée à une clairance diminuée du médicament (9). De même, des polymorphismes au niveau du promoteur du gène COX-2 pourraient avoir un impact sur la sensibilité des individus à ces effets adverses cardiovasculaires

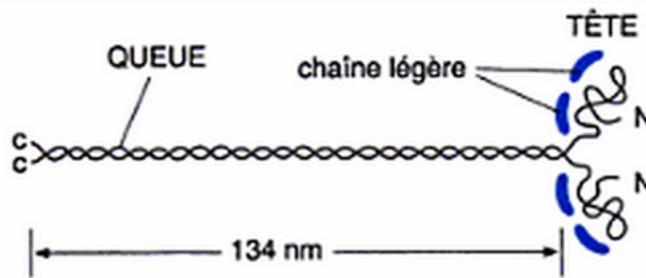
## 2.5 Biomarqueurs protéiques de toxicité cardiaque

Différents biomarqueurs sont actuellement utilisés en clinique pour le diagnostic et le suivi d'infarctus du myocarde ainsi qu'en toxicologie pour la détection de nécrose cardiaque (25,26). Ces biomarqueurs sont des protéines intra-cytoplasmiques des cardiomyocytes. Lors d'une nécrose myocardique, ces différentes protéines sont libérées dans la circulation sanguine et peuvent être détectées dans un échantillon de sang. Certaines de ces protéines sont spécifiques du myocarde alors que d'autres se retrouvent dans des tissus extracardiaques et peuvent donc être détectées lors de phénomènes pathologiques non-cardiaques.

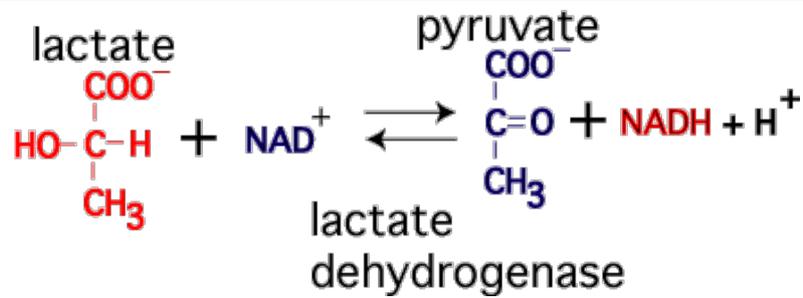
### 2.5.1 Biomarqueurs spécifiques

Il existe plusieurs protéines spécifiques de nécrose cardiaque (25,26) :

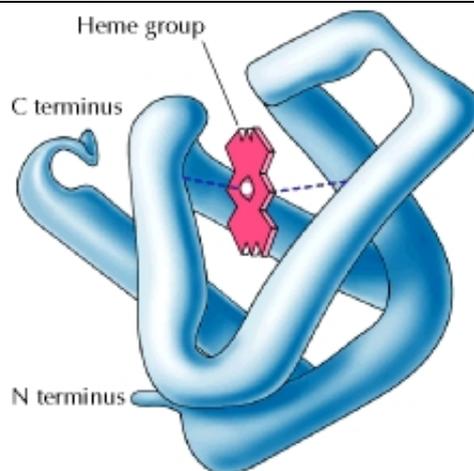
- Les troponines myocardiques (Fig. 8) : Il existe des isoformes des troponines I et T qui sont spécifiques du myocarde. Leur concentration sérique augmente 2 à 4 heures après une nécrose et reste élevée pendant 5 à 9 jours chez l'homme. Ces troponines constituent donc un marqueur précoce de nécrose myocardique. La concentration sérique normale chez un sujet sain est inférieure à 0,01 µg/L. Les troponines sont dosées par des techniques immunologiques telles que l'ECLIA (Electrochemiluminescence immunoassay) en sandwich ou des kits ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).
- La créatine kinase-MB (Fig. 9) : Cette isoforme myocardique de la créatine kinase est le biomarqueur le plus précoce de la nécrose myocardique. En effet, sa concentration sérique double 30 minutes post nécrose et est détectable 3 à 8 h post nécrose. La concentration sérique en conditions non-pathologiques est inférieure à 10,5 ng/ml chez l'homme. Le dosage de la créatine kinase-MB s'effectue par test ECLIA en sandwich ou par spectrophotométrie. Cette dernière technique ne permet pas de discerner



**Fig. 10** : Schéma représentant la structure de la myosine II : deux chaînes lourdes enroulées et quatre chaînes légères (23).



**Fig. 11** : Schéma représentant la réaction d'oxydation du lactate en pyruvate catalysée par la lactate déshydrogénase (27).



**Fig. 12** : Représentation de la structure tridimensionnelle de la myoglobine, protéine de 153 résidus impliquée dans le transport de l'oxygène dans le muscle strié squelettique et dans le muscle strié cardiaque (28).

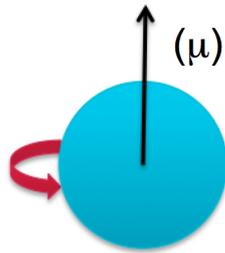
l'isoforme myocardique sans utiliser une technique spécifique de neutralisation par acide.

- La CMLC-1 (cardiac myosin light chain-1) (*Fig. 10*) : Cette isoforme myocardique de la chaîne légère de la myosine est spécifique d'une nécrose myocardique et est dosée par test ELISA.
- La FABP (fatty acid binding protein) : Cette protéine lie des acides gras à longue chaîne dans le cytoplasme. Il existe une isoforme spécifique du myocarde dont la concentration sérique augmente dans les 3 heures post-infarctus pour revenir à la normale dans les 12 à 24 heures. Le dosage de ce biomarqueur s'effectue par test ELISA.

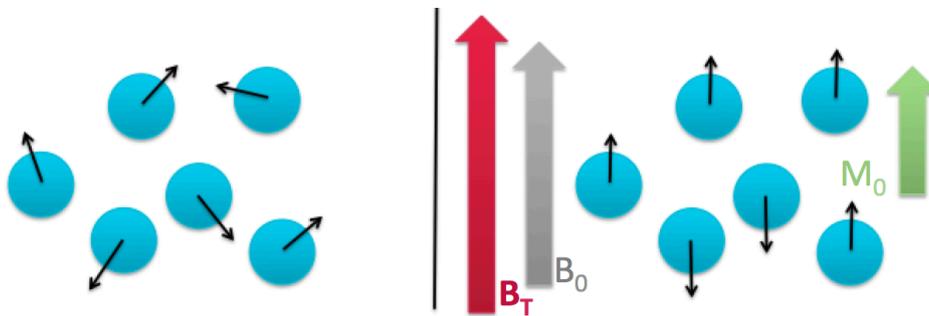
### 2.5.2 *Biomarqueurs non-spécifiques*

D'autres biomarqueurs peuvent témoigner d'une nécrose myocardique sans toutefois être spécifiques de ce phénomène (*25,26*) :

- La lactate déshydrogénase (LD) : Cette enzyme est responsable de la réduction réversible du pyruvate en lactate, consommant du  $\text{NADH}/\text{H}^+$  (*Fig. 11*). La concentration sérique atteint son maximum 72 heures post-infarctus. La concentration normale chez l'homme est de 249-413 UI/L. Le dosage s'effectue par mesure de l'activité enzymatique par spectrophotométrie ou par test ELISA. Une augmentation sérique de LD peut aussi se rencontrer lors de myopathie ou d'hémolyse.
- L'aspartate amino-transférase (AST) : La concentration sérique de cette transaminase augmente 6 à 8 heures post-nécrose pour arriver à un maximum à 24 – 36 heures. La valeur normale est inférieure à 40 U/L chez l'homme et 35 U/L chez la femme. Le dosage de cette enzyme s'effectue par spectrophotométrie ou par test ELISA.
- La myoglobine : Cette protéine de liaison à l'oxygène se retrouve dans le tissu musculaire strié cardiaque et dans le tissu musculaire strié squelettique (*Fig. 12*). Elle est libérée précocement après une nécrose myocardique et est détectable dans les 3 heures post-infarctus avec un pic à 8 – 12 heures. La myoglobine est sécrétée dans les urines. Sa concentration sérique peut donc augmenter en cas d'insuffisance rénale. La concentration normale est inférieure à 85 ng/ml chez l'homme. Le dosage s'effectue par test ECLIA en sandwich ou par test ELISA.



**Fig. 13** : Représentation du moment magnétique  $\mu$  d'un atome dû à la rotation de celui-ci sur lui-même (spin).



**Fig. 14** : Représentation du comportement des moments magnétiques  $\mu$  des atomes d'hydrogène. A gauche : en l'absence de champ magnétique extérieur, les  $\mu$  sont orientés aléatoirement. A droite : si un champ magnétique extérieur  $B_0$  non-nul est appliqué, les  $\mu$  sont alors alignés de manière parallèle et antiparallèle à  $B_0$ , leur résultante  $M_0$  devenant non-nulle et s'additionnant à  $B_0$  pour former  $B_T$  (champ magnétique total).

### 3. La métabonomique

#### 3.1 Définition et champs d'application

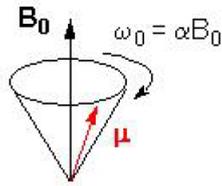
La métabonomique est une discipline étudiant les variations qualitatives et quantitatives de l'ensemble des métabolites d'un système vivant au cours d'un événement physiologique, pathologique ou d'une administration d'une substance exogène (29,30). Ce système peut être un organisme entier, un organe, un tissu, des cellules en culture. L'analyse est effectuée sur un biofluide tel que le sang, l'urine, la salive, un milieu de culture cellulaire, ou sur une biopsie (31,32). Il s'agit donc d'une analyse globale générant un grand nombre de données nécessitant l'utilisation de techniques d'analyses spécifiques, comme l'analyse multivariée. Cette dernière permet de mettre en évidence des tendances de regroupement des échantillons facilitant la détermination d'une signature métabolique caractéristique de l'événement ainsi que son éventuelle évolution au cours de l'événement. L'identification des métabolites se réalise par spectroscopie, très souvent par résonance magnétique nucléaire du proton (<sup>1</sup>H-RMN) ou par spectrométrie de masse. Ces technologies présentent des avantages et des inconvénients ce qui explique que leur utilisation conjointe tend récemment à se généraliser quand cela est logistiquement réalisable. La métabonomique est applicable dans de nombreux domaines biomédicaux, parmi lesquels les études précliniques (33), les études cliniques, le diagnostic et le suivi de pathologies.

#### 3.2 La résonance magnétique nucléaire du proton (1H-RMN)

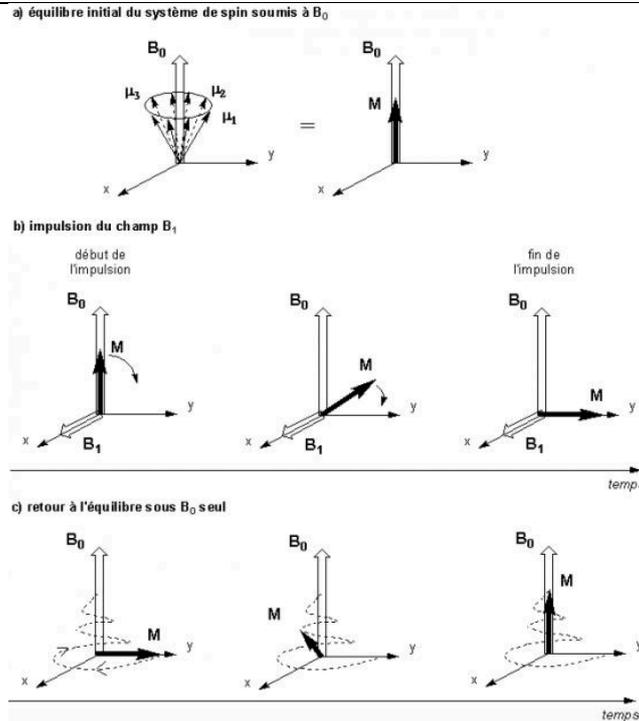
##### 3.2.1 Principe de base

La résonance magnétique nucléaire est basée sur les propriétés de certains noyaux possédant un spin non-nul (34). Ce spin correspond à une rotation du noyau sur lui-même, générant un moment magnétique  $\mu$  vu que le noyau est chargé positivement (Fig. 13). Le moment magnétique  $\mu$  est relié au moment angulaire  $I$  du noyau décrit par le spin par l'équation suivante :  $\mu = \gamma I$  où  $\gamma$  est la constante gyromagnétique du noyau.

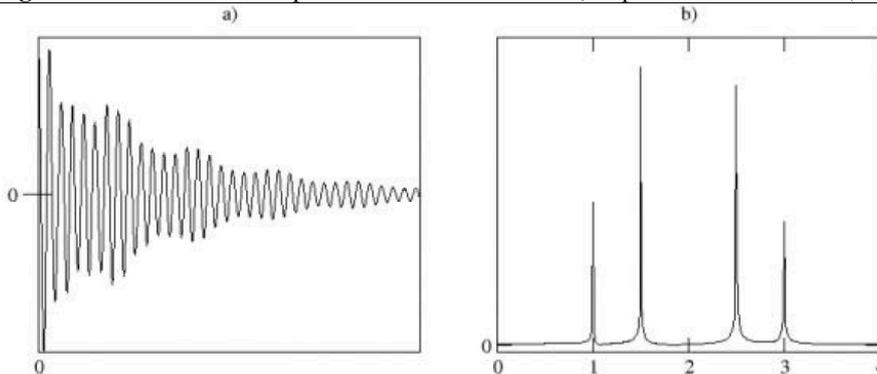
La <sup>1</sup>H-RMN est basée sur les propriétés magnétiques du noyau d'hydrogène, possédant un spin non-nul demi-entier égal à 1/2. En l'absence de champ magnétique extérieur  $B_0$ , les moments magnétiques  $\mu$  des noyaux d'hydrogène sont orientés aléatoirement, leur résultante magnétique  $M_0$  étant alors nulle. Si ces noyaux sont placés dans un champ magnétique extérieur  $B_0$  non-nul, les moments magnétiques  $\mu$  s'alignent dans l'axe de  $B_0$ ,  $M_0$  devenant alors non-nulle. Cet alignement se fait de manière parallèle ou antiparallèle par rapport à la direction de  $B_0$ . La distribution de la population de  $\mu$  entre ces 2 états énergétiquement différents se réalise selon la distribution de Boltzmann (Fig. 14).



**Fig. 15 :** Représentation du mouvement de précession du moment magnétique  $\mu$  autour du champ magnétique extérieur  $B_0$ . La fréquence de ce mouvement est appelée fréquence de Larmor  $\omega_0$  et est proportionnelle à  $B_0$  (34).



**Fig. 16 :** Illustration de l'expérience RMN : état initial, impulsion et relaxation (34).



**Fig. 17 :** La transformée de Fourier permet de passer du FID (à gauche) au spectre RMN exprimé selon les fréquences de résonance des protons (à droite). (34).

$$\delta = \frac{\text{fréquence de résonance} - \text{fréquence de résonance de la référence}}{\text{fréquence du spectromètre}} * 10^6$$

**Fig. 18 :** Formule permettant de passer d'un spectre RMN exprimé en fréquences réelles, dépendantes de l'intensité du champ magnétique  $B_0$  employée, à un spectre RMN exprimé en ppm, indépendant de l'intensité de  $B_0$ .

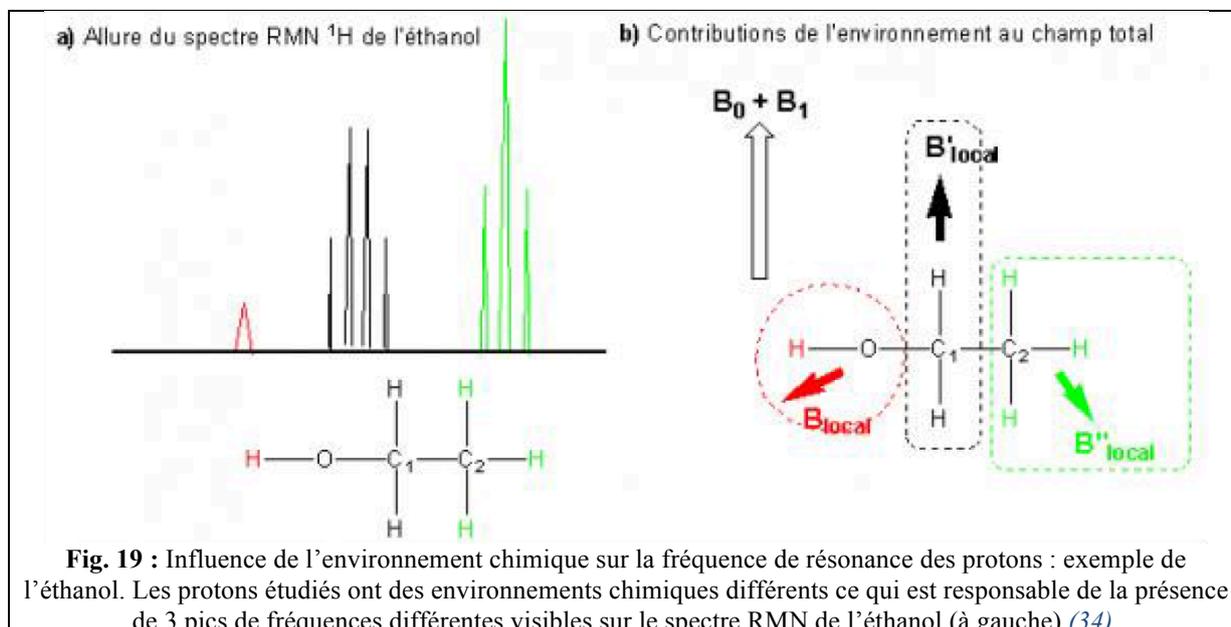
Il en résulte un nombre plus grand de  $\mu$  alignés parallèlement (état énergétique inférieur), ce qui est responsable de la résultante  $M_0$  non-nulle. Les moments magnétiques  $\mu$  ne sont pas parfaitement alignés selon  $B_0$  et tournent autour de l'axe décrit par  $B_0$ , réalisant un mouvement de précession. La fréquence de ce mouvement de précession est appelée fréquence de Larmor  $\omega_0$  et est proportionnelle à  $B_0$  (Fig. 15).

Lorsqu'une onde électromagnétique de fréquence égale à  $\omega_0$  est appliquée à un angle de  $90^\circ$  par rapport à l'axe de  $B_0$ , un phénomène de résonance a lieu : les mouvements de précession des  $\mu$  entrent en phase et les  $\mu$  basculent de  $90^\circ$  dans le plan XY perpendiculaire à  $B_0$ . Il en résulte un champ magnétique dans le plan XY, appelé  $M_{XY}$ , tandis que  $M_0$  devient nulle (Fig. 16). Etant donné que les  $\mu$  décrivent une rotation synchronisée perpendiculaire à l'axe de  $B_0$ ,  $M_{XX}$  est en réalité une onde électromagnétique dont la fréquence est égale à  $\omega_0$ . Ce signal est mesurable par une antenne. Lorsque l'émission de l'onde électromagnétique est arrêtée, le système tend à retourner vers son état énergétique de départ. Ce phénomène s'appelle la relaxation. Les  $\mu$  se déphasent progressivement, provoquant l'annulation de  $M_{XY}$ , et retournent à leur position initiale, ce qui est responsable du retour de  $M_0$  à sa valeur de départ (Fig. 16). L'augmentation de  $M_0$  se réalise selon T1, constante de temps nécessaire pour que  $M_0$  retrouve 63 % de sa valeur initiale.

La diminution de  $M_{XY}$  se réalise selon T2, constante de temps correspondant au temps nécessaire pour que  $M_{XY}$  revienne à 37 % de sa valeur initiale. Cette diminution est mesurable car elle est perpendiculaire à  $B_0$  et n'est donc pas incluse dans le champ magnétique externe.

### 3.2.2 Le spectre RMN

Le signal brut mesuré, correspondant à la décroissance de  $M_{XY}$ , est appelé FID (Free induction decay). En fonction de l'environnement chimique, les protons ne perçoivent pas le champ magnétique  $B_0$  de façon identique (34). La densité électronique présente dans le voisinage d'un proton peut augmenter ou diminuer localement l'intensité de  $B_0$ . Etant donné que la fréquence de résonance du proton est proportionnelle à l'intensité du champ, celle-ci est donc également modifiée par l'environnement électronique. Ce phénomène est appelé le déplacement chimique. Le signal mesuré est donc une somme de plusieurs signaux de fréquences différentes. La transformée de Fourier permet d'obtenir, au départ du FID, le spectre RMN représentant les différentes fréquences de résonance des protons étudiés (Fig. 17). Le spectre est calibré via une molécule de référence, le triméthylsilyl propionate (TSP), permettant d'exprimer les fréquences de résonance en part par million (ppm) indépendamment de la fréquence du spectromètre dépendant du champ magnétique  $B_0$  (Fig. 18).



Cela offre l'avantage d'obtenir le même spectre à partir de 2 spectromètres de fréquence différente. Le spectre RMN décrit plusieurs informations nécessaires à l'identification des métabolites :

- La position des pics sur le spectre : Une molécule définie peut avoir un ou plusieurs pics de résonance à des fréquences différentes, en fonction de l'environnement chimique des noyaux d'hydrogène constituant la molécule (*Fig. 19*).
- La multiplicité des pics : Une molécule définie peut présenter un pic simple ou multiple à une fréquence définie. Cette multiplicité dépend de l'environnement chimique du proton et plus particulièrement du nombre d'atomes de carbone voisins.

Ces données sont comparées à des bases de données permettant d'identifier les métabolites de l'échantillon analysé.

L'intensité des pics renseigne sur la concentration de la molécule. En effet, plus un composé chimique est concentré, plus le signal de résonance émis est intense.

### *3.2.3 Avantages et inconvénients*

La  $^1\text{H}$ -RMN offre certains avantages (*29,35*) :

- Technique non-sélective
- Technique non-destructrice de l'échantillon de départ
- Préparation limitée des échantillons
- Analyse rapide
- Haute résolution

Cependant, cette technique présente aussi des inconvénients (*29,35*) :

- Spectres complexes et difficiles à interpréter
- Banque de données des spectres incomplètes
- Sensibilité peu élevée



# **OBJECTIFS**



Le Rofécoxib, commercialisé en 1999 sous la dénomination commerciale de Vioxx™, a été retiré du marché mondial en 2004 en raison d'effets toxiques cardiaques. Cet exemple est particulièrement intéressant car il montre que les études toxicologiques en phase préclinique du développement du médicament ainsi que les premières phases des études cliniques n'ont pas détecté cette toxicité cardiaque. Seule la pharmacovigilance a permis d'objectiver ces effets indésirables, au prix de 27 785 décès potentiellement attribuables à ce médicament (36). L'élaboration d'une méthode plus sensible pour détecter ces effets indésirables semble être essentielle afin d'améliorer les performances des études toxicologiques précliniques et d'optimiser au mieux le développement de nouvelles molécules pharmaceutiques sûres.

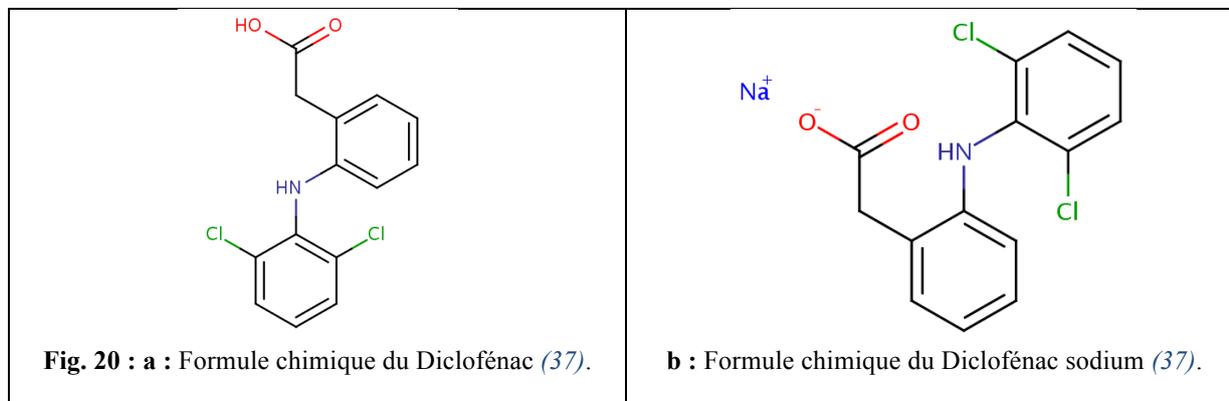
L'objectif de ce travail consiste en l'identification de biomarqueurs précoces de nécrose cardiaque induite par les AINS. Cette identification est basée sur une analyse métabonomique des biofluides facilement accessibles, le sang et l'urine. Ces potentiels biomarqueurs sont donc des métabolites, en opposition aux marqueurs actuellement utilisés qui sont de nature protéique.

Le choix des AINS repose sur leur toxicité cardiaque, ce qui en fait des candidats intéressants pour cette recherche. Le choix de la métabonomique est motivé par le fait que cette technique permet de mettre en évidence des variations de concentration des métabolites présents dans les biofluides même si celles-ci sont très faibles (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ). De plus, cette technique permet une analyse simultanée d'un grand nombre de molécules, permettant la reconnaissance d'un ensemble de métabolites pouvant constituer une signature la plus spécifique possible d'une nécrose myocardique induite par les AINS. En outre, la métabonomique offre d'autres avantages intéressants pour la toxicologie prédictive en phase préclinique (29) :

- Aspect éthique et économique par une réduction du nombre d'animaux employés ainsi que la durée des traitements ou expositions
- Obtention rapide des résultats
- Optimisation de la sélection des molécules et de définition de priorités pour leur développement



# **MATERIEL ET METHODES**



<p><u>Structure chimique</u></p> <p><math>C_{14}H_{11}Cl_2NO_2</math></p> <p>Acide 2-((2,6-Dichlorophenyl)amino)benzeneacétique (Fig. 20 a)</p> <p>Sous forme de sels : Diclofénac-sodium ou Diclofénac-Potassium (Fig. 20 b)</p>	
<p><u>Propriétés physico-chimiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pKa : 4,15</li> <li>- LogP : 4,51</li> <li>- Point de fusion : 283-285 °C</li> <li>- Solubilité dans l'eau : 2,37 mg/L (à 25 °C)</li> </ul>	<p><u>Absorption</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Biodisponibilité per os : 100 %</li> </ul> <p><u>Distribution</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume de distribution : 1.3 L/kg</li> <li>- Liaison aux protéines plasmatiques : 99 %</li> </ul>
<p><u>Métabolisation</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Organe : Foie</li> <li>- Métabolites :             <ul style="list-style-type: none"> <li>o 4-hydroxydiclofénac (par Cytochrome P450 2C9)</li> <li>o 5-hydroxydiclofénac (par Cytochrome P450 3A4)</li> <li>o 3-hydroxydiclofénac (par Prostaglandine G/H synthase 1)</li> <li>o Diclofénac acyl glucurodine (par UDP-glucuronosyltransférase)</li> </ul> </li> </ul>	<p><u>Élimination</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Voies d'excrétion :             <ul style="list-style-type: none"> <li>o Urinaire</li> <li>o Biliaire</li> </ul> </li> <li>- Demi-vie : 2 heures</li> <li>- Clairance rénale : &lt; 1 ml/min</li> </ul> <p><u>Doses thérapeutiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dose faible per os : 25 mg (homme)</li> <li>- Dose maximale par jour per os : 150 mg (homme)</li> </ul>
<p><u>Doses toxiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- LD<sub>50</sub> (souris) : 390 mg/kg (per os)</li> <li>- LD<sub>50</sub> (rat) : 150 mg/kg (per os)</li> </ul>	<p><u>Toxicité</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gastro-intestinale : ulcération et saignements digestifs</li> <li>- Hépatique : Hépatite aiguë/chronique, cholestase</li> <li>- Rénale : plusieurs manifestations possibles (voir ci-dessus)</li> <li>- Cardiovasculaire : Nécrose du myocarde, hypertension, fibrillation auriculaire</li> </ul>
<p><b>Tableau 3 :</b> Propriétés physico-chimiques et ADME du Diclofénac (37).</p>	

# 1. Stratégie expérimentale

## 1.1 Choix de molécules d'intérêt

Le Diclofénac Sodium (provenance : Sigma Aldrich<sup>®</sup>) (*Tableau 3*) et le Rofécoxib (provenance : Sanbio<sup>®</sup>) (*Tableau 4*) ont été sélectionnés car ils semblent, au regard de différentes études épidémiologiques être les AINS les plus toxiques au niveau cardiovasculaire (3,6–11).

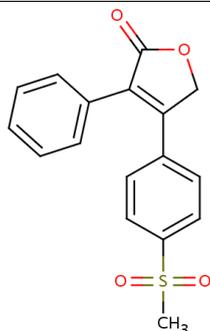
## 1.2 Choix du modèle animal

Le modèle *in vivo* s'impose afin d'accéder à la dynamique des métabolites présents dans les biofluides, dans le contexte d'un organisme entier. L'espèce sélectionnée est le rat, physiologiquement proche de l'homme. Cette espèce, très accessible, offre les avantages d'être facilement hébergée et manipulée. En outre, elle permet le prélèvement d'un volume sanguin plus important que chez la souris.

Le principal effet toxique des AINS est l'ulcération et saignement du tube digestif. Etant donné que leur toxicité cardiovasculaire n'est pas l'effet adverse principal, il semble intéressant d'employer un modèle plus enclin à développer cet effet en vue de mettre en évidence les changements métaboliques. A cette fin, un facteur de risque de toxicité cardiovasculaire cité ci-dessus a été sélectionné : l'hypertension. En effet, les patients atteints d'hypertension semblent être plus à risque de développer des effets adverses au niveau cardiaque et ce plus particulièrement avec un traitement au Diclofénac.

Ce facteur de risque est facilement réalisable chez le rat de manière très fiable et reproductible. En effet, il existe des souches de rats naturellement hypertendus ou permettant le développement d'une hypertension sous certaines conditions. Deux de ces souches ont été retenues et ont fait l'objet d'une comparaison des résultats :

- La souche SHR (Spontaneous Hypertensive Rat) : rats spontanément hypertendus (38). L'hypertension chez les rats SHR est d'origine génétique.
- La souche DAHL/SS (Salt Sensitive) : rats dont l'hypertension est induite par un régime hypersalé (13). L'hypertension chez les rats DAHL/SS est la conséquence d'une hypervolémie provoquée par une réduction de l'excrétion urinaire de sodium, liée à une anomalie génétique d'un transporteur rénal de cet ion. Cette rétention de sodium provoque à son tour une rétention hydrique destinée à assurer un équilibre osmotique.



**Fig. 21 :** Formule chimique du Rofécocixib (37).

<p><u>Structure chimique</u></p> <p><math>C_{17}H_{14}O_4S</math> (Fig. 21)</p>	
<p><u>Propriétés physico-chimiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- LogP : 3,2</li> <li>- Solubilité dans l'eau : insoluble</li> </ul>	<p><u>Absorption</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Per os : biodisponibilité de 93 %</li> </ul>
<p><u>Métabolisation</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Organe : Foie</li> <li>- Métabolites : <ul style="list-style-type: none"> <li>o 5-hydroxyRofécocixib (par Cytochrome P450 1A2 et 3A4)</li> <li>o Dihydro-5-hydroxyRofécocixib (par Prostaglandine G/H synthase 1)</li> <li>o Acide dihydrohydroxy-3,4-threo-Rofécocixib (par Prostaglandine G/H synthase 1)</li> <li>o Acide dihydrohydroxy-3,4-érythro-Rofécocixib (par Prostaglandine G/H synthase 1)</li> <li>o 5-hydroxyRofécocixib o-glucuronide (par UDP-glucuronosyltransférase)</li> </ul> </li> </ul>	<p><u>Distribution</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume de distribution : 86 – 91 L</li> <li>- Liaison aux protéines plasmatiques : 87 %</li> </ul> <p><u>Élimination</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Voie d'excrétion non connue</li> <li>- Demi-vie : 17 heures</li> </ul> <p><u>Doses thérapeutiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dose faible per os : 12,5 mg (homme)</li> <li>- Dose maximale par jour per os : 50 mg (homme)</li> </ul> <p><u>Toxicité</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gastro-intestinale : faible</li> <li>- Hépatique : Hépatite aiguë</li> <li>- Rénale : plusieurs manifestations possibles (voir ci-dessus)</li> <li>- Cardiovasculaire : Nécrose du myocarde, hypertension, fibrillation auriculaire</li> </ul>
<p><b>Tableau 4 :</b> Propriétés physico-chimiques et ADME du Rofécocixib (37).</p>	

### **1.3 Etude métabonomique : choix de la technique**

La <sup>1</sup>H-RMN est la technique retenue pour la réalisation de l'étude métabonomique. En effet, elle offre la possibilité d'obtenir une vision globale des métabolites des biofluides, ce qui est intéressant étant donné que la nature de ceux-ci n'est pas connue *a priori*. De même, cette technique présente l'avantage d'être rapide et ne nécessite pas de préparation complexe des échantillons, ce qui est un argument en faveur d'une application potentielle future en toxicologie préclinique dans le processus d'optimisation du développement de nouvelles molécules pharmaceutiques.

### **1.4 Validation des résultats de l'étude métabonomique**

Les résultats de l'étude métabonomique ont été confrontés avec le dosage de biomarqueurs protéiques de nécrose cardiaque (voir point 4) ainsi qu'avec l'histopathologie des organes cibles (voir point 5) de la toxicité des molécules administrées. Cette confrontation permet de confirmer la présence d'une nécrose cardiaque chez les animaux exposés.

### **1.5 Protocole expérimental**

Deux études ont été réalisées sur des rats SHR : une étude sur 12 rats pour le Diclofénac Sodium et une étude de 12 rats pour le Rofécoxib. Chaque étude a suivi un plan expérimental de 5 semaines. Durant la première semaine, aucune exposition n'est effectuée. Seules les mesures des paramètres physiologiques ainsi que la récolte d'échantillons de sang et d'urine avant exposition ont été réalisées. Ensuite, une exposition de 4 semaines a été appliquée avec deux doses pharmacologiques différentes par étude (voir ci-après). Les rats ont séjourné en cage à métabolisme pendant des périodes de 3 jours consécutifs chaque semaine de l'exposition. Un court séjour de 24h a été réalisé avant exposition, ainsi qu'un autre court séjour de 24 h au dernier jour de l'exposition, avant sacrifice. Une période maximale de résidence des animaux en cage à métabolisme a été fixée à 3 jours par le Comité d'éthique animale de l'Université. La mesure de la tension artérielle et les prélèvements sanguins ont été réalisés une fois avant exposition et de manière hebdomadaire pendant les 4 semaines d'exposition. Deux sacrifices intermédiaires à 2 semaines et à 3 semaines d'exposition ont été effectués afin d'obtenir des coupes histologiques d'intérêt en cours d'exposition.

Une étude ciblant le Rofécoxib a été réalisée sur 8 rats DAHL/SS mis sur une alimentation normale plutôt que sur une alimentation riche en sels, et ce en raison d'une incidence élevée de troubles neurologiques constatés chez des sujets préconditionnés sous régime hypersalé 8% au préalable. Cette étude a suivi un plan expérimental de 5 semaines : Durant la première semaine, aucune exposition n'est effectuée. Seules les mesures des paramètres physiologiques ainsi que la récolte des échantillons de sang et d'urine avant exposition ont été réalisées.

	Prétest	Exposition de 28 jours au Diclofénac/Rofécoxib			
		Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4
Rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac	n = 5	n = 5	n = 5	n = 4	n = 3
Rats SHR exposés à la faible dose de Diclofénac	n = 5	n = 5	n = 5	n = 4	n = 3
Rats SHR exposés à la forte dose de Rofécoxib	n = 5	n = 5	n = 5	n = 4	n = 3
Rats SHR exposés à la faible dose de Rofécoxib	n = 5	n = 5	n = 5	n = 4	n = 3
Rats SHR contrôles	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
Rats DAHL/SS exposés à la forte dose de Rofécoxib	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
Rats DAHL/SS contrôles	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
Sacrifices : <span style="color: blue;">X</span> <span style="color: blue;">X</span> <span style="color: blue;">X</span>					
Prélèvements de sang hors sacrifice	1 par rat	1 par rat	1 par rat	1 par rat	1 par rat
Prélèvements d'urine	1 par rat	3 par rat	3 par rat	3 par rat	4 par rat
Mesures de la tension	1 par rat	1 par rat	1 par rat	1 par rat	1 par rat
Mesures de la consommation	1 par rat	3 par rat	3 par rat	3 par rat	4 par rat
Mesures du poids corporel	0 par rat	7 par rat	7 par rat	7 par rat	7 par rat

Fig. 22 : Vue d'ensemble du protocole expérimental reprenant le nombre d'animaux par semaine ainsi que le nombre de prélèvements et mesures effectués par semaine.



Fig. 23 : Représentation d'une cage à métabolisme (39). La partie inférieure du dispositif permet de récolter et de séparer les urines et les fèces des rongeurs séjournant dans la partie supérieure.

Ensuite, une exposition de 4 semaines a été appliquée avec une seule dose pharmacologique (voir ci-après).

Les rats ont séjourné en cage à métabolisme pendant des périodes de 3 jours consécutifs chaque semaine de l'exposition. Un court séjour de 24h a été réalisé avant exposition, ainsi qu'un autre court séjour de 24 h au dernier jour d'exposition, avant sacrifice. La mesure de la tension artérielle et les prélèvements sanguins ont été réalisés une fois avant exposition et de manière hebdomadaire pendant les 4 semaines d'exposition. Aucun sacrifice intermédiaire n'a été effectué.

Une vue d'ensemble du protocole est reprise en *Fig. 22*.

## 2. Hébergement et exposition des animaux

### 2.1 Conditions d'hébergement

24 rats SHR mâles âgés de 14 semaines et 8 rats DAHL/SS mâles âgés de 19 semaines en provenance de Charles River™ ont été hébergés en cage individuelle avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. La température ambiante constante était de 22 °C (+/- 1°C) et l'humidité relative était de 60% (+/- 5%). Un cycle de 12 h d'éclairage et 12 h d'obscurité a été appliqué. Pendant les périodes ciblées, les rats ont séjourné en cages à métabolisme (*Fig. 23*) sur portoir réfrigéré permettant la récolte des urines tout en minimisant le développement bactérien. Les consommations de nourriture et d'eau ont également été mesurées. Les rats DAHL ont bénéficié d'un pré-conditionnement en régime hypersalé 3% chez l'éleveur et ont été placés sous régime hypersalé 8 % à leur arrivée pour une durée d'un mois, comme recommandé par le fournisseur. L'arrêt de ce régime a été appliqué une semaine avant le début des manipulations.

### 2.2 Exposition des animaux aux molécules

Les rats ont été exposés quotidiennement par voie orale pendant 28 jours après sédation légère induite à l'isoflurane (IsoFlo®) 4% à un débit d'un litre par minute. Pour chacune des 2 molécules testées, les 12 rats ont été répartis en 3 groupes, selon la dose reçue (*40,41*) :

12 rats SHR exposés au Diclofénac Sodium			
	Forte dose	Faible dose	Contrôles
Dose :	10 mg/Kg	2,5 mg/Kg	0 mg/Kg
Nombre de rats :	5	5	2

12 rats SHR exposés au Rofécoxib			
	Forte dose	Faible dose	Contrôles
Dose :	30 mg/Kg	1 mg/Kg	0 mg/Kg
Nombre de rats :	5	5	1



L'exposition des rats DAHL/SS a été effectuée de manière identique, excepté la répartition des animaux en seulement 2 groupes :

<b>8 rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib</b>		
	<b>Forte dose</b>	<b>Contrôles</b>
Dose :	30 mg/Kg	0 mg/Kg
Nombre de rats :	4	4

Le Diclofénac Sodium est administré sous forme de solution aqueuse dont la concentration est 50 mg/ml. Les rats contrôles ont reçu une solution saline à 0,9 %. Le Rofécoxib est administré sous forme de suspension dans du « corn oil ». Les animaux contrôles ont reçu le véhicule seul.

### **2.3 Sacrifice et prélèvements d'organes**

Les rats ont été euthanasiés par décapitation, après anesthésie à l'isoflurane (IsoFlo®) 4% à un débit d'un litre par minute, permettant la récolte de sang avant sacrifice par ponction de la veine caudale. Les sacrifices ont été réalisés à des moments différents de l'exposition (rats SHR uniquement) :

<b>Sacrifice des 12 rats SHR exposés au Diclofénac</b>			
Moment du sacrifice :	2 semaines	3 semaines	4 semaines (terme)
<b>Nombre de rats sacrifiés par sous-groupe :</b>			
Forte dose :	1	1	3
Faible dose :	1	1	3
Contrôles :	0	0	2

<b>Sacrifice des 12 rats SHR exposés au Rofécoxib</b>			
Moment du sacrifice :	2 semaines	3 semaines	4 semaines (terme)
<b>Nombre de rats sacrifiés par sous-groupe :</b>			
Forte dose :	1	1	3
Faible dose :	1	1	3
Contrôles :	0	0	2

Les 8 rats DAHL/SS ont été sacrifiés au terme de l'exposition de 4 semaines.

Les organes suivants ont été prélevés pour analyse histologique sur l'ensemble des rats :

- Le cœur
- Un fragment du lobe hépatique droit
- Le rein gauche
- L'estomac et une partie du duodénum (rats SHR uniquement)



**Fig. 24 :** Photo du dispositif produit par Kent Scientific Corporation™ permettant la mesure non-invasive de tension artérielle chez les rongeurs (42). Le rongeur est placé dans un cylindre de contention visible en plusieurs exemplaires sur cette photo.

### **3. Mesure de paramètres physiologiques**

#### **3.1 Mesure de la tension artérielle**

La mesure de la tension artérielle a été effectuée par la méthode du « Tail Cuff » de manière hebdomadaire sur chaque rat durant les 4 semaines d'exposition ainsi que la semaine précédant celle-ci. Cette méthode, non-invasive, permet une mesure indirecte de la tension artérielle systolique et diastolique chez le rat vigilant, maintenu dans un cylindre de contention pour limiter les mouvements. La tête de l'animal est maintenue dans un capuchon opaque pour diminuer le stress lié à l'expérimentation. Un capteur est placé sur la queue du rat pour permettre la prise des mesures. Le cylindre contenant l'animal est placé sur une plaque chauffante permettant de maintenir une température corporelle périphérique à 37 °C afin d'obtenir un débit sanguin caudal optimal pour la mesure (Fig. 24). Le dispositif permet d'effectuer des cycles d'acclimatation afin d'habituer l'animal à la procédure en vue d'éviter les biais liés au stress. Un cycle de 10 mesures d'acclimatation suivies de 20 mesures réelles a été appliqué pour chaque session. Un minimum de 10 mesures correctes (définies comme telles par le système) a été retenu pour chaque session, permettant ainsi le calcul d'une moyenne par session, pour la tension systolique et pour la tension diastolique. Les données ont été acquises par le logiciel Coda (version 1.1.3155.14599, Kent Scientific Corporation™).

#### **3.2 Mesure du poids corporel**

Le poids corporel de chaque rat a été mesuré quotidiennement avant administration de la molécule afin que la dose reçue soit adaptée.

#### **3.3 Mesure de la consommation de nourriture et d'eau**

Les consommations de nourriture et d'eau ont été mesurées par période de 24h lors des séjours en cage à métabolisme.

### **4. Prélèvements des échantillons**

#### **4.1 Prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins ont été effectués hebdomadairement pendant l'exposition. Un prélèvement a été fait avant exposition et avant sacrifice. Au préalable, les rats ont été anesthésiés sous ventilation d'un litre par minute à l'isoflurane (IsoFlo®) 4 %. Durant la procédure, l'anesthésie a été maintenue sous ventilation de 0,5 litre par minute à l'isoflurane 2%. Les prélèvements d'un volume minimal de 700 µl ont été réalisés dans la veine caudale à l'aide d'une seringue d'un ml munie d'une aiguille de 25 G. Ceux-ci ont ensuite été placés dans des tubes Eppendorfs™ de 1,5 ml puis, après 30 minutes de repos à température ambiante, centrifugés à 3000 G pendant 15 minutes afin d'en extraire le *serum*.



Les *sera* ont alors été transférés dans des cryotubes et conservés à -80°C pour analyses ultérieures.

## 4.2 Prélèvements d'urine

Les prélèvements d'urine ont été effectués par période de 24 h pendant les séjours en cage à métabolisme. Les urines ont été récoltées dans des tubes Falcon™ de 50 ml contenant 1 ml d'azide de sodium 0,1 M et réfrigérés à 4°C afin d'éviter la contamination et la prolifération bactériennes. Les prélèvements ont été ensuite centrifugés à 3000 G pendant 15 minutes à température de 4°C. Les surnageants ont ensuite été transférés dans des cryotubes et conservés à -80°C pour analyse RMN ultérieure.

# 5. Etude métabonomique

## 5.1 Préparation des échantillons

### 5.1.1 Urine

Après décongélation des échantillons, plusieurs étapes sont appliquées :

- Prélèvement de 400 µl d'urine pour chaque échantillon
- Ajout de 200 µl de tampon phosphate deutéré (80 % H<sub>2</sub>O et 20 % D<sub>2</sub>O)
- Centrifugation à 13000 G pendant 10 minutes à température ambiante
- Récupération de 600 µl de surnageant et ajout 50 µl de TSP 1g/ml

### 5.1.2 Serum

Après décongélation des échantillons, plusieurs étapes sont appliquées :

- Prélèvement de 100 µl de *serum* pour chaque échantillon
- Ajout de 500 µl de tampon phosphate deutéré (80 % H<sub>2</sub>O et 20 % D<sub>2</sub>O)
- Centrifugation à 13000 G pendant 10 minutes à température ambiante
- Récupération de 600 µl de surnageant et ajout 50 µl de TSP 1g/ml

## 5.2 Acquisition des spectres

Les spectres ont été acquis par un spectromètre Bruker Avance (11,8 T) de 500,16 MHz doté d'une sonde 5 mm DUX 3H-1H. Les séquences d'acquisition employées étaient :

- NOESY à une dimension pour les urines (temps d'acquisition de 2,65 s)
- CPMG à une dimension pour les *sera*

128 scans ont été effectués par échantillon.



### 5.3 Traitement des spectres

Après acquisition, les spectres ont été traités via le logiciel MestRe Nova (versions 5.2.0-3404 et 9.0) afin d'obtenir des résultats étudiables par analyse multivariée. Ce traitement comporte différentes étapes :

- Correction automatique (et manuelle au besoin) de la phase
- Correction automatique de la ligne de base
- Position du pic de référence (TSP) fixée à 0,00 ppm
- Vérification de la symétrie et de la forme du pic de TSP
- Normalisation des valeurs du spectre en plaçant celle du TSP à 100.
- Découpage de chaque spectre en régions (descripteurs) de 0,04 ppm à partir de 0,08 ppm jusque 10 ppm (obtention de 248 descripteurs pour chaque spectre)
- Calcul de l'aire sous la courbe pour chaque descripteur

Les dernières étapes de traitement des données sont réalisées sous Excel (Microsoft Office 2011™) :

- Retrait des descripteurs compris entre 4,5 et 5,0 ppm (pic de l'eau)  
Retrait de descripteurs compris entre 5,5 et 6 ppm (pic de l'urée)
- Normalisation par rapport à l'aire totale du spectre

Pour les spectres de *serum*, seul le retrait du pic de l'eau est effectué.

### 5.4 Analyse multivariée

L'analyse multivariée a été réalisée sur les descripteurs (valeurs des intégrales normalisées des sous-régions spectrales de 0,04 ppm) via le logiciel Simca P+ (version 12.0, Umetrics™). Cette approche permet de mettre en évidence les différences entre les groupes d'échantillons et d'en retirer les descripteurs expliquant le plus ces différences. Il existe 2 types de méthodes :

- Méthodes non-supervisées : le système ne connaît pas les différents groupes
- Méthodes supervisées : le système connaît les différents groupes

L'analyse en composante principale (PCA) a été employée comme méthode non-supervisée et la régression des moindres carrés partiels (PLS) a été utilisée comme méthode supervisée.

Chacune de ces méthodes permet de générer un scores plot et un loadings plot. Le scores plot représente la description par projection en 2 dimensions (appelées composantes principales) des différents échantillons initialement décrits par un grand nombre de descripteurs (intégrales normalisées des sous-régions spectrales). Ce plot permet de visualiser la distribution des échantillons et, de ce fait, les regroupements et séparations potentiels. Le loadings plot représente les descripteurs responsables de la ségrégation des échantillons



observée sur le scores plot. Les descripteurs les plus importants sont sélectionnés sur base du VIP du modèle (valeurs > 0,75).

### **5.5 Identification des métabolites**

Les métabolites importants responsables de la séparation des groupes d'individus ont été identifiés au moyen de tables d'identification, de bases de données (43,44) et de recherches dans la littérature, au départ des descripteurs mis en évidence par l'analyse multivariée. L'identification d'un métabolite repose sur 2 paramètres :

- la position du/des pic(s) sur le spectre (le déplacement chimique exprimé en ppm)
- la multiplicité des pics (singulet, doublet, triplet, quadruplet, ...)

L'analyse multivariée ne met en évidence que le premier paramètre. Le deuxième paramètre est évalué manuellement par l'intermédiaire du contrôle visuel des spectres d'intérêt.

## **6. Dosage des biomarqueurs protéiques**

3 marqueurs protéiques de nécrose cardiaque ont été mesurés : la troponine I cardiaque (spécifique), la chaîne légère de la myosine cardiaque-1 (spécifique) et la myoglobine (non-spécifique). Les concentrations sériques de ces protéines ont été mesurées par utilisation de kits ELISA (Life Diagnostics, Inc. <sup>TM</sup>). Ceux-ci permettent la détection quantitative des protéines ciblées par l'intermédiaire d'anticorps dirigés contre un antigène de la protéine. Ces anticorps recouvrent les puits où les échantillons sont insérés. Ils sont également couplés à une enzyme inactive, la HRP. L'ajout du substrat de l'enzyme permet d'activer les molécules d'enzymes couplées aux anticorps activés ayant reconnu leur antigène. Cela produit une pigmentation dont l'absorbance à une longueur d'onde donnée peut être mesurée par l'intermédiaire d'un lecteur de plaque approprié. L'importance de cette absorbance dépend de la quantité d'anticorps activés et donc de la quantité d'antigènes présents dans l'échantillon. L'absorbance est donc proportionnelle à la concentration en protéine de l'échantillon, à volume équivalent. Il est ainsi possible de déterminer la concentration en protéine ciblée d'un échantillon à partir d'une droite d'étalonnage établie au départ d'échantillons de concentration connue, appelés standards.

### **Préparation de la solution de rinçage**

Dilution des 50 ml de solution fournie dans 950 ml d'eau distillée.

### **Préparation des standards**

- Reconstitution de la solution de cTnI par ajout de 400 µl d'eau distillée
- Nomination de 7 tubes Eppendorf™ : 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,312 – 0,156 ng/ml
- Ajout du volume de diluant mentionné par le fabricant dans le tube 10 ng/ml suivi de l'ajout du volume mentionné de la solution de cTnI
- Dilution en série dans les autres tubes pour obtenir une concentration diminuant de moitié à chaque étape (ajout d'un volume équivalent de cTnI du tube précédent et de diluant)

### **Dilution des échantillons de *serum***

Les échantillons de *serum* ont été dilués d'un facteur 10 dans le diluant fourni.

### **Procédure de l'essai immunologique**

- Ajout de 100 µl du conjugué HRP dans chaque puits de la plaque
- Ajout de 100 µl de chaque standard et échantillons dans les puits appropriés (en duplicata pour les standards et en triplicata pour les échantillons)
- Incubation à température ambiante pendant une heure sur un agitateur à 150 rotations par minute
- 5 lavages de la plaque par ajout de 400 µl/puits de solution de rinçage
- Ajout de 100 µl de TMB dans chaque puits
- Incubation à température ambiante pendant 20 min. sur un agitateur à 150 rotations par minute
- Ajout de 100 µl de la solution « stop » dans chaque puits

**Tableau 5 :** Etapes du protocole de dosage de la cTnI par ELISA, selon les instructions du fabricant.

### **Préparation de la solution de rinçage**

Dilution des 50 ml de solution fournie dans 950 ml d'eau distillée.

### **Préparation des standards**

- Nomination de 8 tubes Eppendorf™ : 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,56 – 0 ng/ml
- Ajout du volume de diluant mentionné par le fabricant dans le tube 100 ng/ml suivi de l'ajout du volume mentionné de la solution de myoglobine
- Dilution en série dans les autres tubes pour obtenir une concentration diminuant de moitié à chaque étape (ajout d'un volume équivalent de myoglobine du tube précédent et de diluant)

### **Procédure de l'essai immunologique**

- Ajout de 100 µl du conjugué HRP dans chaque puits de la plaque
- Ajout de 20 µl de chaque standard et échantillons non-dilués dans les puits appropriés (en duplicata pour les standards et en triplicata pour les échantillons)
- Incubation à température ambiante pendant une heure sur un agitateur à 150 rotations par minute
- 5 lavages de la plaque par ajout de 400 µl/puits de solution de rinçage
- Ajout de 100 µl de TMB dans chaque puits
- Incubation à température ambiante pendant 20 min. sur un agitateur à 150 rotations par minute
- Ajout de 100 µl de la solution « stop » dans chaque puits

**Tableau 6 :** Etapes du protocole de dosage de la myoglobine par ELISA, selon les instructions du fabricant.

## **6.1 Sélection des échantillons à analyser**

25 échantillons de *serum* issus des 2 études sur les rats SHR ont été mesurés en triplicata pour chaque kit ELISA :

- Echantillons récoltés avant exposition des rats exposés à la forte dose (n=5 pour le groupe Diclofénac et n=5 pour le groupe Rofécoxib) et des rats contrôles (n=2 pour le groupe Diclofénac et n=1 pour le groupe Rofécoxib)
- Echantillons récoltés juste avant sacrifice des rats exposés à la forte dose (n=4 pour le groupe Diclofénac (n=2 à J28) et n=5 pour le groupe Rofécoxib (n= 3 à J28)) et des rats contrôles (n=2 pour le groupe Diclofénac et n=1 pour le groupe Rofécoxib)

## **6.2 Protocoles des tests ELISA**

Les différents échantillons sélectionnés ont été mesurés en triplicata pour chacun des 3 tests ELISA effectués. Les dosages de la cTnI (numéro de lot : 20102HSC0915) (*Tableau 5*), de la myoglobine (numéro de lot : 21102NC0915) (*Tableau 6*) et de la CMLC-1 (numéro de lot : 23202C0915) (*Tableau 7*) ont été effectués conformément aux instructions du fabricant. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 450 nm par un lecteur de plaque (GloMax® Explorer, Promega™).

## **6.3 Détermination de la concentration sérique des protéines**

La concentration sérique des 3 protéines a été déterminée après élaboration d'une droite d'étalonnage obtenue à partir des valeurs moyennes d'absorbance des standards et après correction des facteurs de dilution, via Excel (Microsoft Office 2011™). La droite d'étalonnage passant par l'origine a été déterminée par régression linéaire ( $R^2 > 0,94$ ).

# **7. Etude histologique**

## **7.1 Fixation**

Après prélèvement, les organes destinés à l'histologie ont été placés dans une solution de bouin alcool (acide picrique 1%, éthanol 95%, formol, acide acétique, eau distillée) pendant une période d'au moins 48 heures. L'estomac a été rincé et ouvert par la petite courbure pour être étalé.

## **7.2 Déshydratation**

Les différents organes ont été plongés dans 3 bains successifs d'éthanol de concentration croissante (70 ° - 95°) pendant une durée de 24 heures puis dans 3 bains consécutifs de butanol, permettant la solubilisation de la paraffine.

**Préparation de la solution de rinçage**

Dilution des 50 ml de solution fournie dans 950 ml d'eau distillée.

**Préparation des standards**

- Reconstitution de la solution de CMLC-1 par ajout du volume d'eau distillée demandé
- Nomination de 6 tubes Eppendorf™ : 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,312 – 0,156 – 0,078 ng/ml
- Ajout du volume de diluant mentionné par le fabricant dans le tube 2,5 ng/ml suivi de l'ajout du volume mentionné de la solution de CMLC-1
- Dilution en série dans les autres tubes pour obtenir une concentration diminuant de moitié à chaque étape (ajout d'un volume équivalent de CMLC-1 du tube précédent et de diluant)

**Dilution des échantillons de *serum***

Les échantillons de *serum* ont été dilués d'un facteur 5 dans le diluant fourni.

**Procédure de l'essai immunologique**

- Ajout de 100 µl de chaque standard et échantillons dans les puits appropriés (en duplicata pour les standards et en triplicata pour les échantillons)
- Incubation à température ambiante pendant une heure sur un agitateur à 150 rotations par minute
- 5 lavages de la plaque par ajout de 400 µl/puits de solution de rinçage
- Ajout de 100 µl du conjugué HRP dans chaque puits de la plaque
- Incubation à température ambiante pendant une heure sur un agitateur à 150 rotations par minute
- 5 lavages de la plaque par ajout de 400 µl/puits de solution de rinçage
- Ajout de 100 µl de TMB dans chaque puits
- Incubation à température ambiante pendant 20 min. sur un agitateur à 150 rotations par minute
- Ajout de 100 µl de la solution « stop » dans chaque puits

**Tableau 7** : Etapes du protocole de dosage de la CMLC-1 par ELISA, selon les instructions du fabricant.

### **7.3 Enrobage dans la paraffine**

Les organes ont été placés dans 3 bains de paraffine liquide de 24 h chacun. Les organes ont ensuite été déposés dans des cassettes selon l'axe de coupe désiré pour obtenir un bloc solide de paraffine englobant complètement l'organe pour permettre sa découpe.

### **7.4 Obtention des coupes**

Les coupes de 5 microns d'épaisseur ont été effectuées par un microtome et ont été déposées sur une lame recouverte d'une goutte d'eau. L'ensemble a alors été positionné sur une plaque chauffante pour permettre l'obtention d'une coupe correctement étendue sur la lame. 4 coupes longitudinales par cœur ont été effectuées.

### **7.5 Réhydratation**

Les lames ont subi 2 bains de toluène de 5 minutes suivis de 3 bains successifs d'alcool 95 % et d'un rinçage à l'eau courante de 10 minutes afin de permettre la solubilisation des colorants, solubles en solution aqueuse.

### **7.6 Colorations**

Deux colorations ont été effectuées pour les coupes de cœur :

- Coloration HES (hématoxyline, éosine, safran) : permet la mise en évidence de l'acidophilie des cardiomyocytes subissant une nécrose par ischémie, en phase précoce.
- Coloration au trichrome de Masson (hématoxyline, fuchsine, vert lumière) : permet la mise en évidence des fibres de collagène, ce qui est intéressant pour la recherche de fibroses cicatricielles post-ischémiques.

## **8. Statistiques**

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 3.2.3, logiciel libre sous licence GNU) muni du package R Commander. Des tests non-paramétriques ont été appliqués étant donné le faible nombre d'individus ( $n < 6$ ) constituant chaque échantillon et l'absence de normalité des données. Les tests employés sont :

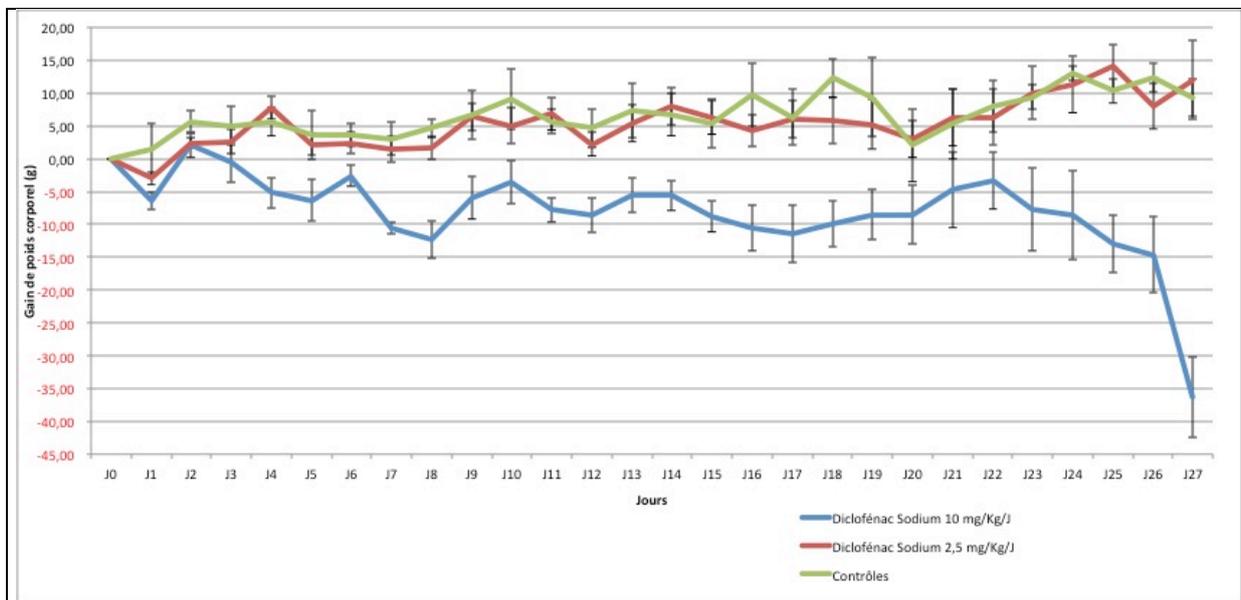
- Test de Kruskal-Wallis pour la comparaison de plus de 2 échantillons indépendants
- Test de Wilcoxon bivarié par la comparaison de 2 échantillons indépendants
- Test de Wilcoxon apparié pour la comparaison de mesures répétées pour un seul échantillon.

L'ensemble des données contrôles des deux études sur rats SHR (Diclofénac et Rofécoxib) ont été regroupées en un seul groupe contrôle utilisé dans les différents tests statistiques effectués.

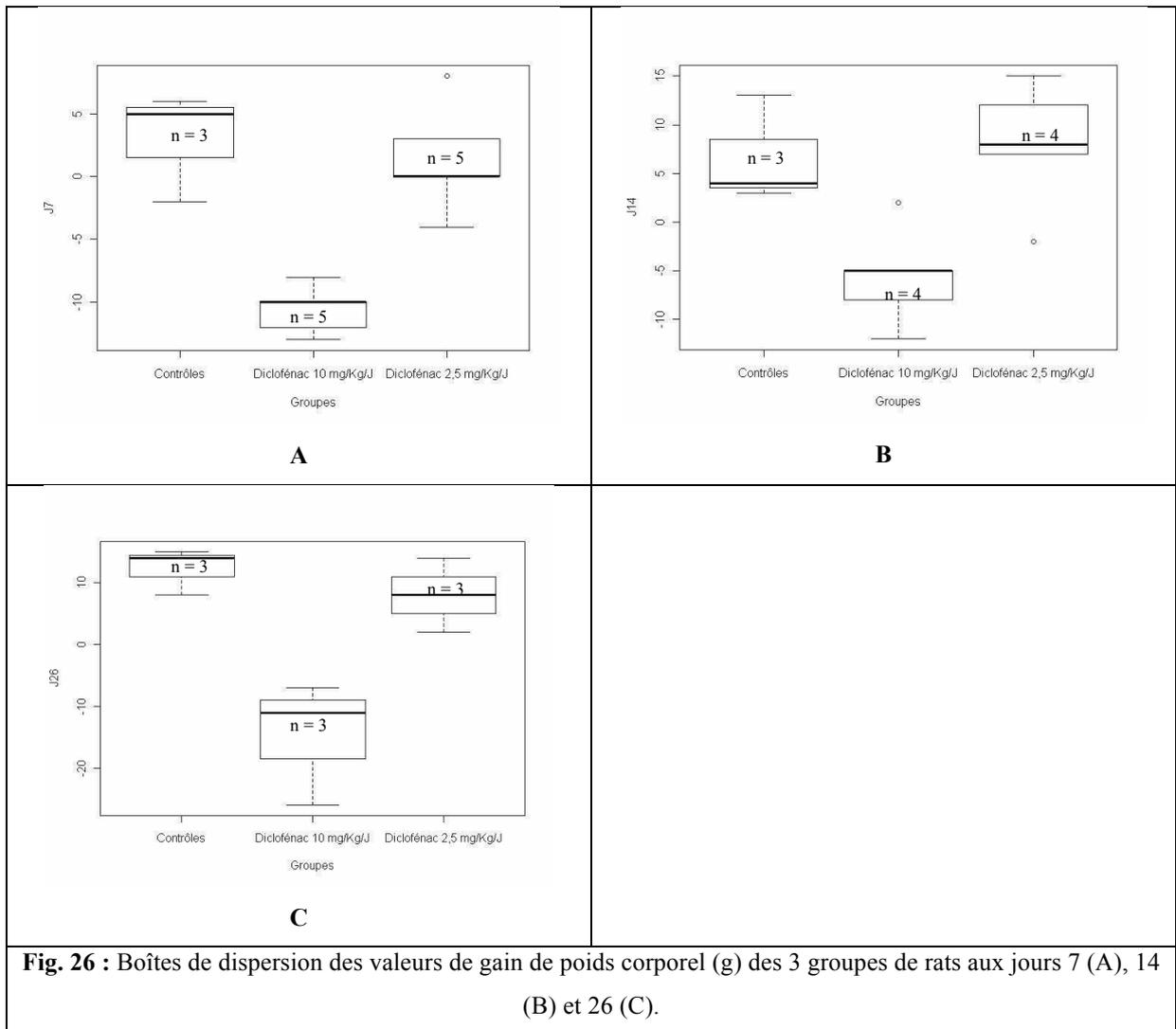
Les boîtes de dispersion ont été établies d'après Tukey (1977), à l'aide du logiciel R.



# **RESULTATS**



**Fig. 25 :** Evolution quotidienne depuis le début de l'exposition du gain de poids corporel moyen (+/- erreur standard) des rats SHR exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Diclofénac 2,5 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).



**Fig. 26 :** Boîtes de dispersion des valeurs de gain de poids corporel (g) des 3 groupes de rats aux jours 7 (A), 14 (B) et 26 (C).

# 1. Etude sur rats SHR exposés au Diclofénac

## 1.1 Paramètres physiologiques

### 1.1.1 *Gain de poids corporel*

L'évolution du gain de poids corporel moyen des rats, mesuré quotidiennement, est représentée en *Fig. 25*. Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'est mise en évidence par rapport au jour 1 pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

Des différences statistiquement significatives ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) sont retrouvées entre les 3 groupes aux jours 4, 7 (*Fig. 26 A*), 8, 9, 11, 12, 13, 14 (*Fig. 26 B*), 15, 16, 17, 18, et 26 (*Fig. 26 C*) (test de Kruskal-Wallis). Des différences statistiquement significatives ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) sont également présentes entre les deux groupes exposés aux jours 4, 7 (*Fig. 26 A*), 8, 9, 11, 12, 13, 14 (*Fig. 26 B*), 15, 16 et 17 (test de Wilcoxon bivarié).

Des différences statistiquement significatives ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) existent aussi entre le groupe exposé à la forte dose et le groupe de rats contrôles aux jours 6, 7 (*Fig. 26 A*), 8, 11 et 14 (*Fig. 26 B*) (test de Wilcoxon bivarié). Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'est retrouvée entre le groupe contrôle et le groupe exposé à la faible dose (test de Wilcoxon bivarié).

### 1.1.2 *Consommation de nourriture*

L'évolution de la consommation de nourriture moyenne sur 24 heures des rats pendant les séjours en cage à métabolisme est représentée en *Fig. 27*. Il n'existe pas de différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) par rapport au prétest, pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

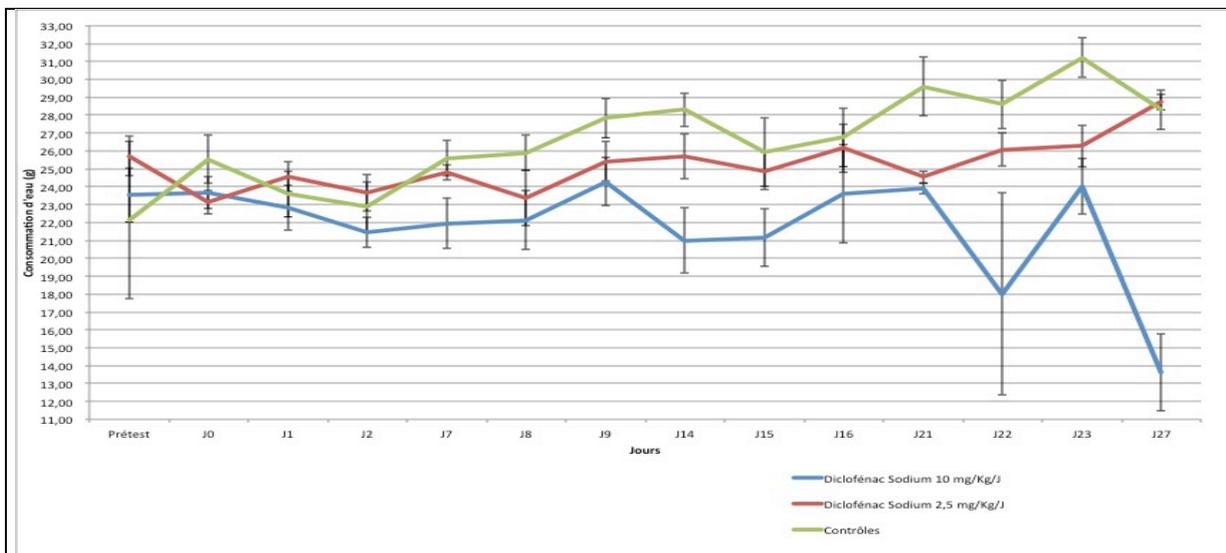
Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) entre les 3 groupes est mise en évidence au jour 14 (*Fig. 28*) (test de Kruskal-Wallis).

Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'existe lorsque les 3 groupes sont comparés deux à deux (test de Wilcoxon bivarié).

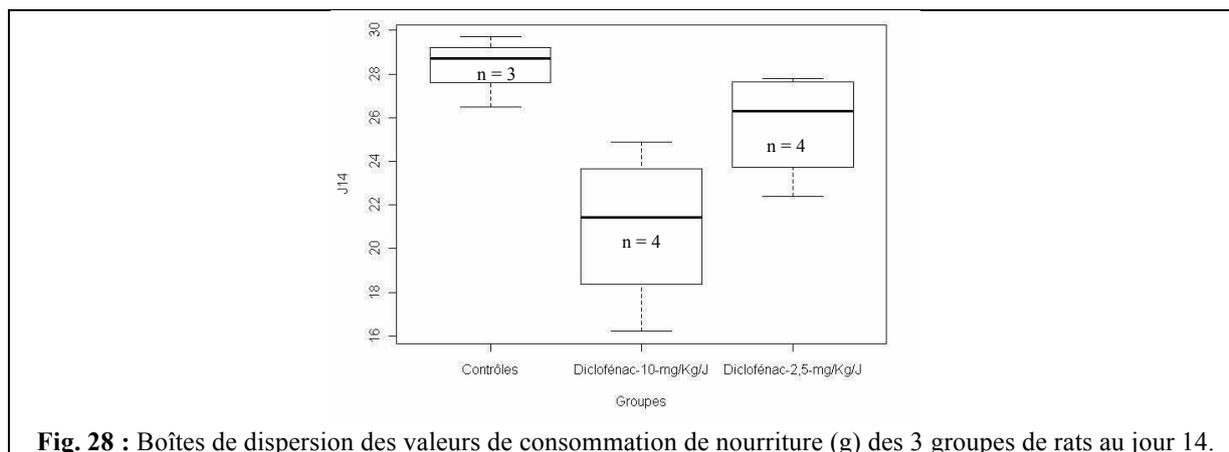
### 1.1.3 *Consommation d'eau*

L'évolution de la consommation d'eau moyenne sur 24 heures des rats pendant les séjours en cage à métabolisme est représentée en *Fig. 29*. Il n'existe pas de différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) par rapport au prétest, pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

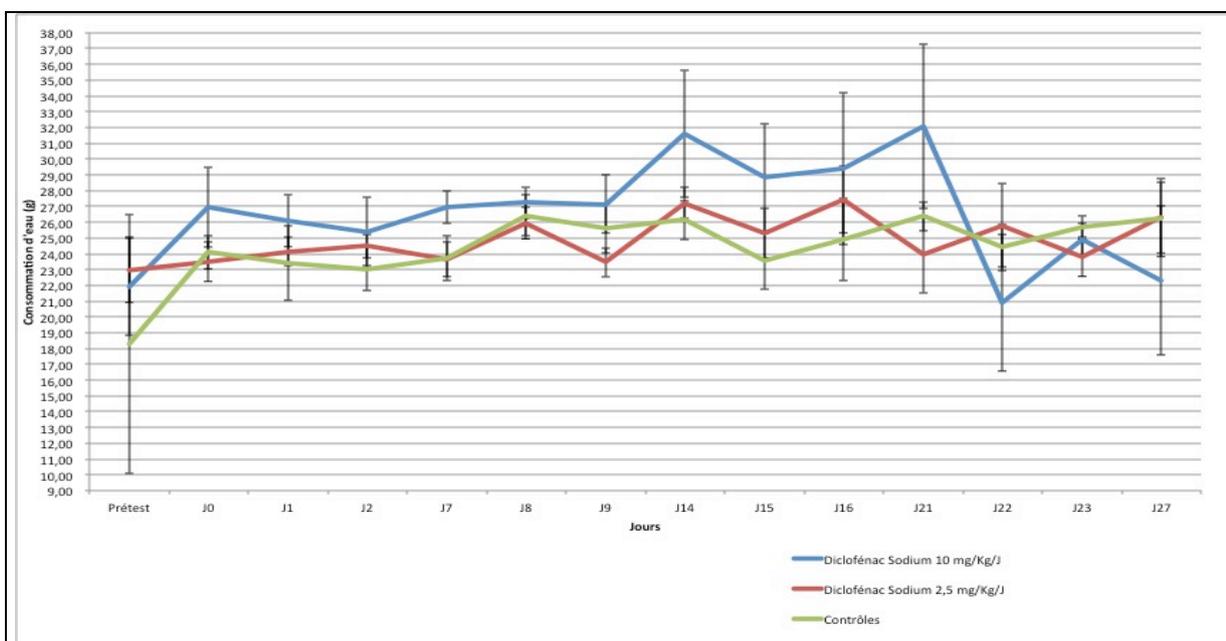
Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'est retrouvée entre les 3 groupes (test de Kruskal-Wallis) ni au sein des comparaisons des groupes deux à deux (test de Wilcoxon bivarié).



**Fig. 27 :** Evolution au cours de l'exposition de la consommation moyenne (+/- erreur standard) sur 24 heures en nourriture pendant les séjours en cage à métabolisme des rats SHR exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Diclofénac 2,5 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).



**Fig. 28 :** Boîtes de dispersion des valeurs de consommation de nourriture (g) des 3 groupes de rats au jour 14.



**Fig. 29 :** Evolution au cours de l'exposition de la consommation moyenne (+/- erreur standard) sur 24 heures en eau pendant les séjours en cage à métabolisme des rats SHR exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Diclofénac 2,5 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).

#### 1.1.4 Tension artérielle

L'évolution de la tension artérielle systolique et diastolique des rats au cours de l'exposition est représentée en *Fig. 30*. Aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) n'est mise en évidence par rapport au prétest, pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

#### 1.1.5 Mortalité

Aucune mortalité spontanée n'a été rencontrée dans chacun des 3 groupes.

### **1.2 Dosage des biomarqueurs protéiques de toxicité cardiaque**

#### 1.2.1 Dosage de la Troponine-I cardiaque (cTnI)

Les valeurs de la concentration sérique en cTnI avant exposition et au terme de celle-ci sont représentées en *Fig. 31*, pour le groupe de rats exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J et pour le groupe de rats contrôles. Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les valeurs de fin et de début d'exposition, pour chacun des groupes (test de Wilcoxon apparié).

Il n'existe aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les 2 groupes avant et à la fin de l'exposition (test de Wilcoxon bivarié).

#### 1.2.2 Dosage de la Chaîne légère de la myosine cardiaque 1 (CMLC-1)

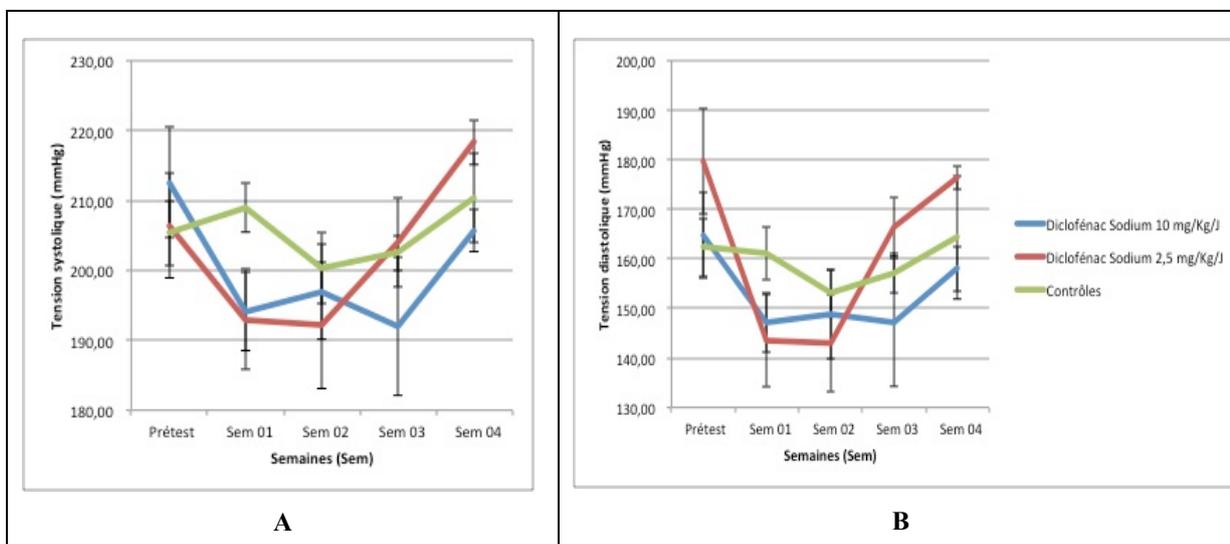
Les valeurs de la concentration sérique en CMLC-1 avant et en fin d'exposition sont représentées en *Fig. 32*, pour le groupe de rats exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J et pour le groupe de rats contrôles. Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les valeurs de début et de fin d'exposition, pour chacun des groupes (test de Wilcoxon apparié).

Il n'existe aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les 2 groupes avant et à la fin de l'exposition (test de Wilcoxon bivarié).

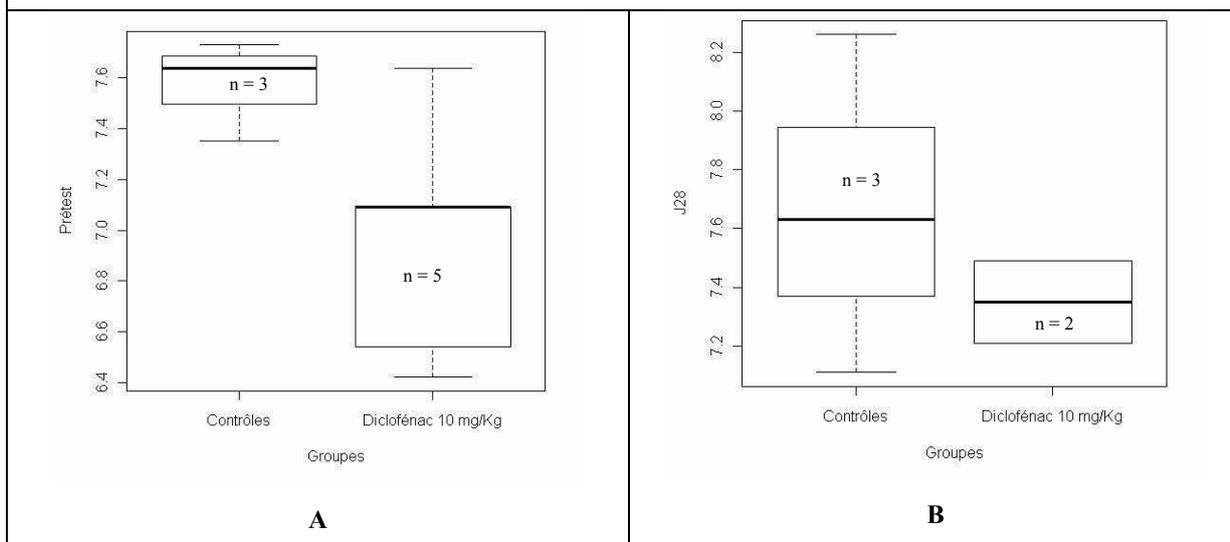
#### 1.2.3 Dosage de la myoglobine

Les valeurs de la concentration sérique en myoglobine avant et au terme de l'exposition sont représentées en *Fig. 33*, pour le groupe de rats exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J et pour le groupe de rats contrôles. Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les valeurs de début et de fin d'exposition, pour chacun des groupes (test de Wilcoxon apparié).

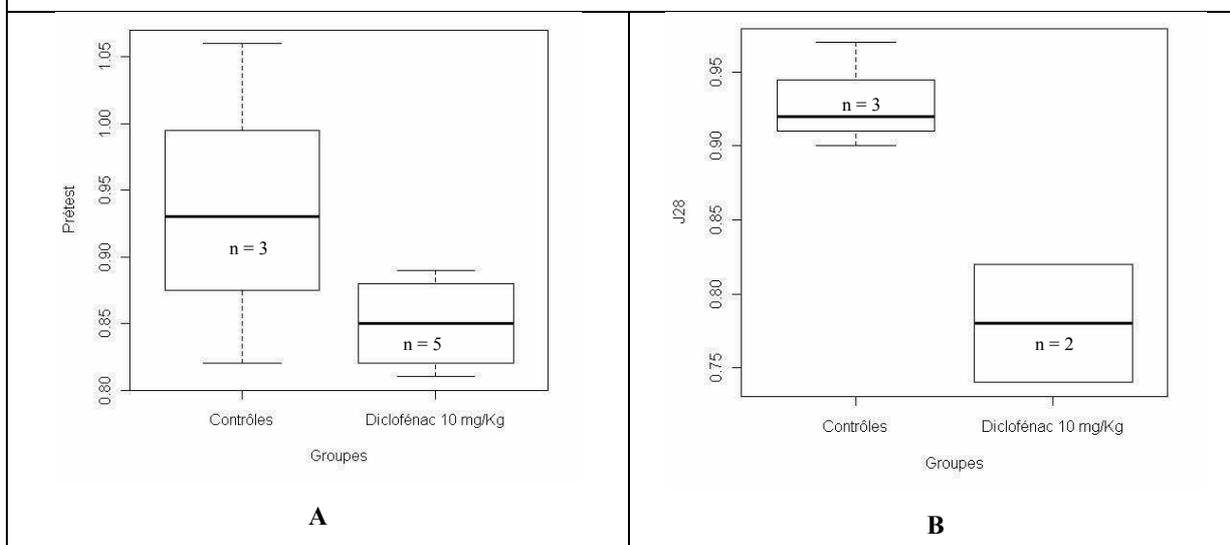
Il n'existe aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les 2 groupes avant et à la fin de l'exposition (test de Wilcoxon bivarié).



**Fig. 30 :** Evolution au cours de l'exposition de la tension artérielle systolique moyenne (+/- erreur standard) (A) et diastolique moyenne (+/- erreur standard) (B) des rats SHR exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Diclofénac 2,5 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).



**Fig. 31 :** Boîtes de dispersion des valeurs de concentration sérique (ng/ml) de la cTnI avant exposition (A) et en fin d'exposition (B) des rats exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J et des rats contrôles.



**Fig. 32 :** Boîtes de dispersion des valeurs de concentration sérique (ng/ml) de la CMLC-1 avant l'exposition (A) et au terme de l'exposition (B) des rats exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J et des rats contrôles.

### 1.3 Etude histologique

Des signes précoces de nécrose cardiaque par ischémie sont retrouvés chez certains individus :

- Groupe exposé à la forte dose : les 3 individus sacrifiés au jour 28.
- Groupe contrôle : les 2 individus sacrifiés au jour 28.

Les signes identifiés, visibles en *Fig. 34*, sont caractéristiques d'une nécrose très précoce :

- Coloration éosinophile du cytoplasme
- Perte de la striation cytoplasmique
- Coloration hétérochromatique des noyaux

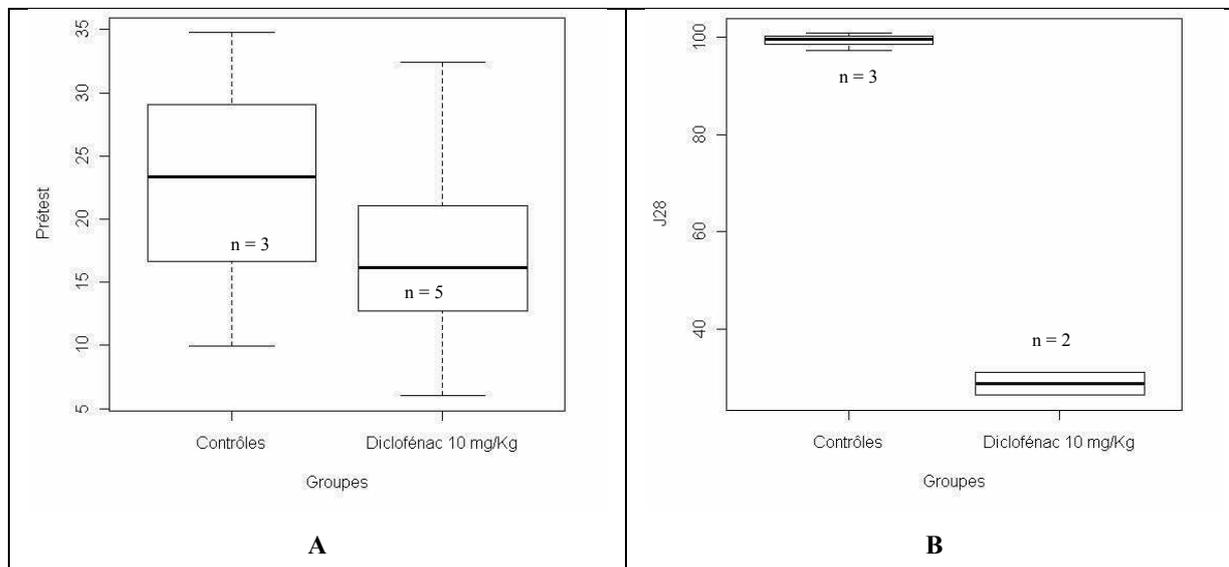
Ces signes sont retrouvés sur des cellules décrivant une petite zone ventriculaire souvent diffuse. Aucun signe de nécrose par ischémie n'est retrouvé chez les rats du groupe exposé à la faible dose. La *Fig. 34* montre également les caractéristiques de cardiomyocytes normaux, pour comparaison :

- Noyaux euchromatiques centraux des cardiomyocytes bien visibles
- Coloration normale du cytoplasme
- Striation cytoplasmique présente
- Trait scalariforme d'aspect normal
- Pas d'infiltrat inflammatoire
- Absence de tissu de granulation et de fibrose cicatricielle

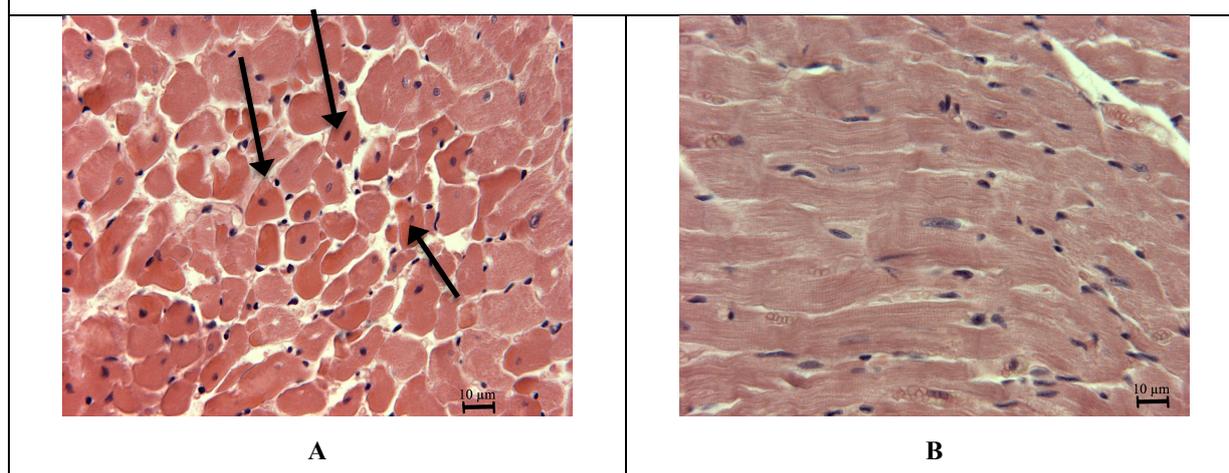
### 1.4 Etude métabonomique sur les urines

Un premier modèle d'analyse en composantes principales (PCA, méthode non-supervisée) a été effectué sur l'ensemble des échantillons d'urine de tous les rats afin d'observer la formation éventuelle de groupes (*Fig. 35*). Le scores plot ne montre pas de tendance spontanée à la formation de groupes.

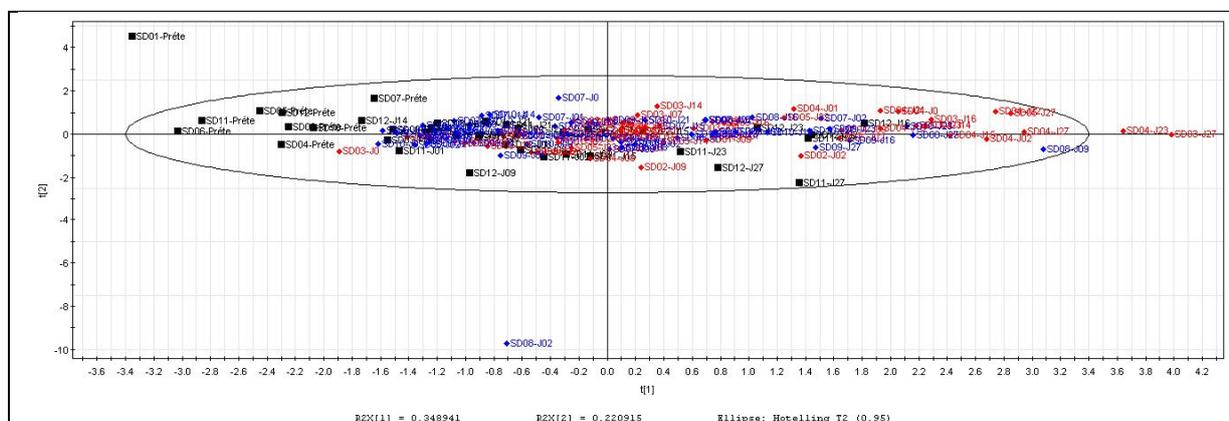
Différentes comparaisons ont été réalisées par PLS (méthode supervisée) entre des sous-groupes d'échantillons d'urines pour évaluer d'une part l'évolution dans le temps du profil métabolique du groupe des rats exposés à la forte dose de Diclofénac et d'autre part pour mettre en évidence les différences des profils métaboliques entre le groupe exposé à la forte dose de Diclofénac et les deux autres groupes (faible dose et contrôles). Seules les comparaisons les plus pertinentes sont reprises ( $R^2_{cum} > 0,5$ ,  $Q^2_{cum} > 0,25$ , test des permutations validé). Le choix d'une méthode supervisée repose sur l'intérêt de mettre en évidence les variables expliquant les différences entre les groupes déterminés et renseignés au système.



**Fig. 33 :** Boîtes de dispersion des valeurs de concentration sérique (ng/ml) de la myoglobine avant l'exposition (A) et au terme de l'exposition (B) des rats exposés au Diclofénac 10 mg/Kg/J et des rats contrôles.



**Fig. 34 :** Comparaison histologique entre une zone myocardique ischémique, issue de l'étude sur le Rofécocixib<sup>1</sup> (A) et une zone myocardique saine, issue d'un rat exposé à la forte dose de Diclofénac (B). La zone myocardique ischémique présente des signes caractéristiques de nécrose précoce sur un groupe de cardiomyocytes (flèches). Grossissement : 250 x. Coloration : Hématoxyline, éosine, safran.



**Fig. 35 :** Scores plot d'une PCA réalisée sur l'ensemble des échantillons d'urines. Les échantillons contrôles sont en noir, les échantillons du groupe dose forte en rouge et les échantillons du groupe faible dose en bleu. Paramètres du modèle :  $R^2_{cum} = 0,57$ ,  $Q^2_{cum} = 0,36$ .

<sup>1</sup> La photo de la zone ischémique est issue de l'étude sur les rats SHR exposés au Rofécocixib en raison du nombre limité de photos des lames ayant pu être prises. Néanmoins, les signes observés sont similaires dans l'étude sur le Diclofénac.

### 1.4.1 Evolution du profil métabolique du groupe exposé à la forte dose de Diclofénac

#### 1.4.1.1 Comparaison entre tous les prétests et la semaine 1 du groupe exposé à la forte dose

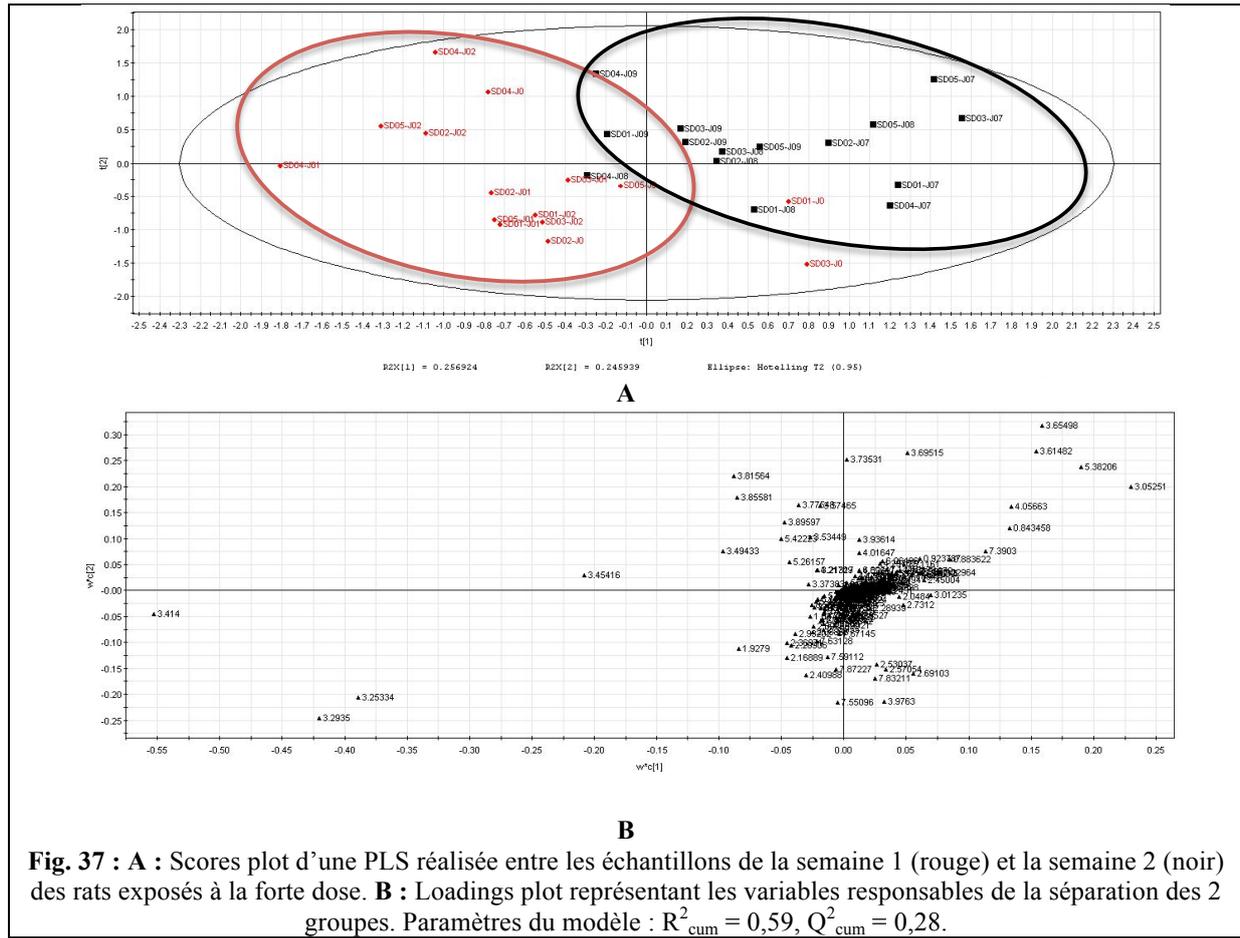
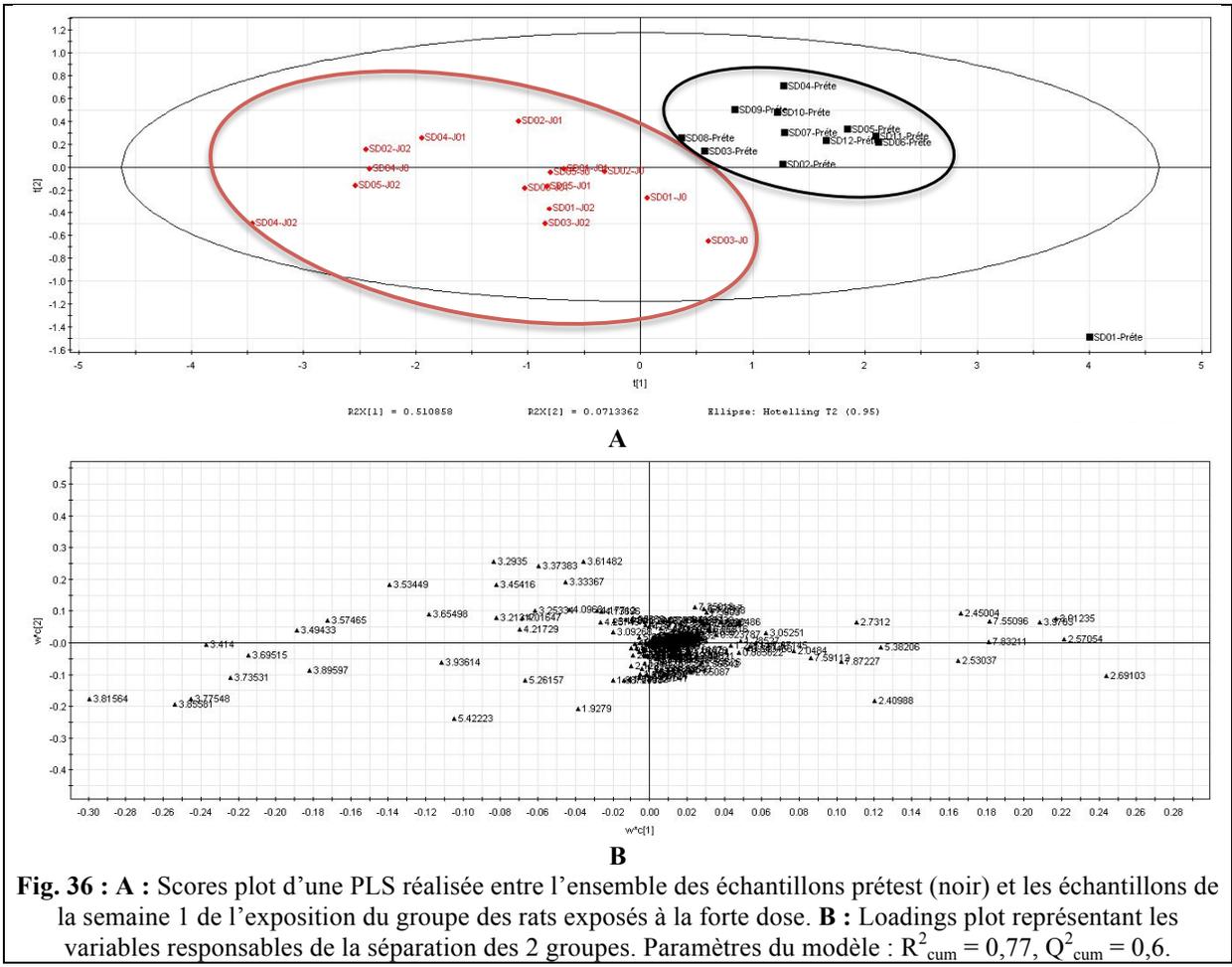
Dans cette comparaison sont inclus les échantillons prétests de l'ensemble des individus. Le scores plot de cette PLS montre une séparation entre les 2 groupes (Fig. 36). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente dans le groupe exposé à la forte dose</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue dans le groupe exposé à la forte dose</b>
Acétate (1,95 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))
Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))	Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))
Méthionine (2,14 (s), 2,16 (m), 2,65 (t), 3,86 (t)) ?	Citrate (2,53 (d), 2,69 (d))
Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))	Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))
Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))	Diméthylamine (2,72 (s))
	Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))
	Succinate (2,43 (s))

#### 1.4.1.2 Comparaison entre la semaine 1 et la semaine 2 du groupe exposé à la forte dose

Une séparation entre les 2 groupes est visualisée sur le scores plot (Fig. 37). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 2</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 2</b>
$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))	Acétate (1,95 (s))
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))	Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))
Citrate (2,53 (d), 2,69 (d))	Diméthylamine (2,72 (s))
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	Méthionine (2,14 (s), 2,16 (m), 2,65 (t), 3,86 (t)) ?
Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))	Succinate (2,43 (s))
Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))
Méthylamine (2,54 (s))	Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))



#### 1.4.1.3 Comparaison entre la semaine 1 et la semaine 3 du groupe exposé à la forte dose

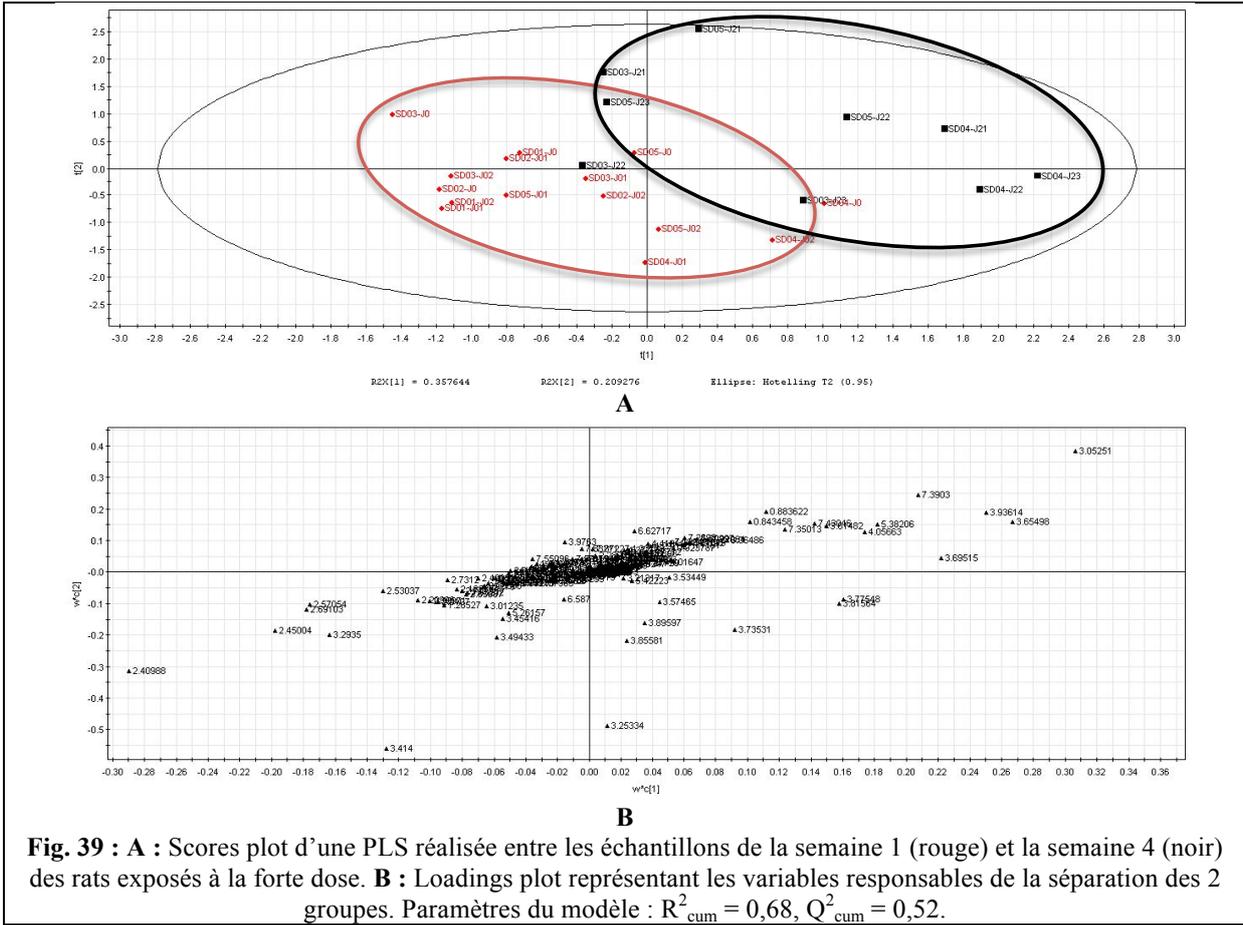
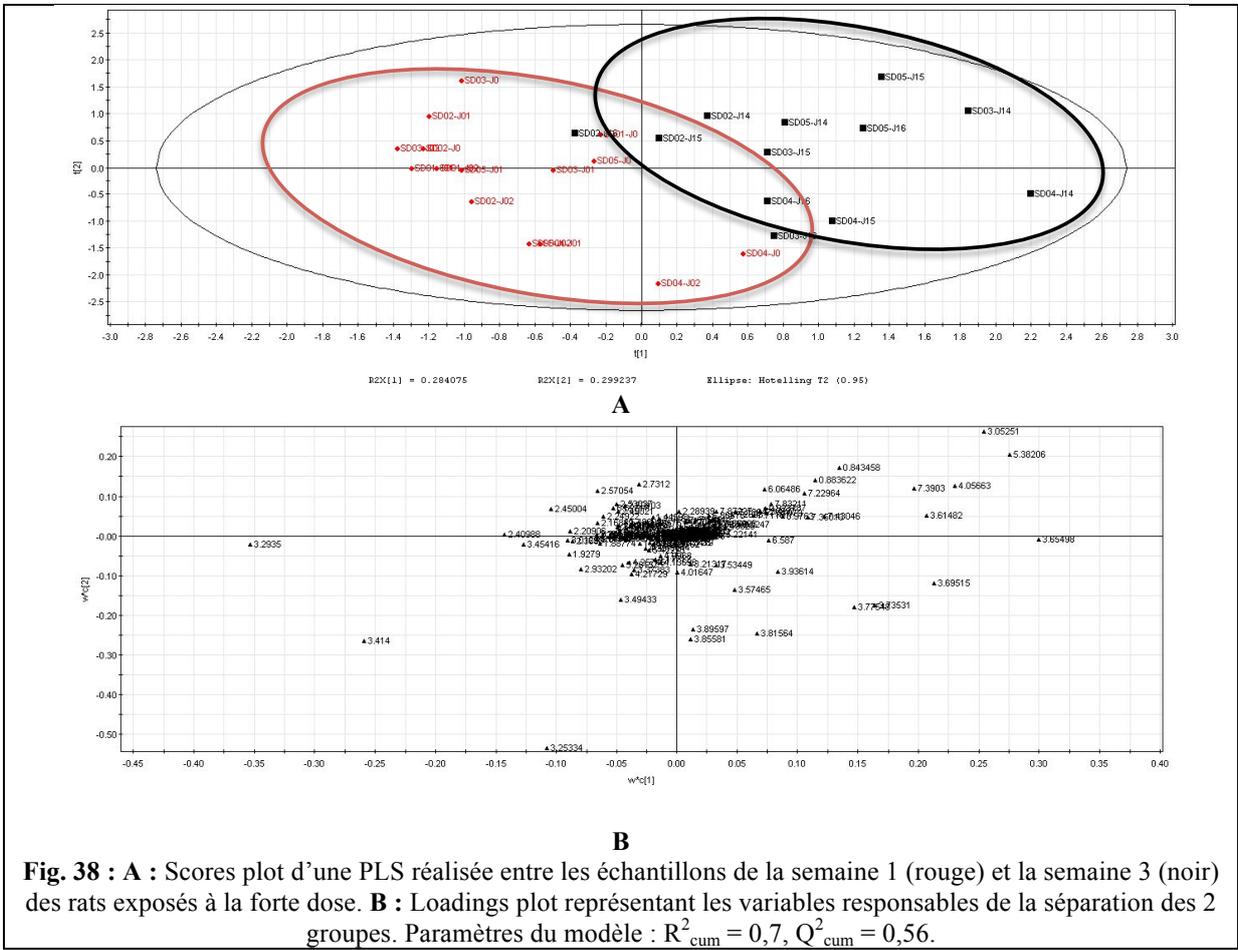
Le scores plot de cette PLS affiche une séparation entre les 2 groupes (Fig. 38). Les variables responsables de cette séparation sont mises en évidence par le loadings plot. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 3	Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 3
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s)) Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s)) Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d)) Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t)) Acétate (1,95 (s)) Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s)) Citrate (2,53 (d), 2,69 (d)) Diméthylamine (2,72 (s)) Diméthylglycine (2,90 (s)) ? Méthionine (2,14 (s), 2,16 (m), 2,65 (t), 3,86 (t)) ? Méthylamine (2,54 (s)) Succinate (2,43 (s)) Taurine (3,25 (t), 3,43 (s)) Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s)) Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))

#### 1.4.1.4 Comparaison entre la semaine 1 et la semaine 4 du groupe exposé à la forte dose

Le scores plot de cette PLS montre une séparation entre les 2 groupes (Fig. 39). Le loadings plot souligne les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 4	Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 4
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s)) Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s)) Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t)) Acétate (1,95 (s)) Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s)) Citrate (2,53 (d), 2,65 (d)) Diméthylamine (2,72 (s)) Diméthylglycine (2,90 (s)) ? Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d)) Méthylamine (2,54 (s)) Succinate (2,43 (s)) Taurine (3,25 (t), 3,43 (s)) Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s)) Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))



### 1.4.2 Comparaison du profil métabolique entre les groupes exposés à la forte et faible dose

#### 1.4.2.1 Comparaison entre le groupe exposé à la forte dose et le groupe exposé à la faible dose à la semaine 3

Le scores plot de cette PLS objective une séparation entre les 2 groupes (Fig. 40). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

Métabolites identifiés dont la concentration augmente dans le groupe exposé à la forte dose	Métabolites identifiés dont la concentration diminue dans le groupe exposé à la forte dose
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))
Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))	Citrate (2,53 (d), 2,65 (d))
Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64	Diméthylamine (2,72 (s))
	Méthylamine (2,54 (s))
	Succinate (2,43 (s))
	Taurine (3,25 (t), 3,43 (s))
	Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s))

### 1.4.3 Comparaison du profil métabolique entre le groupe exposé à la forte dose et le groupe contrôle

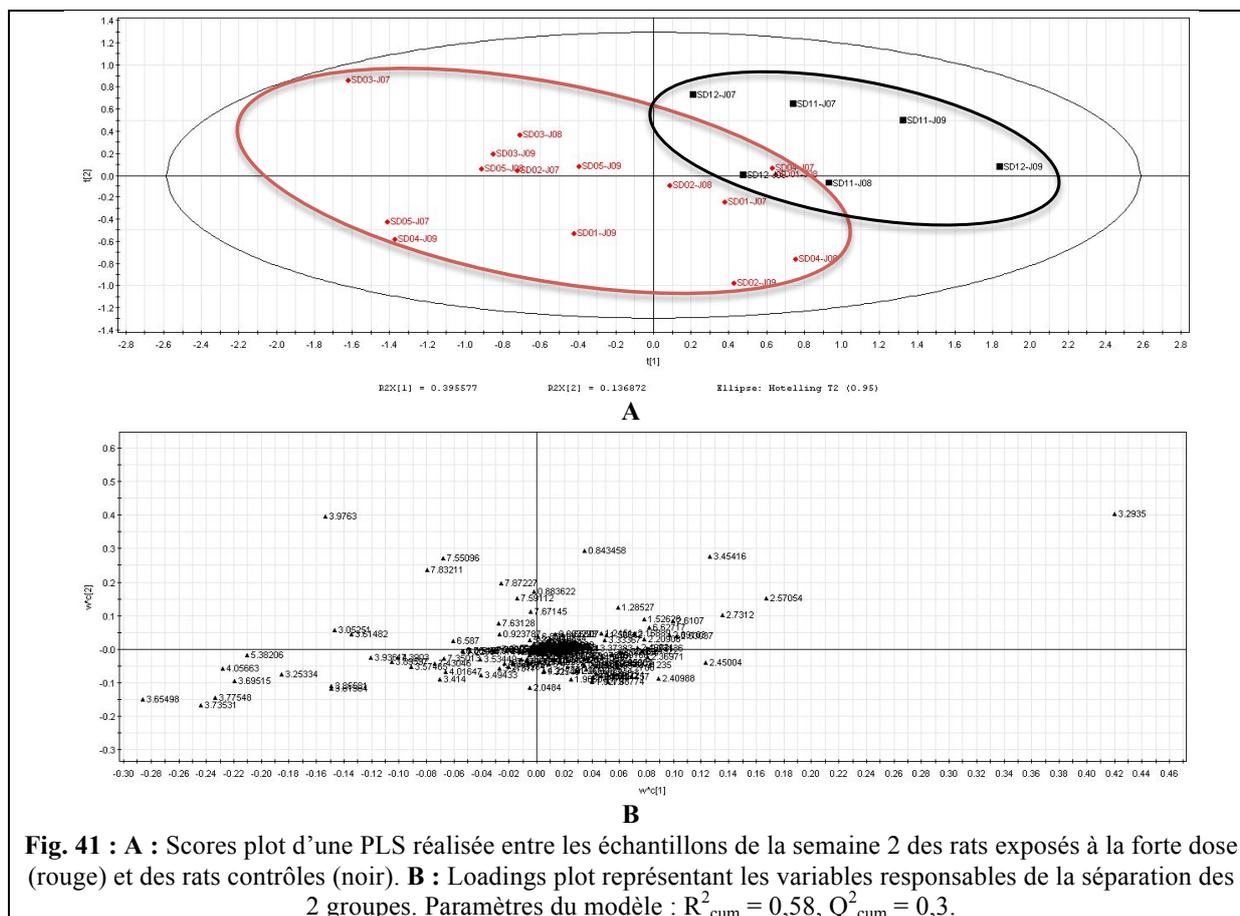
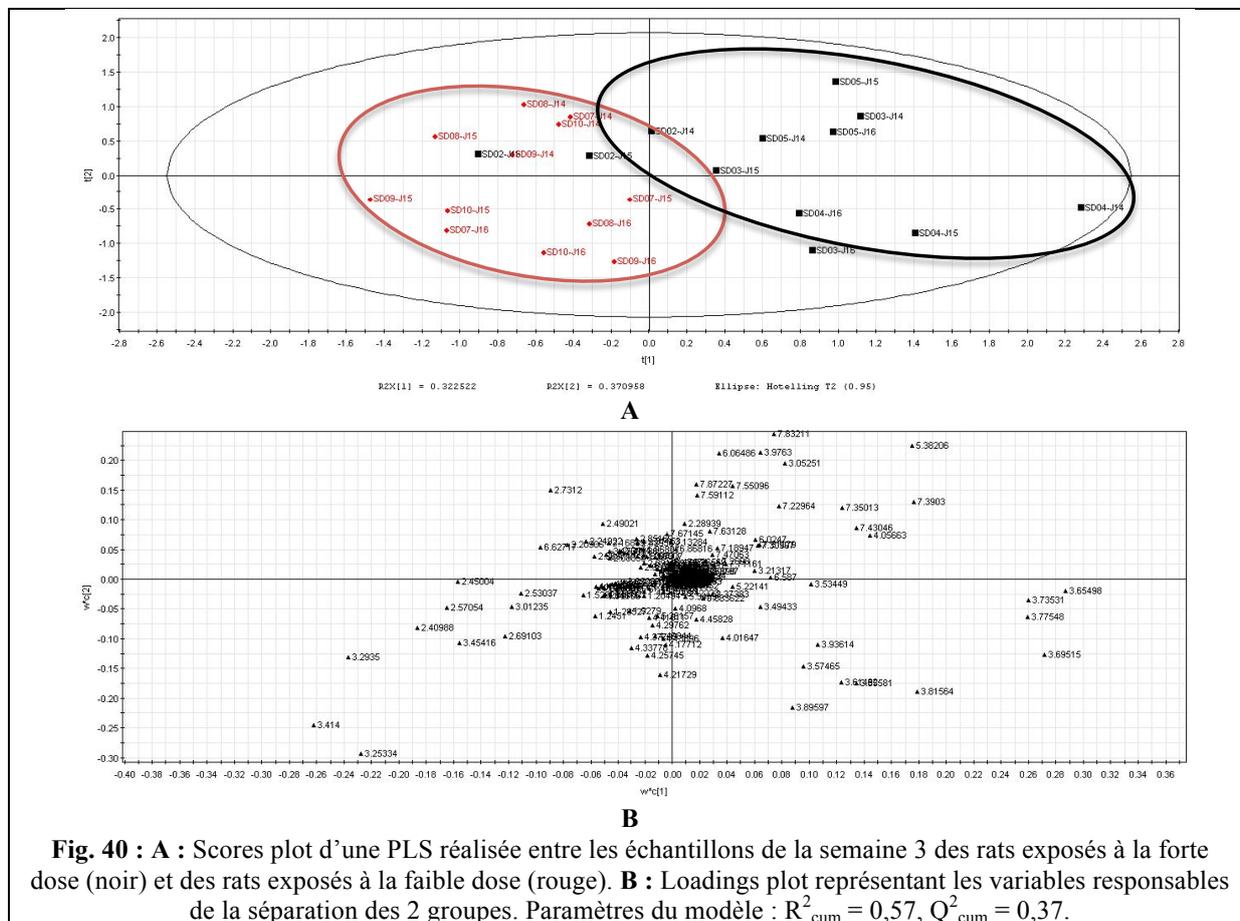
#### 1.4.3.1 Comparaison entre le groupe exposé à la forte dose et le groupe contrôle à la semaine 2

Le scores plot de cette PLS affiche une séparation entre les 2 groupes (Fig. 41). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

Métabolites identifiés dont la concentration augmente dans le groupe exposé à la forte dose	Métabolites identifiés dont la concentration diminue dans le groupe exposé à la forte dose
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))
Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))	Acétate (1,95 (s))
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	Citrate (2,53 (d), 2,65 (d))
Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))	Diméthylamine (2,72 (s))
Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))	Méthylamine (2,54 (s))
Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))	Succinate (2,43 (s))
	Taurine (3,25 (t), 3,43 (s))
	Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s))

## 1.5 Etude métabonomique sur les sera

L'étude métabonomique sur les sera n'a pu être réalisée, les spectres n'ayant pas été complètement acquis lors de la rédaction de ce travail.



## 2. Etude sur rats SHR exposés au Rofécoxib

### 2.1 Paramètres physiologiques

#### 2.1.1 *Gain de poids corporel*

L'évolution du gain de poids corporel moyen des rats, mesuré quotidiennement, est représentée en *Fig. 42*. Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'est mise en évidence par rapport au jour 1 pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

Il n'existe aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) lorsque les 3 groupes sont comparés ensemble (test de Kruskal-Wallis). Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) est retrouvée entre le groupe de rats exposés à la forte dose et le groupe de rats exposés à la faible dose au jour 3 (*Fig. 43*) (test de Wilcoxon bivarié).

#### 2.1.2 *Consommation de nourriture*

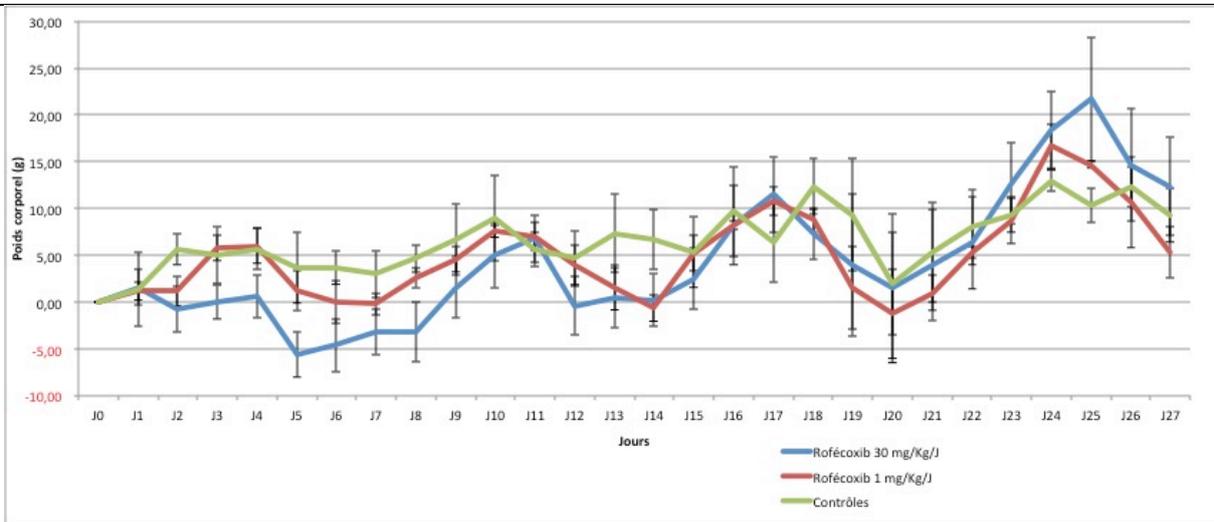
L'évolution de la consommation de nourriture moyenne sur 24 heures des rats pendant les séjours en cage à métabolisme est représentée en *Fig. 44*. Il n'existe pas de différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) par rapport au prétest, pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'est objectivée lorsque les 3 groupes sont comparés ensemble (test de Kruskal-Wallis). Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) est présente au jour 2 entre le groupe de rats exposés à la faible dose et le groupe de rats contrôles (test de Wilcoxon bivarié) (*Fig. 45*).

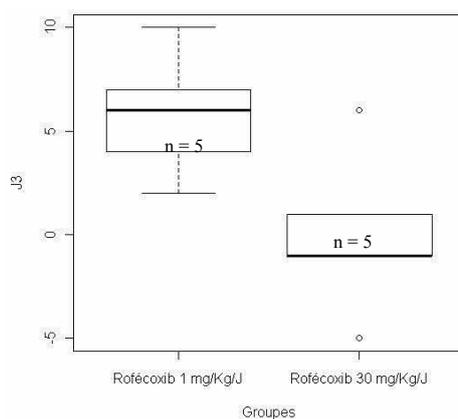
#### 2.1.3 *Consommation d'eau*

L'évolution de la consommation d'eau moyenne sur 24 heures des rats pendant les séjours en cage à métabolisme est représentée en *Fig. 46*. Il n'existe pas de différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) par rapport au prétest, pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

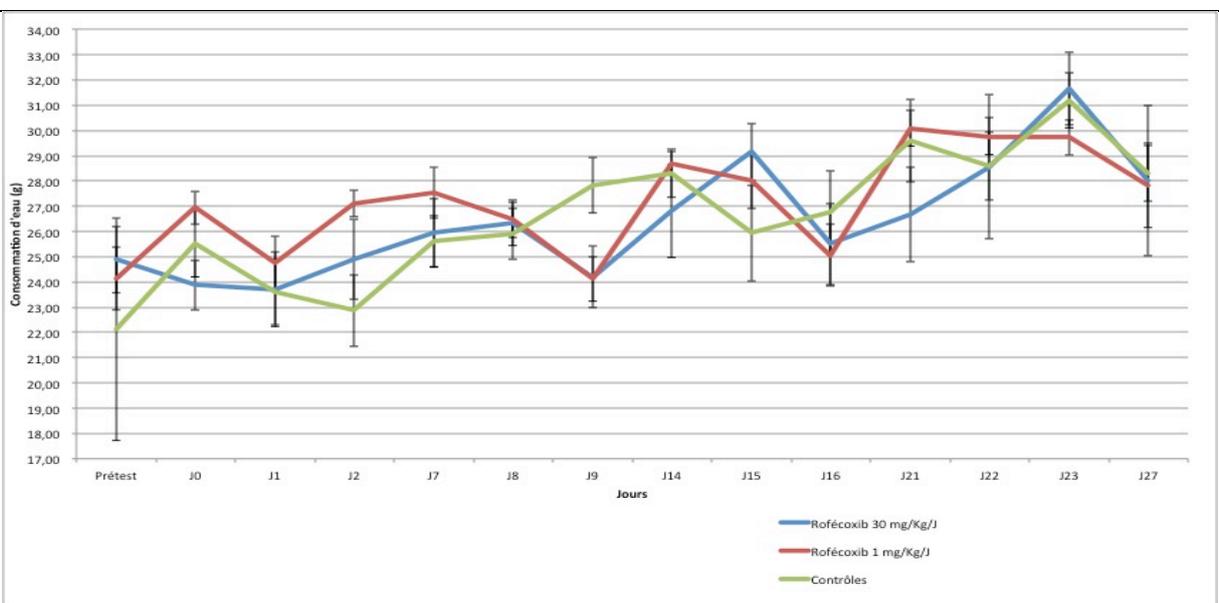
Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) est mise en évidence au jour 1 entre les 3 groupes (test de Kruskal-Wallis) et entre les 2 groupes exposés (test de Wilcoxon bivarié) (*Fig. 47*).



**Fig. 42 :** Evolution quotidienne depuis le début de l'exposition du gain de poids corporel moyen (+/- erreur standard) des rats SHR exposés au Rofécocixib 30 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Rofécocixib 1 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).



**Fig. 43 :** Boîtes de dispersion des valeurs de gain de poids corporel (g) du groupe de rats exposés à la forte dose et du groupe de rats exposés à la faible dose au jour 3.



**Fig. 44 :** Evolution au cours de l'exposition de la consommation moyenne (+/- erreur standard) sur 24 heures en nourriture pendant les séjours en cage à métabolisme des rats SHR exposés au Rofécocixib 30 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Rofécocixib 1 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).

#### 2.1.4 Tension artérielle

L'évolution de la tension artérielle systolique et diastolique des rats au cours de l'exposition est représentée en *Fig. 48*. Aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) n'est mise en évidence par rapport au prétest, pour chacun des trois groupes (test de Wilcoxon apparié).

#### 2.1.5 Mortalité

Un rat du groupe contrôle est mort spontanément avant le début de l'administration du véhicule.

### 2.2 Dosage des biomarqueurs protéiques de toxicité cardiaque

#### 2.2.1 Dosage de la cTnI

Les valeurs de la concentration sérique en cTnI avant exposition et au terme de l'exposition sont représentées en *Fig. 49*, pour le groupe de rats exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J et pour le groupe de rats contrôles. Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les valeurs de début et de fin d'exposition, pour chacun des groupes (test de Wilcoxon apparié).

Il n'existe aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les 2 groupes avant et en fin d'exposition (test de Wilcoxon bivarié).

#### 2.2.2 Dosage de la CMLC-1

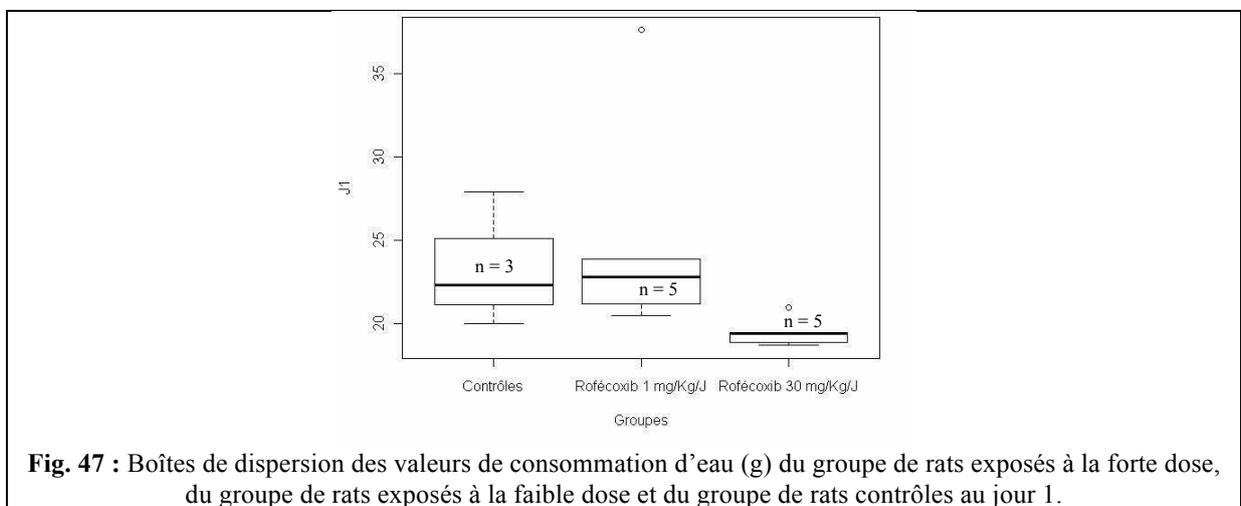
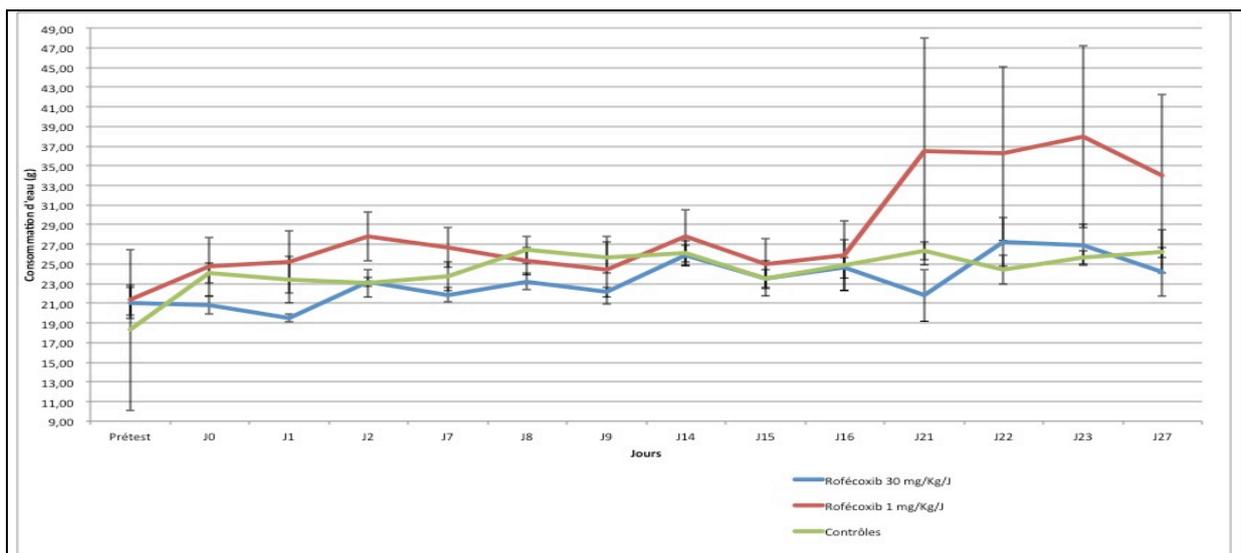
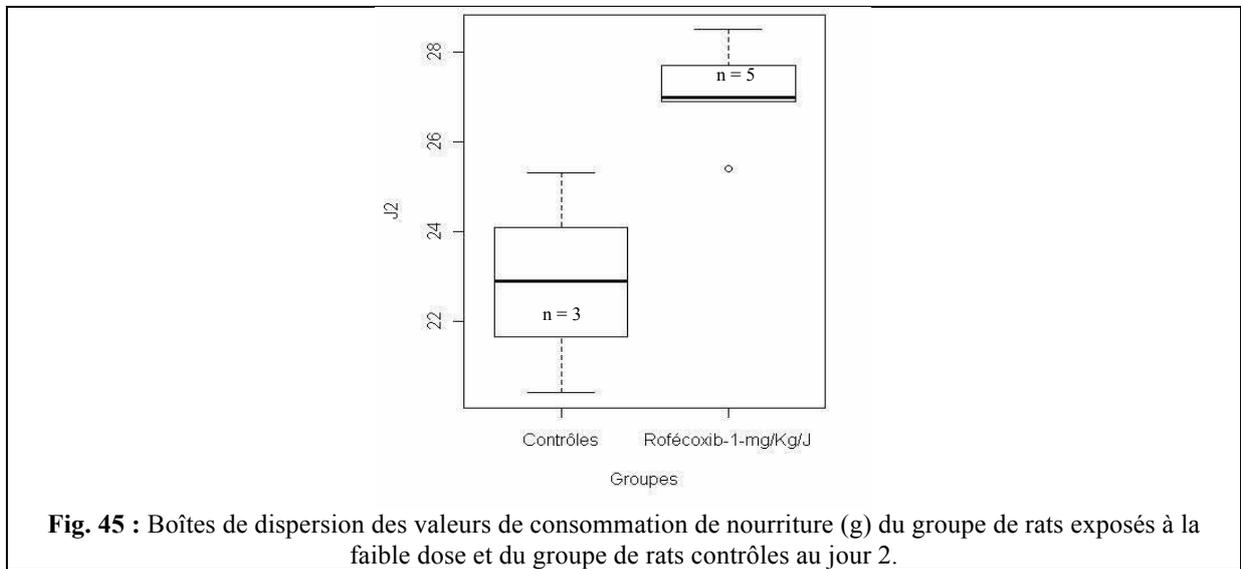
Les valeurs de la concentration sérique en CMLC-1 avant exposition et au terme de l'exposition sont représentées en *Fig. 50*, pour le groupe de rats exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J et pour le groupe de rats contrôles. Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les valeurs de début et de fin d'exposition, pour chacun des groupes (test de Wilcoxon apparié).

Il n'existe aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les 2 groupes avant et à la fin de l'exposition (test de Wilcoxon bivarié).

#### 2.2.3 Dosage de la myoglobine

Les valeurs de la concentration sérique en myoglobine avant exposition et au terme de l'exposition sont représentées en *Fig. 51*, pour le groupe de rats exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J et pour le groupe de rats contrôles. Il n'existe pas de différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les valeurs de début et de fin d'exposition, pour chacun des groupes (test de Wilcoxon apparié).

Il n'existe aucune différence statistiquement significative (p valeur > 0,05) entre les 2 groupes avant et à la fin de l'exposition (test de Wilcoxon bivarié).



### 2.3 Etude histologique

Des signes précoces de nécrose cardiaque par ischémie sont retrouvés chez certains individus :

- Groupe exposé à la forte dose : un individu sacrifié au jour 21 et deux individus sacrifiés au jour 28.
- Groupe exposé à la faible dose : un individu sacrifié au jour 14 et les trois individus sacrifiés au jour 28.
- Groupe contrôle : un individu sacrifié au jour 28.

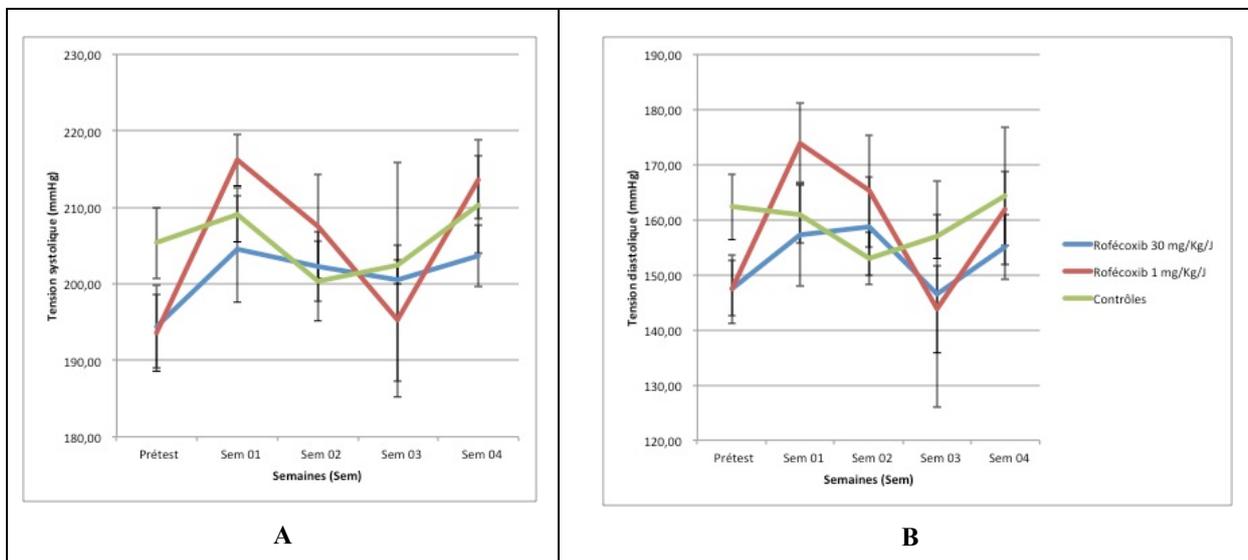
Les signes identifiés, visibles en *Fig. 52*, sont caractéristiques d'une nécrose précoce (environ 12 à 24 h après infarctus) :

- Coloration éosinophile du cytoplasme
- Perte de la striation cytoplasmique
- Coloration hétérochromatique des noyaux
- Parfois un petit infiltrat inflammatoire

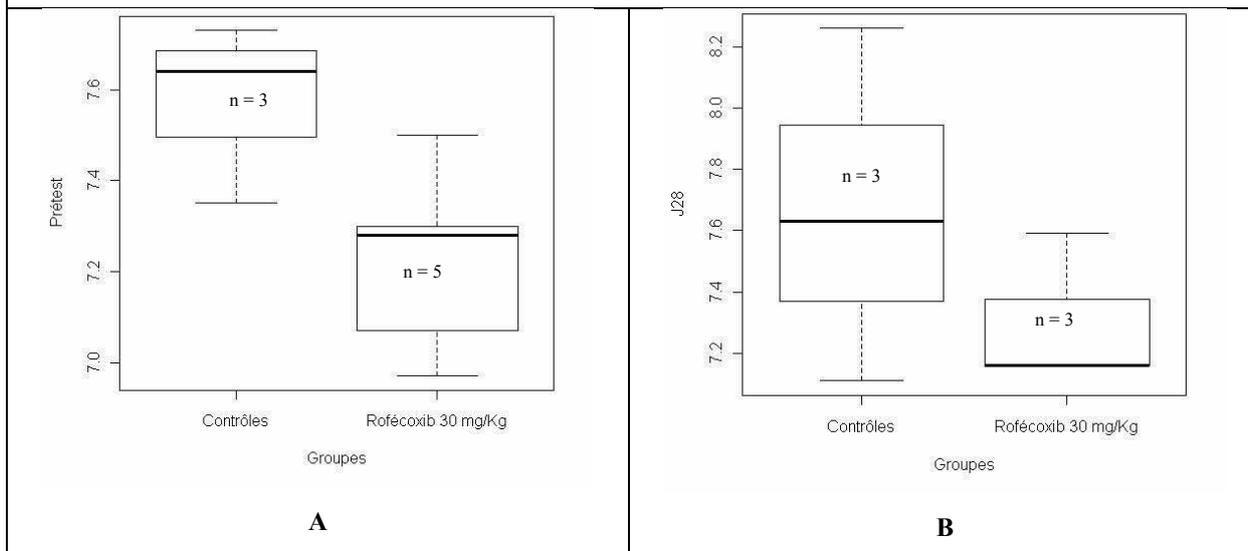
Ces signes sont retrouvés sur des cellules décrivant une petite zone ventriculaire souvent diffuse. Chez un individu du groupe exposé à la faible dose et sacrifié au jour 28, plusieurs petites zones ischémiques sont retrouvées.

La *Fig. 52* montre également les caractéristiques de cardiomyocytes normaux, pour comparaison :

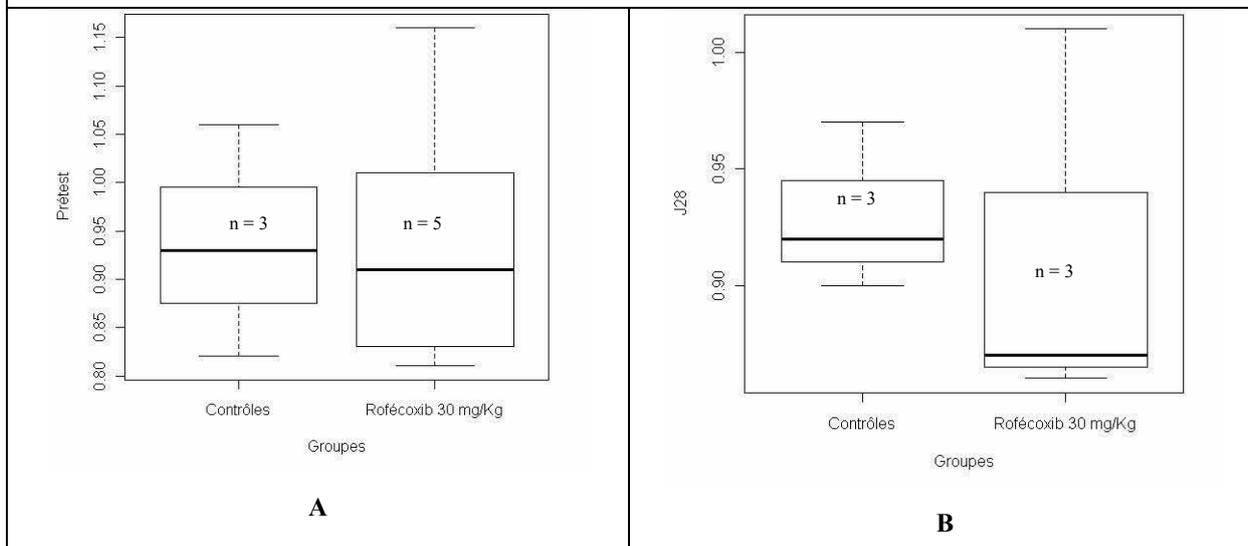
- Noyaux euchromatiques centraux des cardiomyocytes bien visibles
- Coloration normale du cytoplasme
- Striation cytoplasmique présente
- Trait scalariforme d'aspect normal
- Pas d'infiltrat inflammatoire
- Absence de tissu de granulation et de fibrose cicatricielle



**Fig. 48 :** Evolution au cours de l'exposition de la tension artérielle systolique moyenne (+/- erreur standard) (A) et diastolique moyenne (+/- erreur standard) (B) des rats SHR exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J (bleu), des rats SHR exposés au Rofécoxib 1 mg/Kg/J (rouge) et des rats SHR contrôles (vert).



**Fig. 49 :** Boîtes de dispersion des valeurs de concentration sérique (ng/ml) de la cTnI avant exposition (A) et au terme de l'exposition (B) des rats exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J et des rats contrôles.



**Fig. 50 :** Boîtes de dispersion des valeurs de concentration sérique (ng/ml) de la CMLC-1 avant exposition (A) et au terme de l'exposition (B) des rats exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J et des rats contrôles.

## 2.4 Etude métabonomique sur les urines

Un premier modèle d'analyse en composantes principales a été effectué sur l'ensemble des échantillons d'urine de tous les rats afin d'observer la formation éventuelle de groupes (Fig. 53). Le scores plot ne montre pas de tendance marquée à la formation de groupes. Les données des rats contrôle de l'étude sur le Diclofénac ont été incluses dans les analyses afin d'augmenter le nombre d'échantillons contrôles.

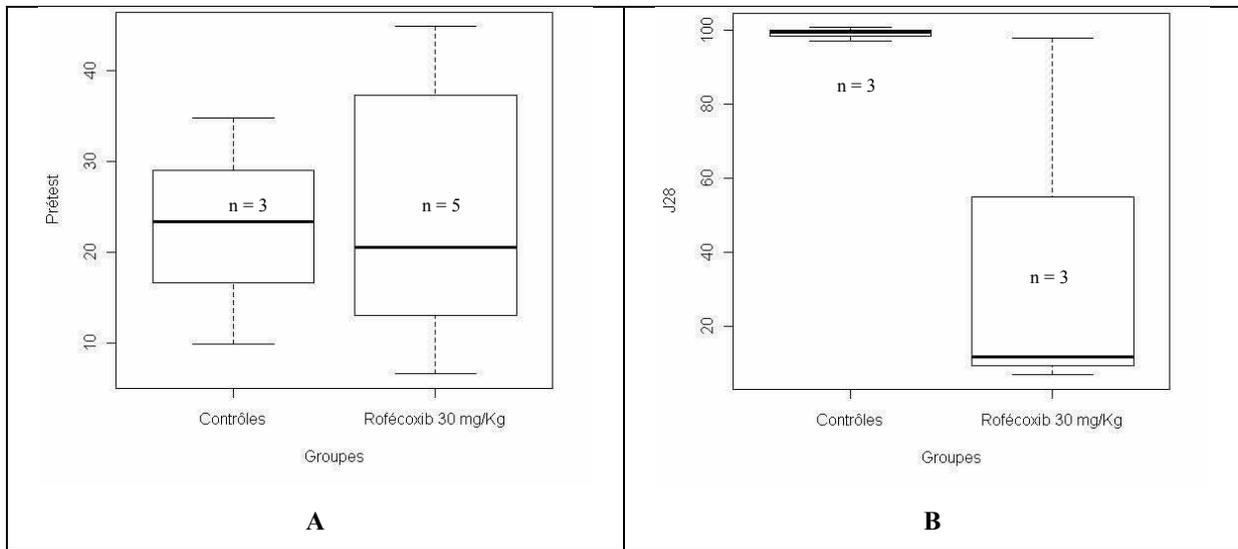
Différentes comparaisons ont été réalisées par PLS entre des sous-groupes d'échantillons d'urine pour évaluer d'une part l'évolution dans le temps du profil métabolique du groupe des rats exposés à la forte dose de Rofécocixib et d'autre part pour mettre en évidence les différences des profils métaboliques entre le groupe exposé à la forte dose de Rofécocixib et les deux autres groupes (faible dose et contrôles). Seules les comparaisons les plus pertinentes sont reprises ( $R^2_{cum} > 0,5$ ,  $Q^2_{cum} > 0,25$ , test des permutations validé). Le choix d'une méthode supervisée repose sur l'intérêt de mettre en évidence les variables expliquant les différences entre les groupes déterminés et renseignés au système.

### 2.4.1 Evolution du profil métabolique du groupe exposé à la forte dose de Rofécocixib

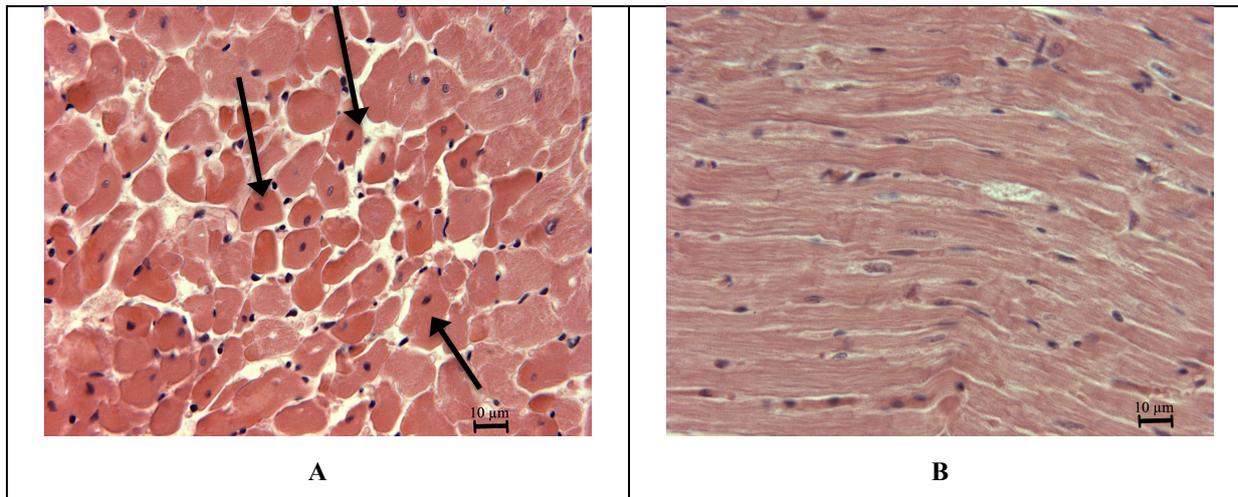
#### 2.4.1.1 Comparaison entre tous les prétests et la semaine 1 du groupe exposé à la forte dose

Les échantillons du jour 0 ont été retirés de l'analyse car leur profil métabolique était similaire à celui des échantillons prétest. Tous les échantillons prétests de l'ensemble des rats ont été inclus dans la comparaison. Le scores plot de cette PLS objective une séparation entre les 2 groupes (Fig. 54). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

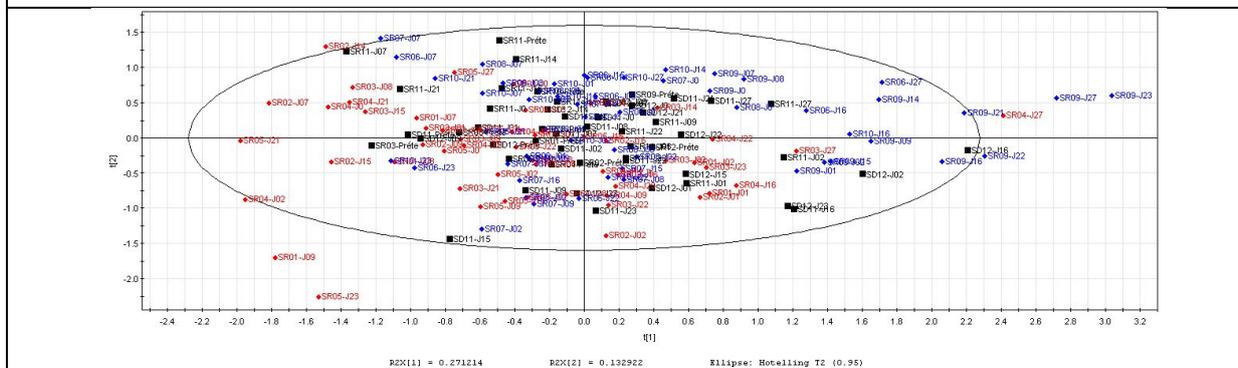
<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 1</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 1</b>
Taurine (3,25 (t), 3,45 (t)) Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t)) Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s)) Citrate (2,53 (d), 2,69 (d)) Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d)) Succinate (2,43 (s))



**Fig. 51 :** Boîtes de dispersion des valeurs de concentration sérique (ng/ml) de la myoglobine avant exposition (A) et au terme de l'exposition (B) des rats exposés au Rofécoxib 30 mg/Kg/J et des rats contrôles.



**Fig. 52 :** Comparaison histologique entre une zone myocardique ischémique, issue d'un rat exposé à la faible dose de Rofécoxib (A) et une zone myocardique saine, issue d'un rat contrôle (B). La zone myocardique ischémique présente des signes caractéristiques de nécrose précoce sur un groupe de cardiomyocytes (flèches).  
Grossissement : 250 x. Coloration : Hématoxyline, éosine, safran.



**Fig. 53 :** Scores plot d'une PCA réalisée sur l'ensemble des échantillons d'urine. Les échantillons contrôles sont en noir, les échantillons du groupe dose forte en rouge et les échantillons du groupe faible dose en bleu.  
Paramètres du modèle :  $R^2_{cum} = 0,61$ ,  $Q^2_{cum} = 0,47$ .

#### 2.4.1.2 Comparaison entre la semaine 1 et la semaine 2 du groupe exposé à la forte dose

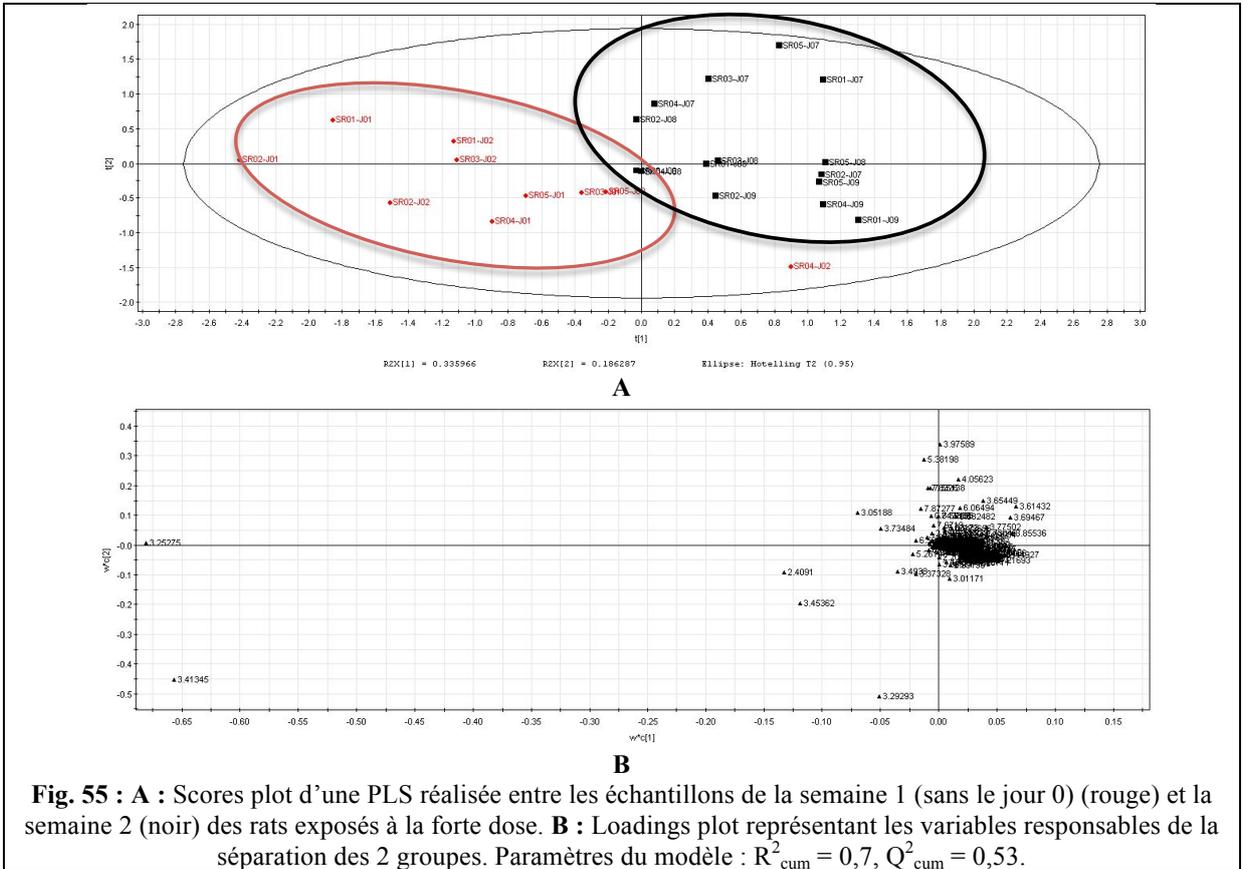
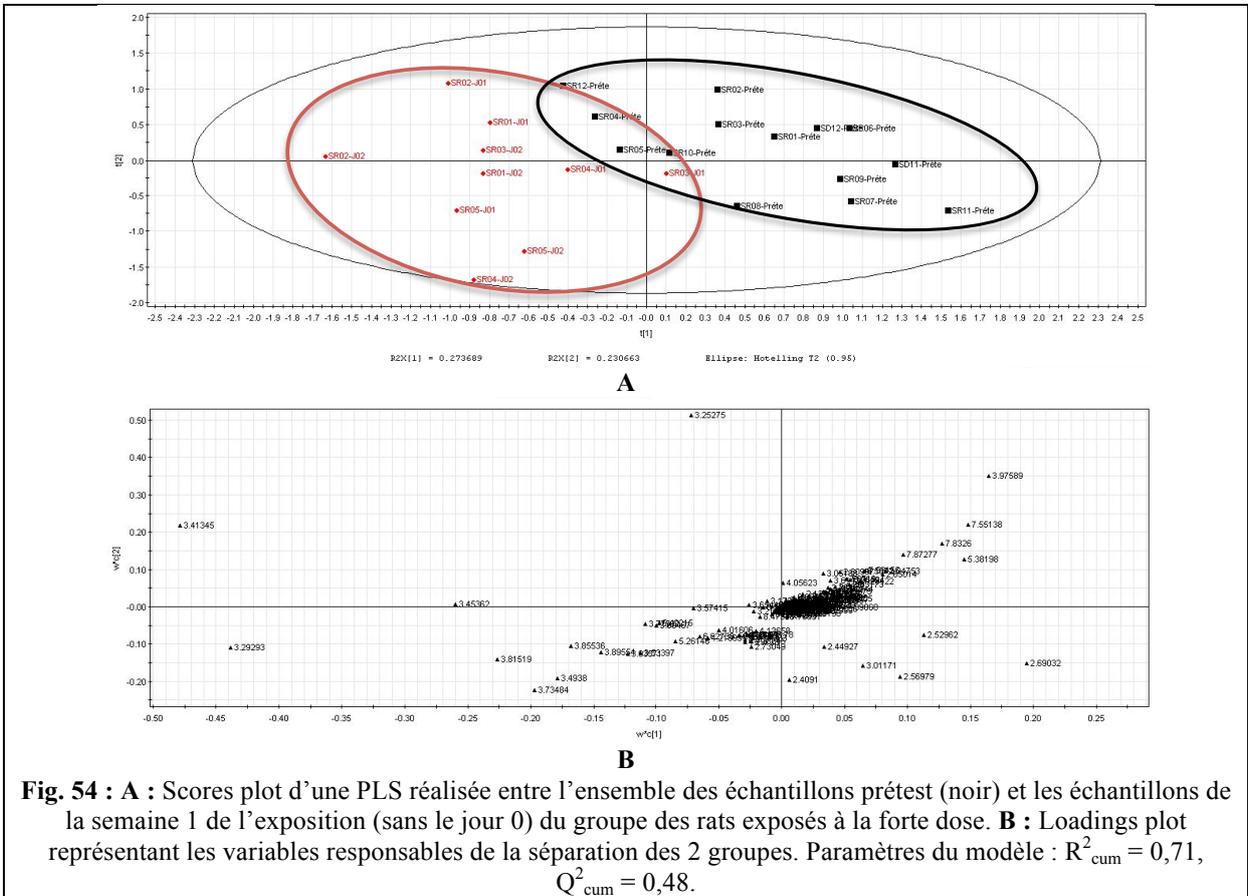
Les échantillons du jour 0 ont été retirés de l'analyse car leur profil métabolique était similaire à celui des échantillons prétest. Une séparation entre les 2 groupes est affichée sur le scores plot (Fig. 55). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 2</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 2</b>
$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))	Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))	Succinate (2,43 (s))
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))
Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))	

#### 2.4.1.3 Comparaison entre la semaine 1 et le jour 27 du groupe exposé à la forte dose

Les échantillons du jour 0 ont été retirés de l'analyse car leur profil métabolique était similaire à celui des échantillons prétest. Le scores plot de cette PLS montre une séparation entre les 2 groupes (Fig. 56). Les variables responsables de cette séparation sont mises en évidence sur le loadings plot. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente au dernier jour de l'exposition (J27)</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue au dernier jour de l'exposition (J27)</b>
Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))
Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))	Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))
	Citrate (2,53 (d), 2,65 (d))
	Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))
	Diméthylamine (2,72 (s))
	Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))
	Succinate (2,43 (s))
	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))
	Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))



### 2.4.2 Comparaison du profil métabolique entre les groupes exposés à la forte et faible dose

Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les 2 groupes exposés parmi les comparaisons effectuées :

Comparaison	Modèle	Nombre de composantes	R <sup>2</sup> <sub>cum</sub>	Q <sup>2</sup> <sub>cum</sub>	Test des permutations	P valeur (CV-ANOVA)
Semaine 1	PLS	2	0,53	0,03	Non-validé	1
Semaine 2	PLS	2	0,54	0,01	Non-validé	1
Semaine 3	PLS	2	0,61	0,15	Validé	1
Semaine 4	PLS	2	0,49	-0,06	Non-validé	1
Jour 7	PLS	2	0,9	-0,21	Non-validé	1
Jour 14	PLS	2	0,97	0,46	Non-validé	1
Jour 21	PLS	2	0,69	0,12	Non-validé	0,86
Jour 27	PLS	2	0,53	-0,08	Non-validé	1

En effet, le paramètre Q<sup>2</sup><sub>cum</sub> très bas (< 0,25) décrit une mauvaise prédictibilité du modèle PLS, corroborée par un test des permutations non-validé. De même, la P valeur proche de 1 obtenue par le test CV-ANOVA indique que les groupes comparés par la PLS ne sont pas significativement différents.

### 2.4.3 Comparaison du profil métabolique entre le groupe exposé à la forte dose et le groupe contrôle

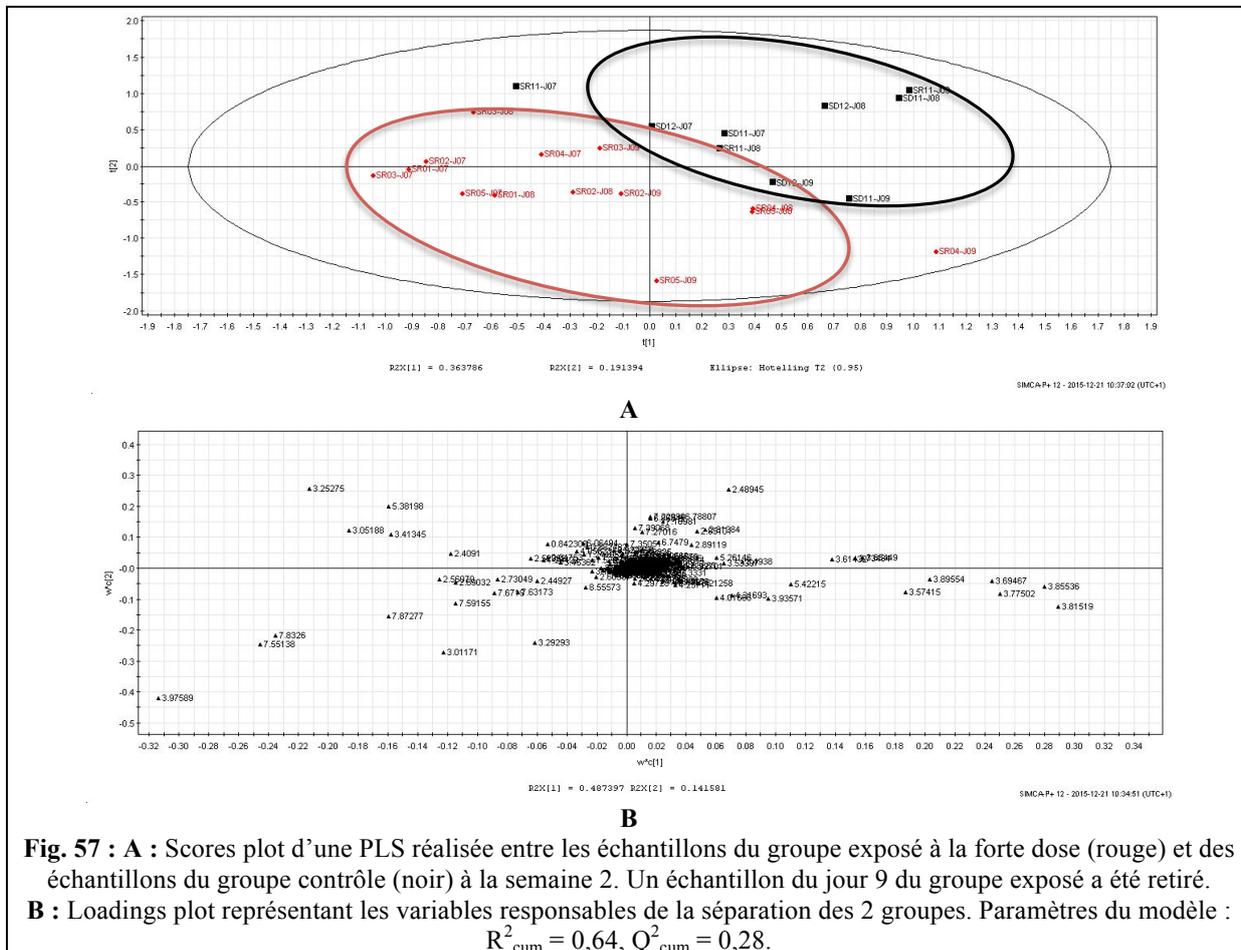
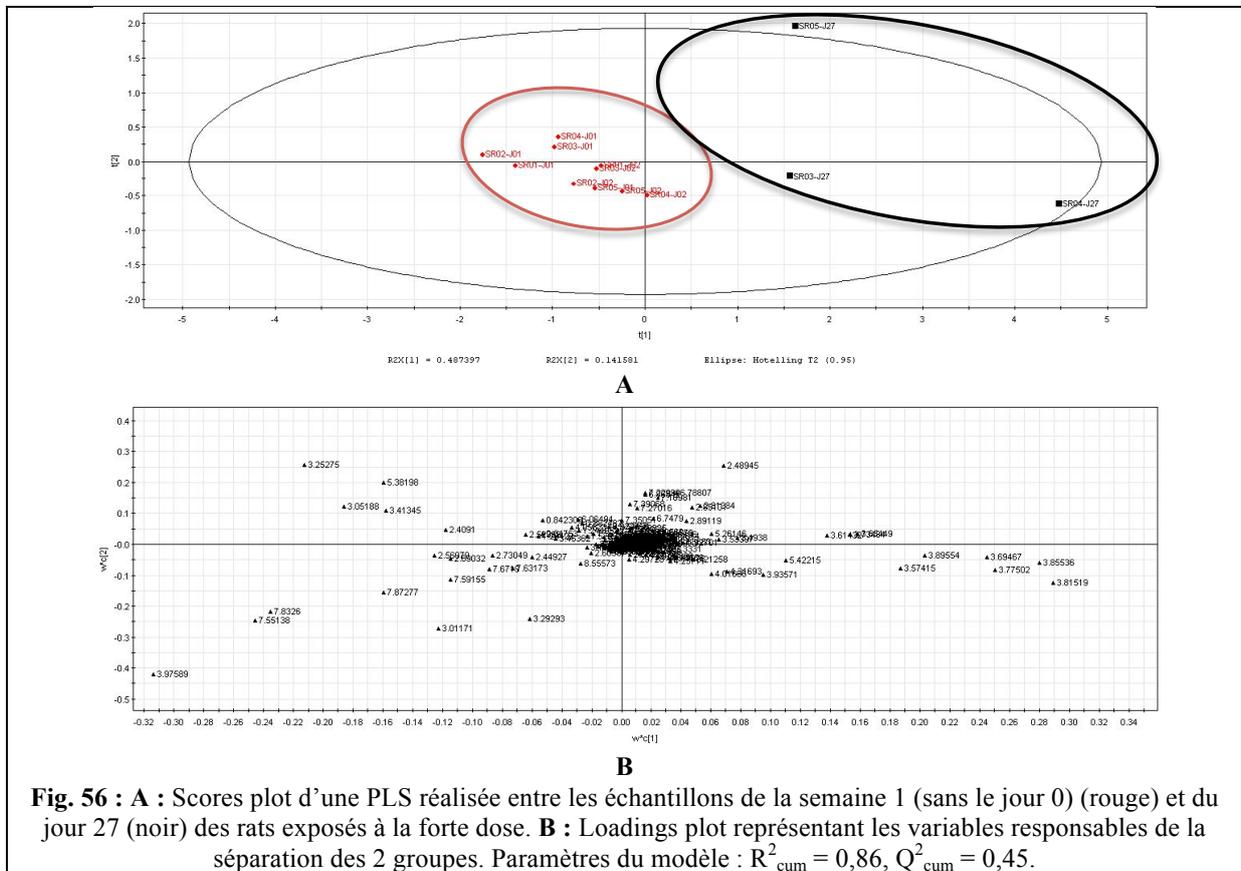
#### 2.4.3.1 Comparaison entre le groupe exposé à la forte dose et le groupe contrôle à la semaine 2

Un échantillon du jour 9 du groupe exposé à la forte dose a été retiré de l'analyse car son profil métabolique différait de manière forte des 2 groupes comparés. Le scores plot de la PLS montre une séparation entre les 2 groupes (Fig. 57). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

Métabolites identifiés dont la concentration augmente dans le groupe exposé à la forte dose	Métabolites identifiés dont la concentration diminue dans le groupe exposé à la forte dose
α-ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))	Indoxyl sulfate (7,20 (t), 7,28 (t), 7,34 (s), 7,50 (d))
Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))	Succinate (2,43 (s))
Citrate (2,53 (d), 2,65 (d))	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	
Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))	

## 2.5 Etude métabonomique sur les sera

L'étude métabonomique sur les sera n'a pu être réalisée, les spectres n'ayant pas été complètement acquis lors de la rédaction de ce travail.



### 3. Etude sur rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib

#### 3.1 Paramètres physiologiques

##### 3.1.1 *Gain de poids corporel*

L'évolution du gain de poids corporel moyen des rats, mesuré quotidiennement, est représentée en *Fig. 58*. Aucune différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $> 0,05$ ) n'est mise en évidence par rapport au jour 1 pour chacun des deux groupes (test de Wilcoxon apparié).

Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) est retrouvée entre le groupe de rats exposés et le groupe de rats contrôles au jour 27 (*Fig. 59*) (test de Wilcoxon bivarié).

##### 3.1.2 *Consommation de nourriture*

L'évolution de la consommation de nourriture moyenne sur 24 heures des rats pendant les séjours en cage à métabolisme est représentée en *Fig. 60*. Aucune différence statistiquement significative n'est déterminée par rapport au prétest, pour chaque groupe ( $p$  valeur  $> 0,05$ , test de Wilcoxon apparié).

Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) est présente au jour 8 entre le groupe de rats exposés et le groupe de rats contrôles (test de Wilcoxon bivarié) (*Fig. 61*).

##### 3.1.3 *Consommation d'eau*

L'évolution de la consommation d'eau moyenne sur 24 heures des rats pendant les séjours en cage à métabolisme est représentée en *Fig. 62*. Aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence par rapport au prétest, pour chaque groupe ( $p$  valeur  $> 0,05$ , test de Wilcoxon apparié).

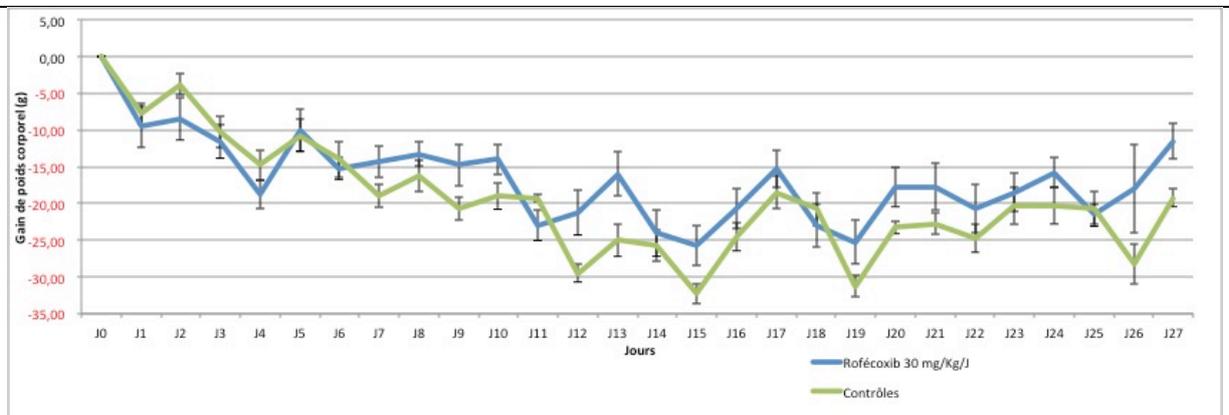
Une différence statistiquement significative ( $p$  valeur  $< 0,05$ ) est présente au jour 8 entre le groupe de rats exposés et le groupe de rats contrôles (test de Wilcoxon bivarié) (*Fig. 63*).

##### 3.1.4 *Tension artérielle*

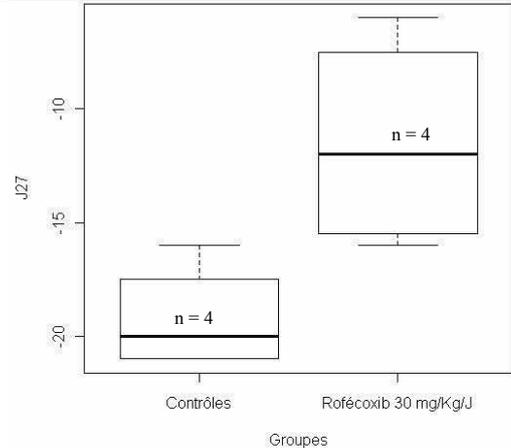
L'évolution de la tension artérielle systolique et diastolique des rats au cours de l'exposition est représentée en *Fig. 64*. Aucune différence statistiquement significative n'existe par rapport au prétest, pour chaque groupe ( $p$  valeur  $> 0,05$ , test de Wilcoxon apparié).

##### 3.1.5 *Mortalité*

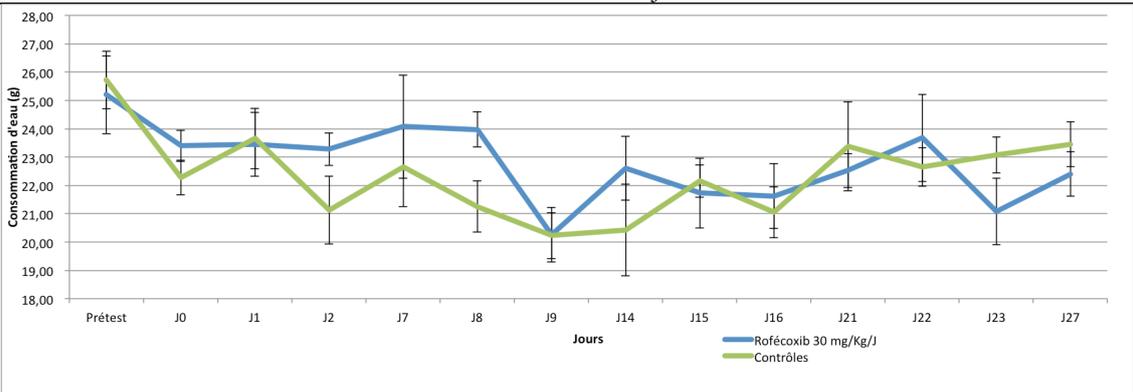
Aucune mortalité spontanée n'est apparue dans chacun des 2 groupes de rats.



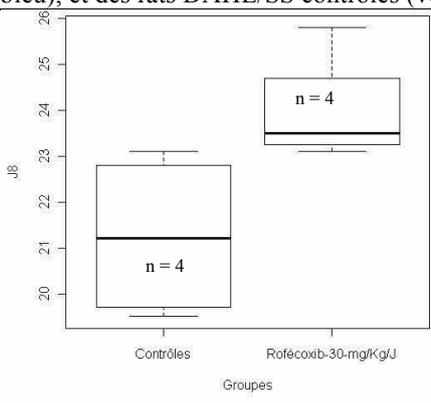
**Fig. 58 :** Evolution quotidienne depuis le début de l'exposition du gain de poids corporel moyen (+/- erreur standard) des rats DAHL/SS exposés au Rofécobix 30 mg/Kg/J (bleu) des rats DAHL/SS contrôles (vert).



**Fig. 59 :** Boîtes de dispersion des valeurs de gain de poids corporel (g) des rats DAHL/SS exposés et des rats DAHL/SS contrôles au jour 27.



**Fig. 60 :** Evolution au cours de l'exposition de la consommation moyenne (+/- erreur standard) sur 24 heures en nourriture pendant les séjours en cage à métabolisme des rats DAHL/SS exposés au Rofécobix 30 mg/Kg/J (bleu), et des rats DAHL/SS contrôles (vert).



**Fig. 61 :** Boîtes de dispersion des valeurs de consommation de nourriture (g) du groupe de rats exposés et du groupe de rats contrôles au jour 8.

### 3.2 Etude histologique

L'étude histologique sur les rats DAHL/SS n'a pu être réalisée avant la rédaction de ce travail.

### 3.3 Etude métabonomique sur les urines

Un premier modèle d'analyse en composantes principales a été effectué sur l'ensemble des échantillons d'urine de tous les rats afin d'observer la formation éventuelle de groupes (*Fig. 65*). 11 échantillons ont été retirés de l'analyse car leurs spectres acquis étaient de mauvaise qualité et n'ont pu être réanalysés avant la rédaction de ce mémoire. Le scores plot ne met pas en évidence une tendance marquée à la formation de groupes.

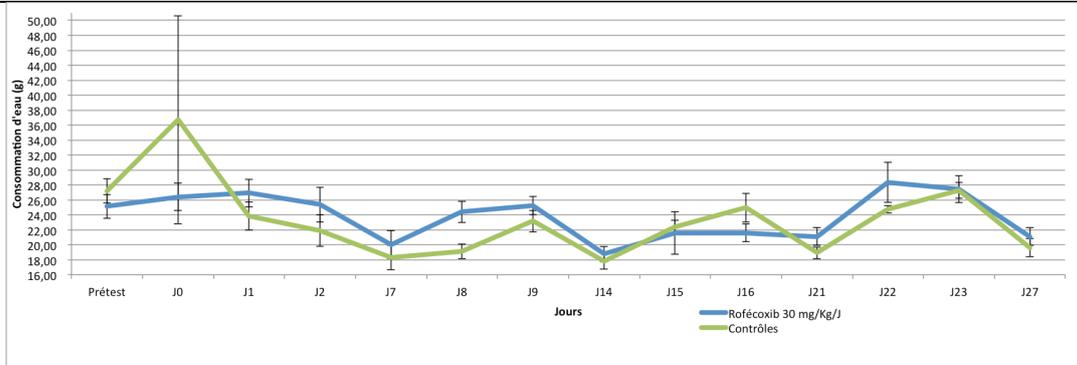
Différentes comparaisons ont été réalisées par PLS entre des sous-groupes d'échantillons d'urine pour évaluer d'une part l'évolution dans le temps du profil métabolique du groupe des rats exposés à la forte dose de Rofécoxib et d'autre part pour mettre en évidence les différences des profils métaboliques entre le groupe exposé à la forte dose de Rofécoxib et les deux autres groupes (faible dose et contrôles). Seules les comparaisons les plus pertinentes sont reprises ( $R^2_{cum} > 0,5$ ,  $Q^2_{cum} > 0,25$ , test des permutations validé). Le choix d'une méthode supervisée repose sur l'intérêt de mettre en évidence les variables expliquant les différences entre les groupes déterminés et renseignés au système.

#### 3.3.1 Evolution du profil métabolique du groupe exposé au Rofécoxib

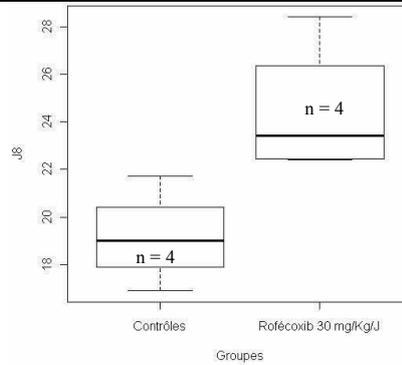
##### 3.3.1.1 Comparaison entre tous les prétests et la semaine 1 du groupe exposé à la forte dose

Les échantillons du jour 0 ont été retirés de l'analyse car leur profil métabolique était similaire à celui des échantillons prétest. Le scores plot de cette PLS décrit une séparation entre les 2 groupes (*Fig. 66*). Le loadings plot met en évidence les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

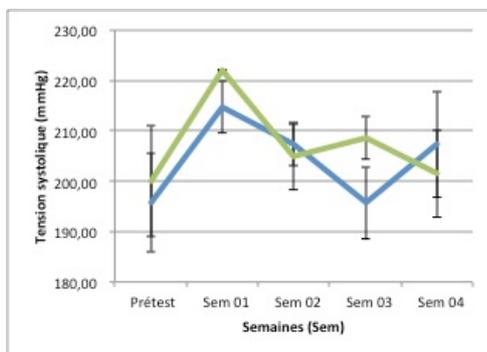
<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 1</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 1</b>
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))
Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s))	Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))
Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))	Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s))
	Citrate (2,53 (d), 2,69 (d))
	Diméthylamine (2,72 (s))
	Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))
	Succinate (2,43 (s))
	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))



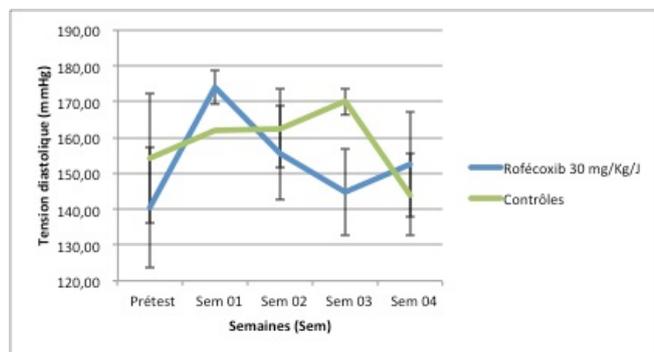
**Fig. 62 :** Evolution au cours de l'exposition de la consommation moyenne (+/- erreur standard) sur 24 heures en eau pendant les séjours en cage à métabolisme des rats DAHL/SS exposés au Rofécobix 30 mg/Kg/J (bleu), et des rats DAHL/SS contrôles (vert).



**Fig. 63 :** Boîtes de dispersion des valeurs de consommation d'eau (g) du groupe de rats exposés et du groupe de rats contrôles au jour 8.

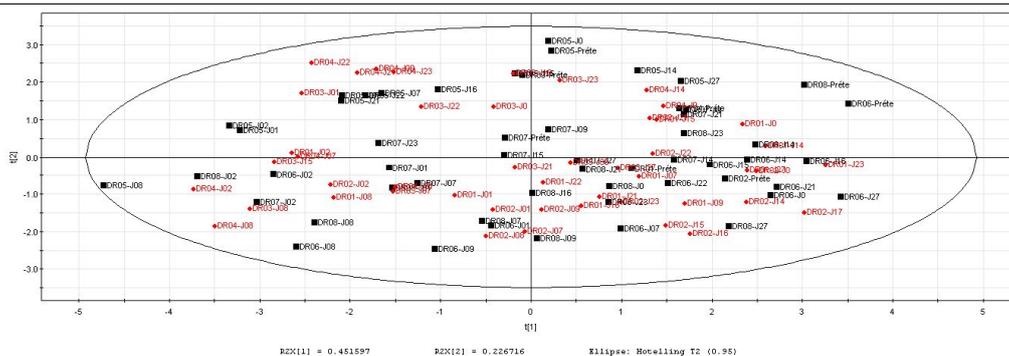


**A**



**B**

**Fig. 64 :** Evolution au cours de l'exposition de la tension artérielle systolique moyenne (+/- erreur standard) (A) et diastolique moyenne (+/- erreur standard) (B) des rats DAHL/SS exposés au Rofécobix 30 mg/Kg/J (bleu) et des rats DAHL/SS contrôles (vert).



**Fig. 65 :** Scores plot d'une PCA réalisée sur l'ensemble des échantillons d'urine. Les échantillons contrôles sont en noir et les échantillons des rats exposés en rouge. 11 échantillons (5 du groupe exposé, 6 du groupe contrôles) de temps différents ont été retirés à cause d'une mauvaise qualité des spectres RMN. Paramètres du modèle :  $R^2_{cum} = 0,68$ ,  $Q^2_{cum} = 0,55$ .

### 3.3.1.2 Comparaison entre la semaine 1 et la semaine 3

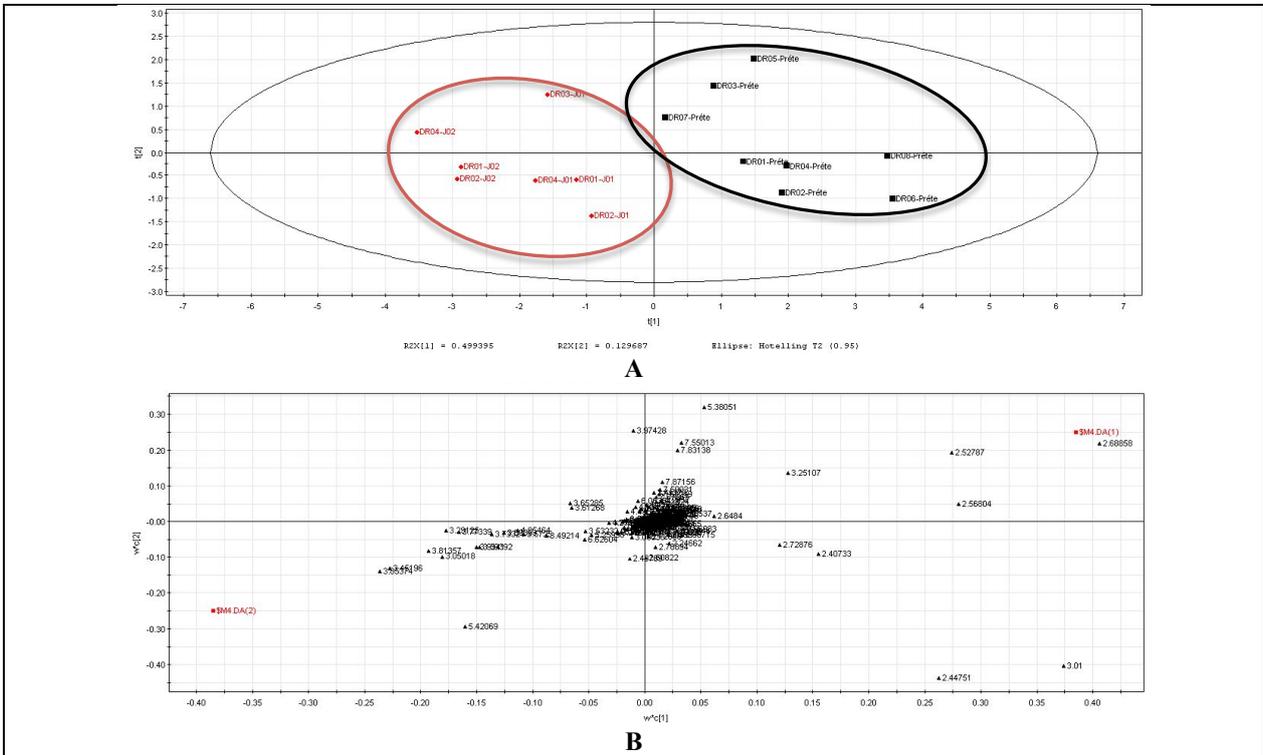
Les échantillons du jour 0 ont été retirés de l'analyse car leur profil métabolique était similaire à celui des échantillons prétest. Un individu a été retiré pour la semaine 3 car son profil métabolique était trop proche de ceux de la semaine 1. Le scores plot de cette PLS montre une séparation entre les 2 groupes (Fig. 67). Les variables responsables de cette séparation sont mises en évidence par le loadings plot. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 3</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 3</b>
$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t)) Bétaïne (3,27 (s), 3,90 (s)) Citrate (2,53 (d), 2,69 (d)) Succinate (2,43 (s))	Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s)) Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s)) Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d)) Taurine (3,25 (t), 3,45 (t)) Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s)) Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))

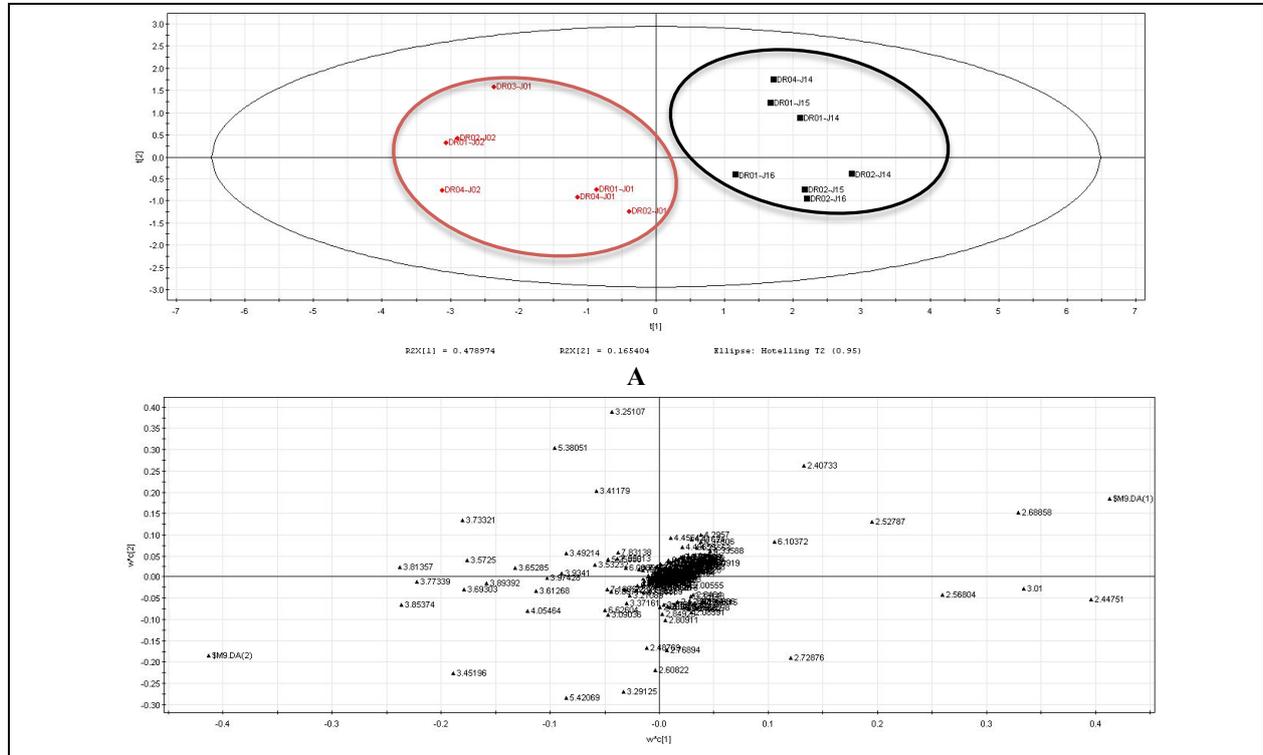
### 3.3.1.3 Comparaison entre la semaine 1 et la semaine 4

Les échantillons du jour 0 ont été retirés de l'analyse car leur profil métabolique était similaire à celui des échantillons prétest. Le scores plot de cette PLS objective une séparation entre les 2 groupes (Fig. 68). Le loadings plot souligne les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente à la semaine 4</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue à la semaine 4</b>
$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t)) Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s)) Citrate (2,53 (d), 2,69 (d)) Succinate (2,43 (s)) Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))	Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s)) Trans-aconitate (3,47 (s), 6,62 (s))



**Fig. 66** : **A** : Scores plot d'une PLS réalisée entre l'ensemble des échantillons prétest (noir) et les échantillons de la semaine 1 de l'exposition (sans le jour 0) du groupe des rats exposés. **B** : Loadings plot représentant les variables responsables de la séparation des 2 groupes. Paramètres du modèle :  $R^2_{cum} = 0,85$ ,  $Q^2_{cum} = 0,71$ .



**Fig. 67** : **A** : Scores plot d'une PLS réalisée entre les échantillons de la semaine 1 (sans le jour 0) (rouge) et les échantillons de la semaine 3 de l'exposition (avec un individu retiré) (noir) du groupe des rats exposés. **B** : Loadings plot représentant les variables responsables de la séparation des 2 groupes. Paramètres du modèle :  $R^2_{cum} = 0,89$ ,  $Q^2_{cum} = 0,81$ .

### 3.3.2 Comparaison entre le groupe exposé et le groupe contrôle

#### 3.3.2.1 Comparaison au jour 1

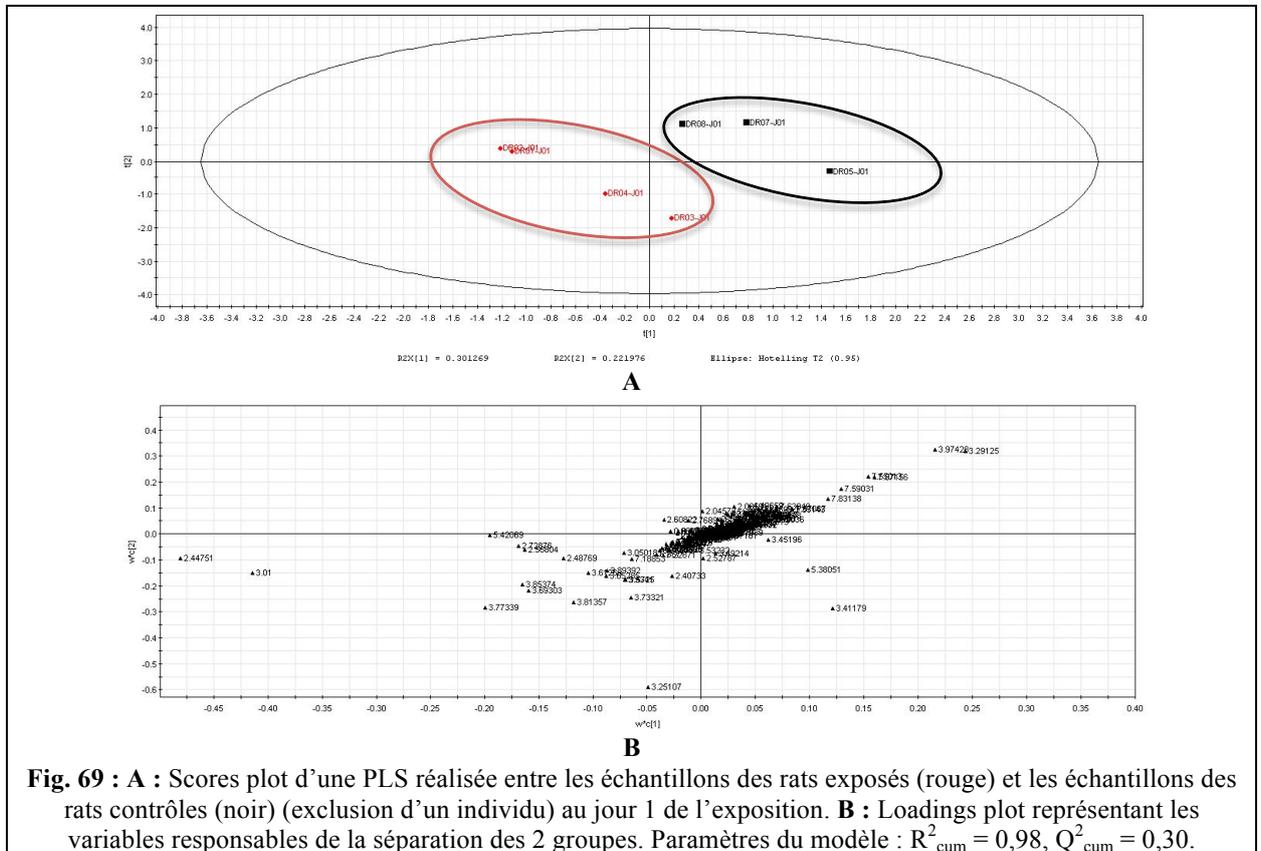
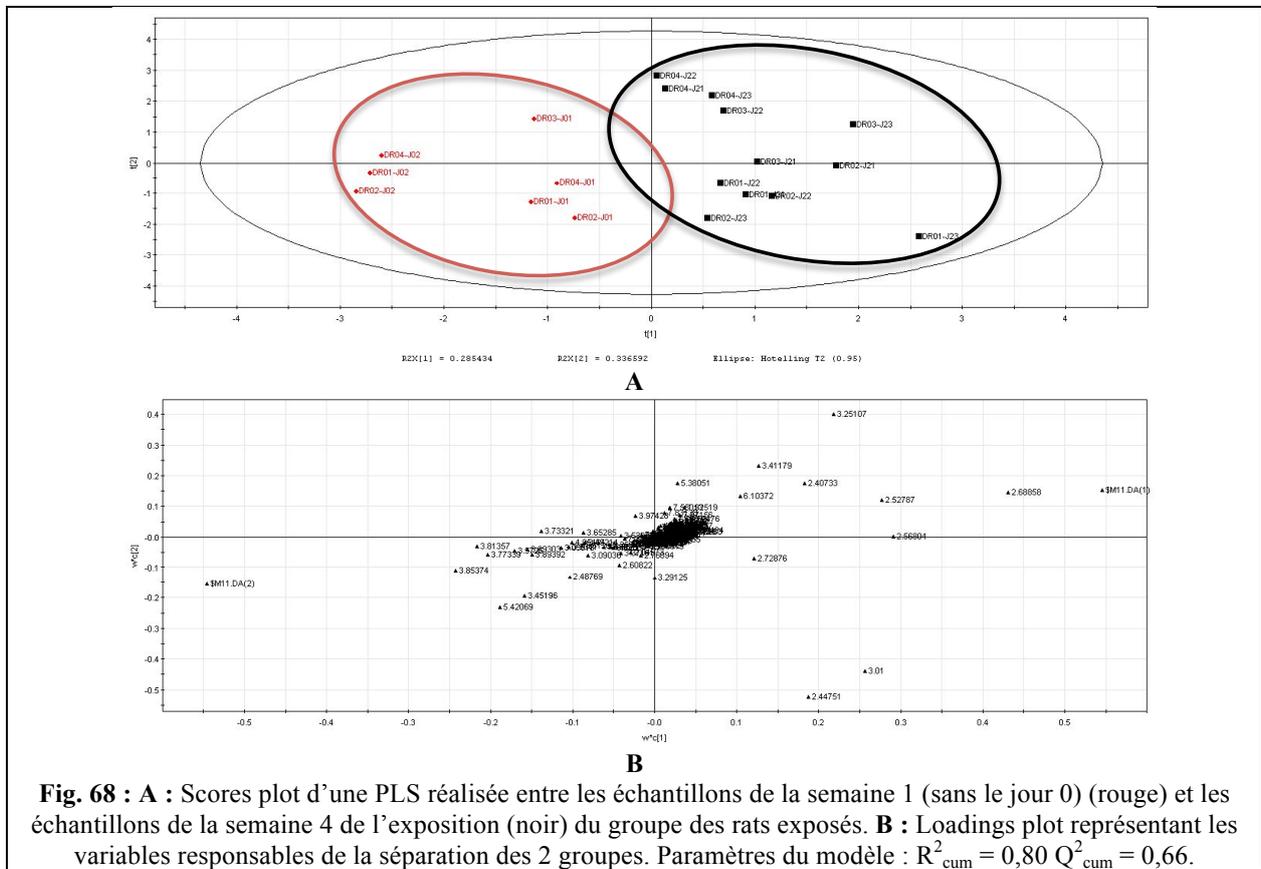
Un individu du groupe contrôle a été exclu de l'analyse car son profil métabolique sortait du lot. Le scores plot de cette PLS démontre une séparation entre les 2 groupes (*Fig. 69*). Le loadings plot indique les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente dans le groupe exposé</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue dans le groupe exposé</b>
$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))	Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))
Citrate (2,53 (d), 2,69 (d))	Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))
Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))
Succinate (2,43 (s))	
Triméthylamine N-oxyde (3,27 (s))	

#### 3.3.2.2 Comparaison au jour 27

Un individu du groupe contrôle a été exclu de l'analyse car son profil métabolique sortait du lot. Le scores plot de cette PLS met en évidence une séparation entre les 2 groupes (*Fig. 70*). Le loadings plot montre les variables responsables de cette séparation. Parmi celles-ci, certaines ont permis d'identifier des métabolites dont la concentration varie entre les 2 groupes :

<b>Métabolites identifiés dont la concentration augmente dans le groupe exposé</b>	<b>Métabolites identifiés dont la concentration diminue dans le groupe exposé</b>
Acétate (1,95 (s))	$\alpha$ -ketoglutarate (2,45 (t), 3,01 (t))
	Allantoïne (5,40 (s), 6,00 (s))
	Citrate (2,53 (d), 2,69 (d))
	Créatinine (3,05 (s), 4,06 (s))
	Hippurate (3,97 (d), 7,55 (t), 7,64 (t), 7,84 (d))
	Succinate (2,43 (s))
	Taurine (3,25 (t), 3,45 (t))

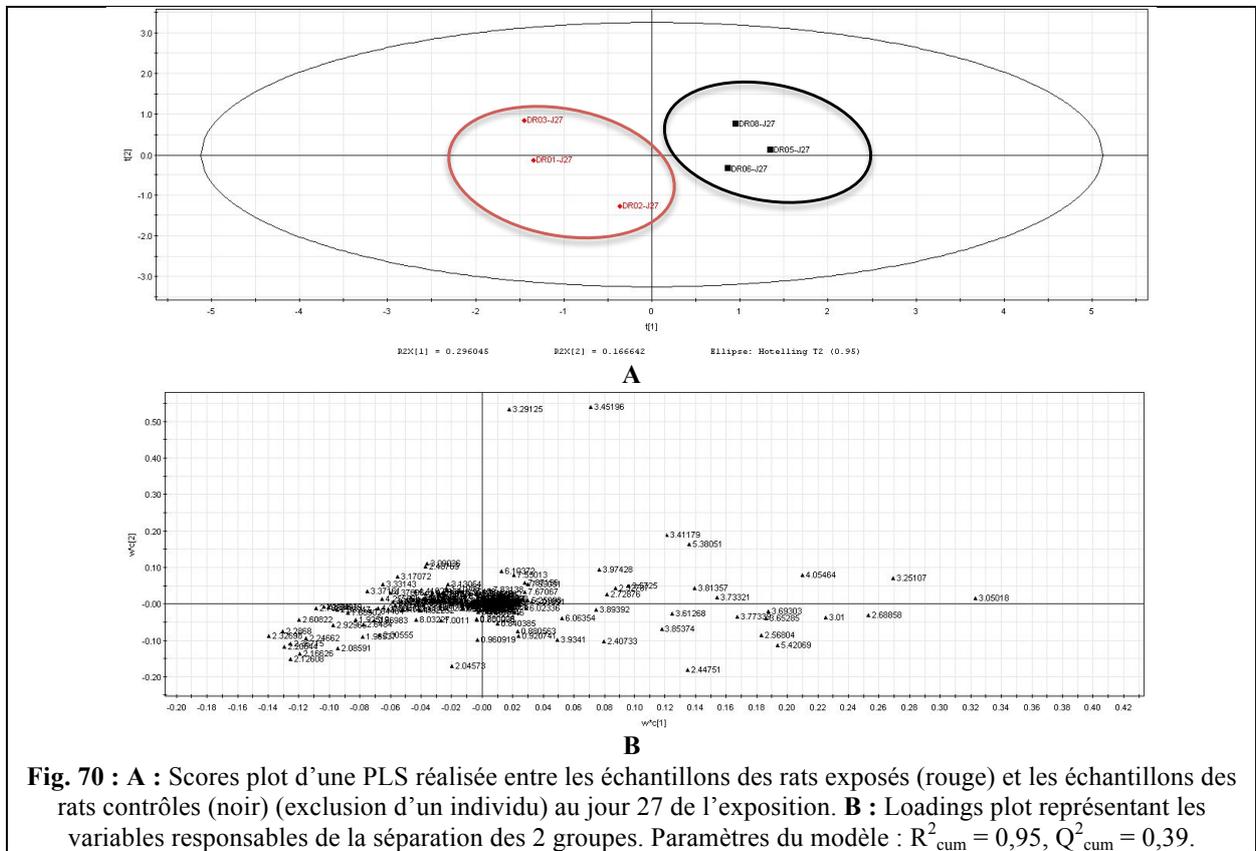


### 3.4 Etude métabonomique sur les *sera*

L'étude métabonomique sur les *sera* n'a pu être réalisée, les spectres n'ayant pas été complètement acquis lors de la rédaction de ce travail.

## 4. **Synthèse des changements métaboliques urinaires**

Une synthèse représentant les différentes variations des concentrations urinaires développées ci-dessus est reprise dans le *Tableau 8*. L'évolution des concentrations dans les groupes exposés à forte dose est toujours considérée en comparaison à la première semaine d'exposition. Les comparaisons ponctuelles par rapport aux groupes exposés à faible dose et aux groupes contrôles sont également reprises.



Métabolites	Prétest			Semaine 1				Semaine 2				Semaine 3			Semaine 4			
	SD + CTR	SR + CTR	DR + CTR	SD HD	SR HD	DR HD	DR CTR	SD HD	SD CTR	SR HD	SR CTR	SD HD	SD FD	DR HD	SD HD	SR HD	DR HD	DR CTR
Acétate	↓	=	=	↑	=	=	=	↓	↑	=	=	↓	=	=	↓	=	=	↓
α-ketoglutarate	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑
Allantoïne	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↑
Bétaïne	↓	=	↑	↑	=	↓	=	↓	↓	↓	=	↓	↑	↑	↓	↑	=	=
Citrate	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	=	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑
Créatinine	↑	=	↓	↓	=	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑
DMA	↑	=	↑	↓	=	↓	=	↓	↑	=	=	↓	↑	=	↓	↓	=	=
DMG	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	↑	=	↓	=	=	=
Hippurate	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	=	↑
Indoxyl-sulfate	=	=	=	=	=	=	=	↑	↓	=	↑	↑	↓	=	↑	↑	=	=
MA	=	=	=	=	=	=	=	↑	↑	=	=	↓	↑	=	↓	=	=	=
Succinate	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑
Taurine	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑
Trans-aconitate	=	=	↓	=	=	↑	=	=	↑	=	=	↓	↑	↓	=	↓	=	=
TMA-N-ox	↓	=	↓	↑	=	↑	↓	↓	↓	=	=	↓	=	↓	↓	↓	=	=

**Tableau 8 :** Synthèse des variations des concentrations urinaires des métabolites à partir des comparaisons réalisées. **Légende :** SD = rats SHR, étude Diclofénac ; SR = rats SHR, étude Rofécoxib, DR = rats DAHL, étude Rofécoxib ; HD = haute dose ; FD = faible dose ; CTR = contrôles.

# **DISCUSSION**



## **1. Evaluation des modèles d'hypertension chronique**

L'hypertension chronique est un état pathologique dans lequel la pression exercée par le sang sur les parois des vaisseaux sanguins est trop élevée. Actuellement un individu est considéré comme hypertendu chronique si ses pressions artérielles systolique et diastolique sont, de manière habituelle, supérieures à 140 et 90 mmHg respectivement (45). Les mesures régulières de la tension artérielle ont démontré l'existence d'une hypertension chronique établie dans chaque groupe de rats des deux études réalisées sur la souche SHR et de l'étude réalisée sur la souche DAHL/SS, tout au long de l'expérimentation. Les tensions systoliques et diastoliques ont en effet toujours été supérieures à 140 et 90 mmHg. Les souches SHR et DAHL/SS sont donc adéquates pour notre étude de l'impact d'une hypertension chronique sur le profil toxique des AINS.

## **2. Evaluation des paramètres physiologiques**

### **2.1 Etude sur les rats SHR exposés au Diclofénac**

Le groupe exposé à forte dose de Diclofénac se démarque des deux autres groupes par des différences significatives du gain de poids corporel à certains jours. Ce signe général et non-spécifique pourrait témoigner d'une atteinte toxique dans ce groupe de rats, sans toutefois orienter vers les cibles tissulaires touchées.

### **2.2 Etude sur les rats SHR exposés au Rofécoxib**

Trois différences significatives ont été mises en évidence entre les groupes de rats en début d'exposition : une différence entre les deux groupes exposés au jour 3 pour le gain de poids corporel, une différence entre le groupe exposé à la faible dose et le groupe contrôle au jour 2 pour la consommation de nourriture et une différence entre les trois groupes au jour 1 pour la consommation d'eau. Ces différences ponctuelles et très limitées dans le temps ne constituent pas un argument en faveur de signes cliniques d'atteinte toxique. Il ressort que les trois groupes ne présentent pas de signes évocateurs d'effets aderses marqués.

### **2.3 Etude sur les rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib**

Une différence significative du gain de poids corporel est observée entre le groupe exposé et le groupe contrôle au jour 27, ainsi qu'une différence significative de la consommation de nourriture et d'eau au jour 8. Ces différences ponctuelles et très limitées dans le temps ne constituent pas un argument en faveur de signes cliniques d'atteinte toxique. Il ressort que les trois groupes ne présentent pas de signes évocateurs d'effets aderses marqués.



### **3. Evaluation des lésions cardiaques par des méthodes conventionnelles**

#### **3.1 Mesure de biomarqueurs conventionnels**

##### *3.1.1 Etude sur les rats SHR exposés au Diclofénac*

Le dosage de 3 biomarqueurs protéiques conventionnels ne relève aucune différence significative entre les groupes et au cours du temps. Cela indique que, dans les conditions de notre protocole expérimental (Diclofénac 10 mg/Kg/J pendant 28 jours), aucun effet cardiaque dû à l'exposition n'a pu être détecté au niveau de ces paramètres protéiques conventionnels.

##### *3.1.2 Etude sur les rats SHR exposés au Rofécoxib*

Des différences non significatives sont également retrouvées dans cette étude entre le groupe exposé à la forte dose de Rofécoxib et le groupe contrôle, ce qui rejoint la conclusion évoquée ci-dessus.

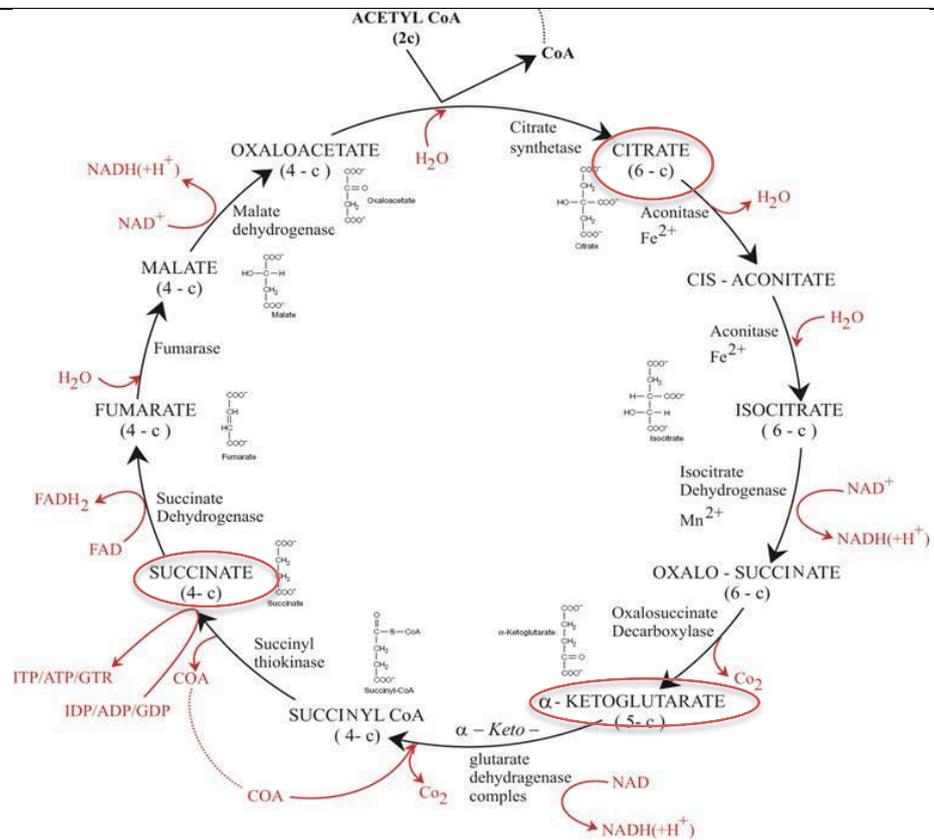
#### **3.2 Etude histologique**

L'étude histologique avait pour objectif de rechercher des signes de nécrose par ischémie du myocarde chez chaque individu inclus dans l'étude. Les signes d'infarctus dépendent de la chronologie de l'événement (46) :

- 0 à 12 heures post-infarctus : aucun signe, aspect normal des cellules myocardiques.
- 12 à 24 heures post-infarctus : condensation cytoplasmique éosinophile et aspect hétérochromatique des noyaux puis perte progressive de la striation et caryolyse.
- 24 à 72 heures post-infarctus : infiltrat inflammatoire aigu de polynucléaires neutrophiles, macrophages puis lyse progressive des cellules nécrosées et de l'infiltrat.
- 3 à 10 jours post-infarctus : tissu de granulation contenant de nombreux fibroblastes accompagné d'angiogenèse.
- quelques semaines post-infarctus : développement d'une cicatrice fibreuse riche en collagène de la zone nécrosée qui remplace le tissu myocardique d'origine.

##### *3.2.1 Etude sur les rats SHR exposés au Diclofénac*

Des signes précoces de nécrose par ischémie ont été identifiés chez des individus du groupe exposé à la forte dose et du groupe contrôle. Ces signes témoignent d'une souffrance cellulaire très récente (environ 12 h avant sacrifice) et limitée à une très petite zone ventriculaire. L'analyse histologique, n'étant réalisée que sur deux coupes par ventricule, ne permet pas d'établir le catalogue complet des lésions cardiaques de chacun des individus. De ce fait, il est impossible de conclure si un groupe présente davantage de lésions qu'un autre,



**Fig. 71** : Représentation du cycle de Krebs, voie biochimique mitochondriale importante (47). Les métabolites identifiés sont entourés en rouge.

au départ de cette étude histologique seule. Néanmoins, celle-ci permet d'évoquer une tendance spontanée des rats SHR à développer de petits infarctus cardiaques, probablement la conséquence de l'hypertension qui est un facteur de risque cardiovasculaire bien établi (48).

### 3.2.2 Etude sur les rats SHR exposés au Rofécoxib

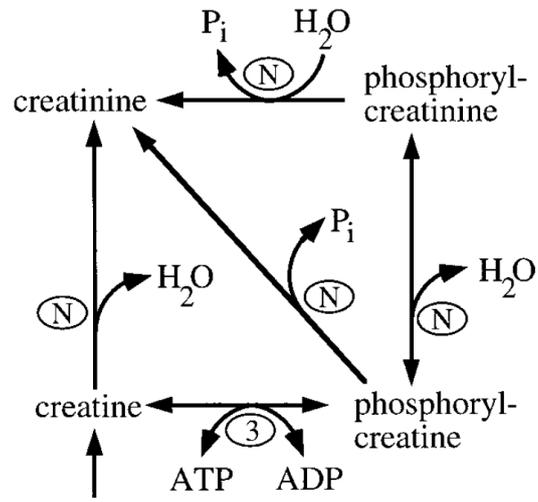
Les mêmes signes histologiques que ceux mentionnés ci-dessus sont détectés chez les individus des trois groupes confondus, ce qui permet d'établir le même constat d'apparition de petits infarctus spontanés.

## 4. Modifications métaboliques

L'étude métabonomique réalisée sur les urines décrit des changements de concentration de différents métabolites à partir desquels des hypothèses sur les voies biochimiques atteintes ainsi que la localisation tissulaire des lésions peuvent être dressées :

### 4.1 Perturbation des voies énergétiques mitochondriales

Une diminution de la concentration urinaire du citrate, du succinate et de l' $\alpha$ -ketoglutarate, intermédiaires du cycle de Krebs (49), est mise en évidence au cours de l'exposition dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac. Cette diminution est perceptible dès la première semaine d'exposition et s'accroît pendant les deux dernières semaines. La présence urinaire de ces métabolites est également inférieure à celles du groupe contrôle et du groupe exposé à la faible dose du Diclofénac, respectivement aux semaines 2 et 3. Ce changement peut être lié à une diminution de l'activité énergétique cellulaire. En effet, les intermédiaires du cycle de l'acide citrique sont capables de traverser les membranes biologiques (49). Dès lors, si leur production intracellulaire diminue, ce changement est reflété dans les fluides extracellulaires de façon à ce que l'homéostasie soit maintenue. La baisse de la concentration urinaire de ces métabolites suggère donc une diminution de la respiration cellulaire mitochondriale et pourrait être compatible avec des phénomènes ischémiques progressifs de cardiomyocytes, et plus marqués dans le groupe exposé à la forte dose. En effet, si les cellules ne reçoivent plus d'oxygène, les oxydations phosphorylantes mitochondriales s'arrêtent et le cycle de Krebs (Fig. 71) n'est plus alimenté en coenzymes d'oxydo-réduction sous forme oxydée, ce qui provoque son arrêt également. De plus, la diminution concomitante du trans-aconitate, formé spontanément à partir du cis-aconinate (intermédiaire du cycle de Krebs) renforce cette hypothèse. La perturbation du métabolisme énergétique mise en évidence peut également être caractéristique d'une atteinte toxique hépatique induisant de la nécrose (50–52).



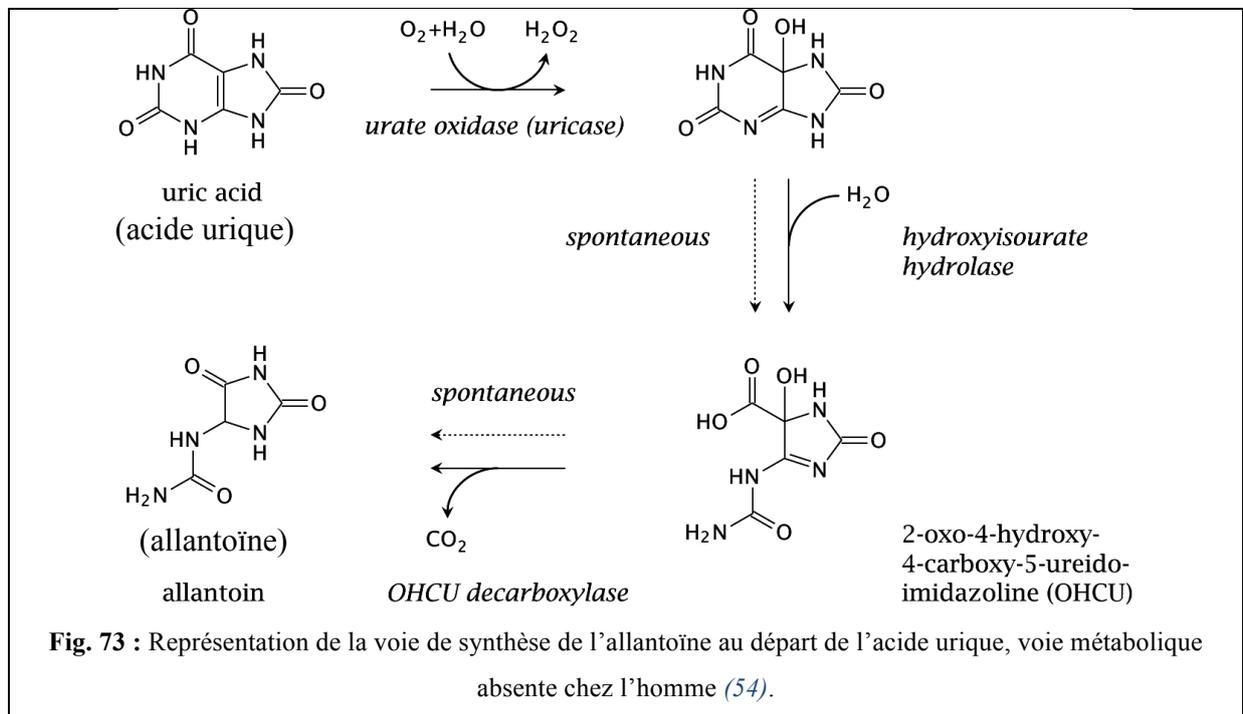
**Fig. 72 :** Représentation du métabolisme de la créatinine (24). Celle-ci est formée principalement par déshydratation non-enzymatique de la créatine, favorisée à pH acide.

Une perturbation similaire des voies énergétiques est mise en évidence chez les rats SHR exposés à la forte dose de Rofécoxib : La diminution des intermédiaires du cycle de Krebs a lieu à la première semaine et s'accroît en fin d'exposition, après une augmentation mise en évidence à la semaine 2.

Chez les rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib, la perturbation des voies énergétiques semble moins importante : La diminution de la concentration urinaire des intermédiaires du cycle de Krebs est mise en évidence à la première semaine de l'exposition du groupe exposé. Cependant, les concentrations restent supérieures à celles du groupe contrôle. En fin d'étude, la tendance s'inverse : les concentrations augmentent dans le groupe exposé mais deviennent inférieures à celles du groupe contrôle. Cette cinétique évoque une perturbation biphasique des voies énergétiques: une première altération légère de la respiration mitochondriale a d'abord lieu dans la première semaine. Cette altération est ensuite suivie d'un retour à la normale du métabolisme énergétique. Enfin, une altération plus importante a lieu en fin d'étude. La concentration urinaire de trans-acétyl-CoA est également diminuée en fin d'exposition, ce qui appuie cette hypothèse. De plus, une augmentation de la concentration urinaire d'acétate est observée en fin d'exposition par rapport au groupe contrôle. L'acétate est produit à partir de l'acétyl-CoA issu de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les mitochondries hépatiques, de manière conjointe à la formation des corps cétoniques (53). Ceci coïncide avec l'altération du cycle de Krebs : l'acétyl-CoA, qui permet d'alimenter ce cycle en citrate, est métabolisé dans d'autres voies biochimiques à cause de son accumulation provoquée par l'altération du cycle de Krebs. De plus, cet élément est en faveur d'une perturbation de voies énergétiques au niveau hépatique, vu que la formation d'acétate à partir d'acétyl-CoA est une voie mitochondriale hépatique.

#### **4.2 Augmentation de la synthèse de la créatinine et acidose métabolique**

Une augmentation la concentration urinaire de créatinine est observée à partir de la deuxième semaine d'exposition dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac. La concentration est également supérieure à celle du groupe contrôle et celle du groupe exposé à la faible dose, aux semaines 2 et 3 respectivement. La créatinine est un produit de dégradation de la créatine (Fig. 72), formé spontanément par voie non-enzymatique dans le muscle strié squelettique et dans le muscle strié cardiaque principalement (24). La réaction de cyclisation de la créatine en créatinine étant spontanée, elle dépend de facteurs physico-chimiques tels que la température et le pH. Ainsi la formation de créatinine est favorisée à pH acide (24). L'augmentation urinaire de la créatinine observée pourrait indiquer une augmentation de sa production à cause d'une acidose cellulaire dans des cardiomyocytes. Cette acidose peut être concomitante à une ischémie, provoquant un changement du métabolisme énergétique aérobie



en métabolisme anaérobie qui génère des molécules acides tel que le lactate (49). L'augmentation urinaire de lactate et de créatine n'étant pas visible dans les données métabonomiques, cela pourrait suggérer que l'intégrité des membranes cellulaires des cardiomyocytes est préservée, retenant le lactate et la créatine dans le cytoplasme et que les signes observés témoignent d'un état ischémique n'ayant pas encore produit de nécrose avérée ou d'un état nécrotique très précoce.

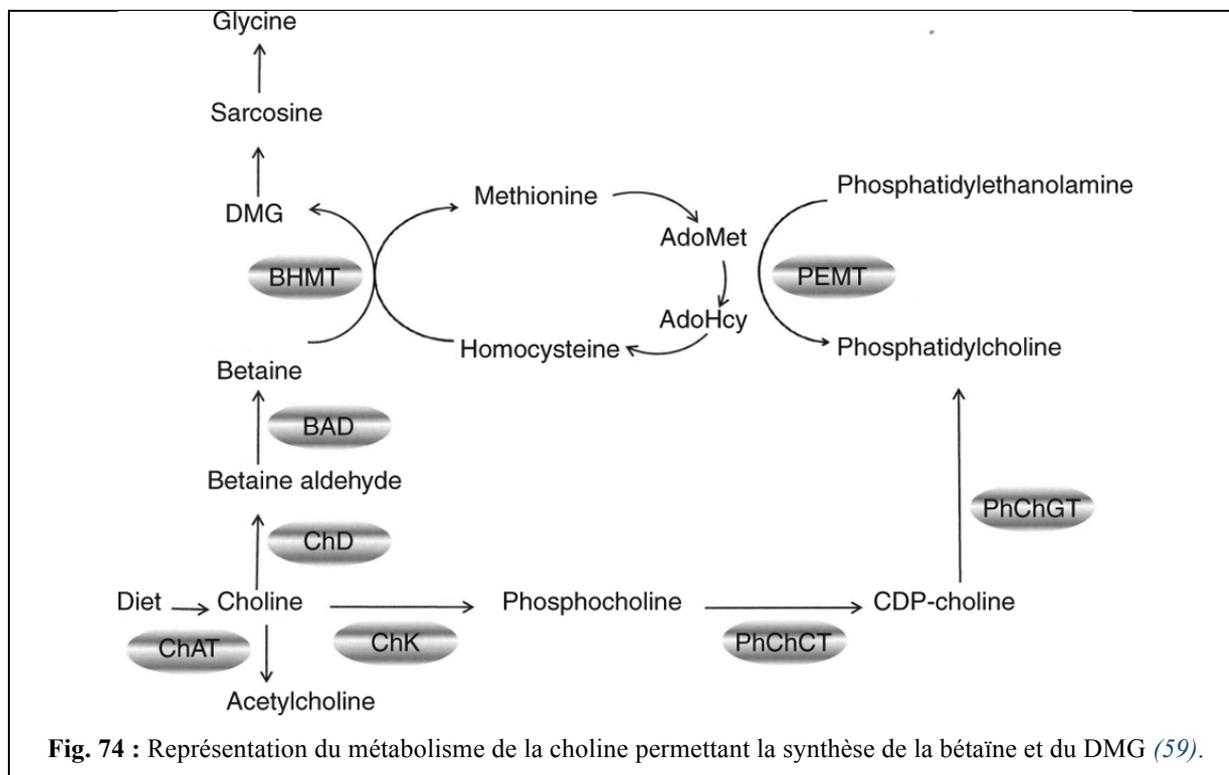
L'augmentation urinaire de la créatinine peut également avoir une origine rénale. En effet, la créatinine est éliminée dans les urines par filtration glomérulaire (24). Une hausse de la filtration glomérulaire peut être liée à une hyperperméabilité endothéliale. Celle-ci pourrait être une conséquence du stress oxydatif engendré au niveau endothélial par le Diclofénac.

Une augmentation plus brève de la créatinine est aussi retrouvée dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Rofécoxib, à la deuxième semaine d'exposition uniquement.

Chez les rats DAHL/SS, une augmentation brève de la créatinine est aussi observée à la première semaine d'exposition dans le groupe exposé au Rofécoxib. En outre, la concentration en créatinine diminue pendant les 2 dernières semaines de l'exposition, y compris par rapport au groupe contrôle. Cette diminution peut suggérer un retour de l'équilibre acido-basique à un état normal où la production de créatinine est réduite. Cette diminution peut aussi témoigner d'une insuffisance rénale par altération de la filtration glomérulaire (55), qui pourrait se confirmer si une augmentation de la créatininémie y est associée.

### 4.3 Stress oxydatif

Une augmentation de la concentration urinaire de l'allantoïne est mise en évidence à partir de la deuxième semaine d'exposition dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac. Au cours de cette période, l'allantoïne est présente en plus grande quantité dans les urines de ce groupe par rapport au groupe contrôle et au groupe exposé à la faible dose. L'allantoïne est un produit de dégradation de l'acide urique, synthétisé par une réaction enzymatique d'oxydation de l'acide urique, déchet du métabolisme des purines (Fig. 73). Cette molécule est présente physiologiquement dans les urines de rat mais est absente chez l'homme, celui-ci n'étant pas pourvu de la voie enzymatique (56). L'allantoïne peut également être formée de façon non-enzymatique à partir d'acide urique lorsqu'un stress oxydatif se produit (57,58). L'augmentation d'allantoïne est un argument en faveur d'un stress oxydatif induit par le Diclofénac (16). Ce stress oxydatif, rencontré au niveau de l'endothélium vasculaire, favorise la formation de plaques d'athérosclérose (Fig. 5), ce qui peut être mis en



lien avec des phénomènes ischémiques plus marqués chez les sujets exposés. La formation d'un stress oxydatif dans d'autres tissus n'est cependant pas à exclure.

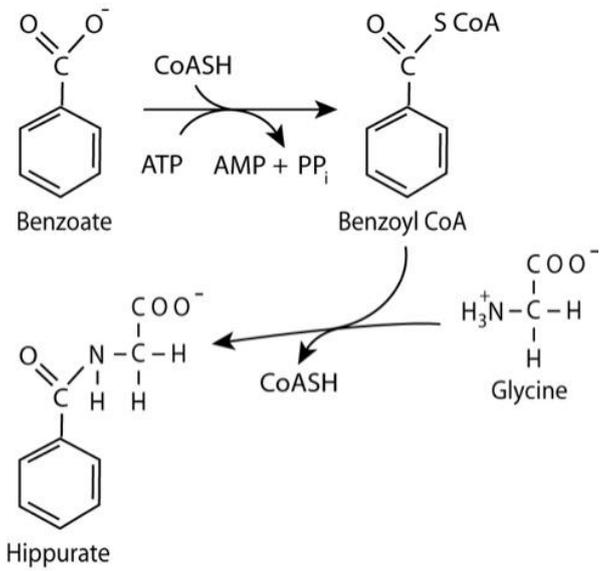
Chez les rats SHR exposés à la forte dose de Rofécoxib, une augmentation brève de la concentration urinaire de l'allantoïne est mise en évidence à la deuxième semaine, témoignant probablement d'un stress oxydatif plus faible, peut-être lié à des atteintes extra-endothéliales de sévérité différente entre les molécules.

#### **4.4 Altération du métabolisme des purines**

Une diminution de la concentration urinaire de l'allantoïne est mise en évidence pendant les deux premières semaines d'exposition dans le groupe de rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib. La concentration est également inférieure à celle du groupe contrôle durant la première semaine. La concentration augmente en fin d'exposition mais reste inférieure à celle des contrôles. Cette diminution d'excrétion d'allantoïne pourrait s'expliquer par un défaut de sa production par voie enzymatique, au départ de l'acide urique. Chez le rat, contrairement à l'homme, l'allantoïne est le dernier produit du catabolisme des purines (56). Sa diminution suggère une perturbation en amont de cette voie métabolique, dont la localisation tissulaire ne peut être déterminée. Cependant, cette altération peut être liée à la diminution de la respiration mitochondriale. En effet, le catabolisme des purines requiert des coenzymes d'oxydo-réduction à l'état oxydé, produits principalement par les oxydations phosphorylantes (49). Si celles-ci sont arrêtées, le rapport coenzymes oxydés sur coenzymes réduits s'inverse et la quantité de coenzymes oxydés devient insuffisante pour permettre les réactions d'oxydo-réduction nécessitant ces coenzymes, comme le catabolisme des purines.

#### **4.5 Protection contre le stress osmotique**

Une réduction de la concentration urinaire en bétaïne, diméthylglycine (DMG) et taurine est observée à partir de la deuxième semaine d'exposition pour le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac. La concentration de taurine est aussi inférieure à celles des deux autres groupes de rats. Celle de la bétaïne est supérieure à la concentration du groupe contrôle à la deuxième semaine mais est inférieure à celle du groupe exposé à la faible dose pendant la troisième semaine. La bétaïne, produite au départ de la choline est un osmolyte cellulaire important (60), au même titre que la taurine, un dérivé de la cystéine (61). Le DMG est un métabolite secondaire de la bétaïne (Fig. 74). Une diminution de l'excrétion urinaire de ces osmolytes cellulaires pourrait être le reflet d'une réduction de leur production pour lutter contre un stress osmotique. En effet, comme mentionné précédemment, l'ischémie chronique du myocarde entraîne l'augmentation intracellulaire progressive d'acide lactique à cause du



**Fig. 75 :** Représentation de la synthèse d'hippurate par conjugaison de l'acide benzoïque avec la glycine (62).

Métabolisme anaérobie. Afin de garder un volume cellulaire normal, dépendant d'une pression osmotique normale, des mécanismes d'adaptation se mettent en place. Parmi ceux-ci, la baisse de synthèse d'osmolytes pourrait constituer un de ces mécanismes. Il est à noter que cette hypothèse pourrait également s'appliquer à d'autres tissus pouvant être altérés par le Diclofénac, le foie étant un exemple.

Une réduction des concentrations urinaires de bétaïne et de taurine est observée à la deuxième semaine d'exposition pour le groupe de rats SHR exposé à la forte dose de Rofécoxib. La concentration de taurine est aussi inférieure à celle du groupe contrôle à cette même semaine. La concentration de bétaïne augmente toutefois en fin d'exposition pour le groupe exposé. Cette dynamique pourrait s'expliquer par un mécanisme de protection contre un stress osmotique qui serait transitoire et donc moindre que chez les rats SHR exposés au Diclofénac. La diminution de la bétaïne et de la taurine serait le témoin de l'installation de cette protection. Ensuite, l'augmentation de la bétaïne en fin d'exposition expliquerait un retour à l'équilibre de l'état osmotique cellulaire. La majoration de la concentration de bétaïne en fin d'exposition par rapport à sa concentration initiale ne s'accompagne pas d'une augmentation concomitante en taurine. Ceci pourrait s'expliquer par des différences de disponibilité en substrats pour ces deux osmolytes. L'augmentation de la bétaïne pourrait ainsi compenser la diminution de la taurine afin que la pression osmotique soit équilibrée.

#### **4.6 Perturbation du métabolisme de la phénylalanine**

Une augmentation de la concentration urinaire d'hippurate est mise en évidence pendant la deuxième et la troisième semaine de l'exposition dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac. Cette concentration est également supérieure à celles du groupe contrôle et du groupe exposé à la faible dose à la deuxième et troisième semaine respectivement. L'hippurate est synthétisé au départ de composés contenant un groupement phénol. Ce groupement, sous la forme d'acide benzoïque, est ensuite conjugué à la glycine pour former l'hippurate (*Fig. 75*) (43). La source endogène principale de phénol est la phénylalanine, dont l'hypercatabolisme pourrait expliquer l'augmentation de la production d'hippurate, ensuite éliminé dans les urines. Cet hypercatabolisme pourrait être dû à une diminution de la conversion de phénylalanine en tyrosine, augmentant la quantité de phénylalanine disponible pour son catabolisme. Des troubles de cette conversion ont déjà été décrits dans le cas de problèmes hépatiques et rénaux (63,64). De plus, l'hippurate étant éliminé par sécrétion via un transporteur au niveau des tubules rénaux (65), une augmentation urinaire de ce métabolite pourrait aussi être le fruit d'une hausse de la sécrétion tubulaire rénale, peut-être en réponse à l'augmentation concomitante de sa synthèse.



Chez les rats SHR exposés à la forte dose de Rofécocixib, l'augmentation urinaire d'hippurate est également retrouvée mais limitée à la 2<sup>ème</sup> semaine.

#### **4.7 Augmentation de la synthèse de glutathion**

Une diminution de la concentration urinaire d'hippurate est mise en évidence tout au long de l'exposition dans le groupe de rats DAHL/SS exposés à la forte dose de Rofécocixib. Cette concentration est également inférieure à celle du groupe contrôle à la première semaine et en fin d'exposition. La diminution de l'hippurate pourrait être liée à un manque de disponibilité de ses précurseurs, la glycine et l'acide benzoïque. Cela suggère que ces acides aminés précurseurs sont recrutés dans d'autres voies biochimiques. Une augmentation de la synthèse de glutathion, nécessitant de la glycine, est une hypothèse plausible reflétant des phénomènes d'adaptation à l'exposition au Rofécocixib. La diminution de la concentration urinaire en taurine, observée au long de l'exposition corrobore cette hypothèse. En effet, la taurine est synthétisée au départ de la cystéine, acide aminé entrant également dans la synthèse du glutathion. Celui-ci est un tripeptide formé au départ de glutamate, de glycine et de cystéine. Il assure deux fonctions importantes dans les mécanismes de protection face aux xénobiotiques : il assure le rôle de cofacteur dans des réactions de conjugaison permettant le métabolisme de composés exogènes et il assure également un rôle d'antioxydant, comme coenzyme d'oxydo-réduction, permettant de réduire la quantité de peroxyde d'hydrogène, une espèce réactive de l'oxygène (ROS), produite lors d'un stress oxydatif (49,66). Le Rofécocixib n'est pas connu pour subir une réaction de conjugaison au glutathion (37). Par contre, il est connu pour induire un stress oxydatif (16). L'augmentation de taux de glutathion pourrait constituer un mécanisme de protection contre ce stress oxydatif. L'absence d'augmentation d'allantoïne, métabolite caractéristique du stress oxydatif, coïncide avec cette hypothèse. Deux tissus peuvent constituer la localisation tissulaire principale de ces mécanismes d'adaptation : l'endothélium vasculaire et le foie.

Toutefois, la diminution urinaire de l'hippurate pourrait aussi provenir d'une atteinte de la sécrétion tubulaire rénale qui serait diminuée. Ce changement, combiné à la diminution de la créatininurie, également observée dans ce groupe, pourrait être un argument en faveur d'une atteinte rénale globale touchant conjointement les fonctions de filtration glomérulaire et de sécrétion tubulaire.

En outre, la diminution de l'hippurate peut également provenir d'une diminution de sa synthèse hépatique, coûteuse en énergie. Cela pourrait donc aussi traduire une atteinte hépatique impliquant une altération des voies énergétiques mitochondriales (50).



#### **4.8 Perturbation du métabolisme de la choline et des amines**

Les concentrations urinaires en méthylamine (MA), diméthylamine (DMA) et triméthylamine N-oxyde (TMA-N-ox) diminuent au cours de l'exposition dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac. Les concentrations en MA et DMA sont aussi inférieures à celles des deux autres groupes, aux semaines 2 et 3. La concentration en TMA-N-ox est cependant supérieure à celle du groupe contrôle pendant la deuxième semaine. Le TMA-N-ox et le DMA sont des métabolites secondaires du TMA, issu de la transformation chimique de la choline (43). La diminution de leur sécrétion urinaire suggère une réduction de leur production, témoignant d'une altération du métabolisme de la choline. Ceci peut être mis en lien avec la diminution de la bétaïne, citée précédemment et faisant partie du métabolisme de la choline également. Le MA est un produit du catabolisme des amines biologiques (43). Sa diminution pourrait être le reflet d'une altération du catabolisme des amines. Ces deux perturbations pourraient être liées à la baisse de production énergétique des cardiomyocytes mentionnée ci-dessus. En effet, ces voies métaboliques nécessitant de l'ATP, si celui-ci n'est pas produit en suffisance par la respiration mitochondriale, les processus biologiques nécessitant de l'énergie diminuent en termes de rendement.

Dans le groupe de rats exposés à forte dose de Rofécocixib, une diminution du DMA et du TMA-N-ox est mise en évidence en fin d'exposition uniquement. Cela suggère une perturbation du métabolisme de la choline plus faible que chez les rats exposés au Diclofénac.

#### **4.9 Putréfaction bactérienne intestinale et lésions gastro-intestinales**

La concentration urinaire d'indoxyl-sulfate est augmentée à partir de la deuxième semaine de l'exposition dans le groupe de rats SHR exposés à la forte dose de Diclofénac et est également supérieure à celles du groupe contrôle et du groupe exposé à la faible dose, à la deuxième et troisième semaine respectivement. L'indol est un métabolite formé par putréfaction bactérienne intestinale, au départ du tryptophane. Ce métabolite est ensuite absorbé dans la circulation sanguine pour ensuite être oxydé et conjugué à un groupement sulfate par le foie, pour former de l'indoxyl-sulfate. Celui-ci est éliminé dans les urines par sécrétion tubulaire rénale (67–69). L'augmentation de sa concentration urinaire est probablement liée à une augmentation de sa production au niveau intestinal à cause d'une action majorée de la flore bactérienne, peut-être secondaire à des ulcérations gastro-duodénales provoquées par le Diclofénac (1). Une hypothèse pouvant expliquer cela serait que les lésions de la muqueuse gastrique entraîneraient une diminution de la production de pepsine, enzyme responsable de la digestion des protéines en peptides plus petits. Ceci engendrerait une diminution de la quantité d'acides aminés disponibles pour absorption intestinale ainsi qu'une augmentation de la quantité de protéines et peptides pouvant servir de substrats à la putréfaction bactérienne.

<b>Changements biochimiques</b>	<b>Rats SHR exposés au Diclofénac</b>	<b>Rats SHR exposés au Rofécoxib</b>
Altération de la respiration mitochondriale	++	++
Acidose métabolique et augmentation de la créatinine	++	+
Stress oxydatif	++	+
Protection contre le stress osmotique	++	+
Altération du métabolisme de la phénylalanine	+	+
Altération du métabolisme de la choline	++	+
Altération du métabolisme des amines	++	+
Putréfaction bactérienne intestinale et lésions gastro-duodénales	++	+
Contamination bactérienne des échantillons	+	-

**Tableau 9 :** Comparaison entre les modifications biochimiques observées chez les rats SHR exposés au Diclofénac et au Rofécoxib.

<b>Changements biochimiques</b>	<b>Rats SHR exposés au Rofécoxib</b>	<b>Rats DAHL exposés au Rofécoxib</b>
Altération de la respiration mitochondriale	++	+
Acidose métabolique et augmentation de la créatinine	+	+/-
Stress oxydatif	+	-
Protection contre le stress osmotique	+	-
Altération du métabolisme de la phénylalanine	+	-
Altération du métabolisme de la choline	+	-
Altération du métabolisme des amines	+	-
Altération du métabolisme des purines	-	++
Augmentation de la synthèse du glutathion	-	++
Putréfaction bactérienne intestinale et lésions gastro-duodénales	+	-

**Tableau 10 :** Comparaison entre les modifications biochimiques observées chez les rats SHR exposés au Rofécoxib et chez les rats DAHL/SS exposés au Rofécoxib.

Chez les rats SHR exposés à la forte dose de Rofécoxib, la concentration urinaire d'indoxyl-sulfate est augmentée en fin d'exposition dans le groupe exposé à la forte dose et est également inférieure à celle du groupe contrôle à la deuxième semaine. Cette augmentation est probablement aussi liée à une augmentation de sa production au niveau du tube digestif à cause d'une action majorée de la flore bactérienne. Le fait que cette augmentation soit plus faible que dans le groupe exposé au Diclofénac coïncide avec la toxicité gastro-intestinale plus faible du Rofécoxib de par sa sélectivité de COX-2 (1,70).

L'augmentation urinaire de l'indoxyl-sulfate pourrait aussi résulter d'une augmentation de la sécrétion tubulaire rénale, au même titre que l'augmentation urinaire de l'hippurate. Cela pourrait résulter d'un mécanisme adaptatif ou lié à une altération de la perméabilité endothéliale provoquée par les AINS, via un stress oxydatif.

#### **4.10 Contamination bactérienne des échantillons**

L'augmentation de la concentration urinaire d'acétate observée pendant la première semaine de l'exposition dans le groupe exposé à la forte dose est probablement le fruit d'un développement bactérien urinaire plus important durant cette semaine (71,72). En effet, cette augmentation coïncide avec une négligence du nettoyage des cages à métabolisme durant cette période. Ceci favorise le développement bactérien dans la partie inférieure des cages collectant les urines et les fèces et pourrait expliquer une contamination bactérienne des échantillons récoltés pendant cette période.

### **5. Comparaison entre les changements métaboliques du Diclofénac et du Rofécoxib chez les rats SHR**

Les changements métaboliques observés dans l'étude sur le Diclofénac et dans l'étude sur le Rofécoxib de la souche SHR montrent de nombreuses similitudes dans les voies métaboliques atteintes. Toutefois, des différences apparaissent par rapport à l'importance de ces atteintes (maintien au cours de l'exposition, chronologie d'apparition). Une synthèse des différences et similitudes des hypothèses établies est reprise dans le *tableau 9*.

### **6. Comparaison entre les changements métaboliques du Rofécoxib chez les rats SHR et DAHL/SS**

Les changements métaboliques observés chez les souches de rats SHR et DAHL/SS au cours de l'exposition au Rofécoxib montrent de nombreuses différences dans les voies biochimiques altérées entre les deux souches. Le *tableau 10* décrit une synthèse des différences constatées parmi les hypothèses établies.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## 1. Conclusion

Les études réalisées ont permis d'établir des hypothèses relatives à des modifications de voies biochimiques pouvant être mises en lien avec des phénomènes d'ischémie cardiaque suite à l'exposition au Diclofénac et au Rofécoxib :

- Altération de la respiration mitochondriale
- Acidose métabolique et augmentation de la synthèse de créatinine
- Stress oxydatif et mécanismes antioxydants
- Stress osmotique et mécanismes compensateurs
- Perturbations de certains métabolismes : choline, phénylalanine et purines

Cependant, les méthodes conventionnelles utilisées pour évaluer l'atteinte cardiaque ne démontrent pas d'augmentation significative des lésions cardiaques chez les animaux exposés. Il est dès lors difficile de confirmer l'origine cardiaque des changements métaboliques décrits chez les animaux exposés. Il est toutefois possible que l'étude métabonomique réalisée ait pu mettre en évidence des signes précoces de souffrance cellulaire n'induisant pas de lésions morphologiques et structurelles détectables par les méthodes conventionnelles. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer l'origine cardiaque ou extracardiaque des changements métaboliques observés. En effet, certains de ces changements peuvent aussi avoir une origine hépatique ou rénale, par exemple.

L'étude histologique du cœur réalisée chez les rats SHR tend à montrer une tendance spontanée de cette souche à développer de petits infarctus du myocarde, dont la cause peut être attribuée à l'hypertension, connue pour augmenter l'incidence de pathologies cardiovasculaires. Dès lors, cette fragilité cardiovasculaire de la souche SHR pourrait avoir permis la mise en évidence de signes précoces de souffrance cellulaire des cardiomyocytes par l'approche métabonomique utilisée. Cela est encourageant pour des investigations futures. Ne disposant pas de données histologiques relatives au myocarde des rats DAHL/SS, il est actuellement impossible d'évaluer la fragilité cardiovasculaire de cette souche et son impact sur les données métabonomiques générées.

L'étude métabonomique a révélé des différences importantes entre les deux souches de rats, au niveau des signatures métaboliques des animaux exposés au Rofécoxib. Les changements métaboliques et les hypothèses en découlant se montrent en effet très différents pour la souche DAHL/SS, par rapport aux deux études réalisées sur la souche SHR. Cela peut être la conséquence de l'hypertension, dont les mécanismes d'installation sont très différents entre les deux souches. Cela pourrait résulter en une différence constitutive du profil métabolique



de base des individus, lié aux particularités génotypiques et phénotypiques de leur souche, ainsi que leur susceptibilité à développer des problèmes cardiovasculaires. Des investigations supplémentaires semblent s'imposer pour affiner la signature métabolique d'une nécrose cardiaque induite par les AINS et pour valider de potentiels biomarqueurs exploitables lors d'études précliniques.

## 2. Perspectives

Le travail réalisé amène un lot d'hypothèses et de questions auxquelles les résultats obtenus et analysés à ce stade ne peuvent répondre. Différentes perspectives de recherche peuvent être envisagées pour poursuivre l'étude de la cardiotoxicité des AINS. Ces perspectives peuvent se classer en deux catégories : une première catégorie reprenant les perspectives « à court terme », dont la réalisation complèterait les résultats obtenus et l'analyse qui en découle ainsi qu'une deuxième catégorie reprenant les perspectives « à long terme » visant la réalisation de nouvelles manipulations.

### 2.1 Perspectives à court terme

Une analyse histologique du foie et du rein se montre judicieuse pour évaluer l'atteinte de ces organes dont d'éventuelles lésions pourraient influencer la signature métabolique des animaux exposés. Il semble également intéressant de joindre à cette étude histologique le dosage de biomarqueurs conventionnels de toxicité hépatique, par exemple le dosage des transaminases hépatiques. Au même titre, l'évaluation de la fonction rénale semble tout aussi pertinente. Celle-ci peut se réaliser au moyen de la détermination de la concentration sérique de créatinine pour la filtration glomérulaire et par la présence de glycosurie pour les lésions tubulaires. Pour les individus de l'étude sur le Diclofénac, une analyse histologique de l'estomac et du duodénum est nécessaire pour détecter d'éventuelles ulcérations, pouvant également influencer la signature métabolique.

Une étude métabonomique sur les *sera* récoltés permettrait d'affiner, de confirmer ou d'exclure certaines hypothèses établies au départ des variations urinaires.

Au même titre, l'étude sur les rats DAHL/SS mérite d'être complétée en vue d'obtenir les données relatives au dosage des biomarqueurs conventionnels, à l'histologie de tous les organes prélevés et à l'étude métabonomique sur les *sera*.

Le dosage de marqueurs de stress oxydatif dans les urines et/ou *sera*, par exemple la nitrotyrosine (16) ou la 8-hydroxyguanosine (73), pourrait être envisagé afin de confirmer l'hypothèse d'un stress oxydatif augmenté chez les animaux SHR exposés.

Certains métabolites discriminants dans les analyses multivariées effectuées n'ont pu être identifiés. Il serait pertinent d'affiner l'identification de ces métabolites par une analyse plus approfondie des spectres obtenus et, au besoin, par le recours à une technique d'analyse plus



ciblée, comme la spectrométrie de masse. Cela permettrait de générer de nouvelles hypothèses sur les voies biochimiques atteintes et d'appuyer certaines hypothèses déjà énoncées.

## 2.2 Perspectives à long terme

Au vu des résultats actuellement obtenus, il semble intéressant d'améliorer le modèle étudié afin de potentialiser davantage l'apparition de lésions cardiaques induites par les AINS.

A cette fin, plusieurs paramètres du modèle peuvent être changés :

- La dose administrée peut être augmentée car l'effet semble être dose-dépendant.
- La durée de l'exposition peut être augmentée. Il semble en effet que l'incidence des effets cardiovasculaires soit supérieure chez les patients sous traitement chronique de longue durée, bien que cela soit sujet à controverse.
- Développer un facteur de risque cardiovasculaire supplémentaire dans le modèle en utilisant des animaux hypertendus plus âgés.
- Potentialiser la toxicité cardiaque des AINS en ajoutant une autre molécule. Par exemple, Singh et al. mentionnent un effet adverse cardiaque important lors de l'association de la Doxorubicine et du Diclofénac (41).

L'utilisation d'un contrôle positif de nécrose cardiaque s'avère intéressante dans la comparaison des profils métaboliques afin de disposer d'une signature modèle. Un tel contrôle positif pourrait être réalisé par l'emploi d'une molécule dont la cardiotoxicité est bien établie ou par une méthode alternative.

L'augmentation du nombre d'animaux utilisés permettrait d'obtenir une meilleure puissance des tests statistiques employés. En effet, le nombre utilisé étant faible, les petites différences des données quantitatives entre les groupes sont rarement déterminées comme significatives, surtout lorsqu'il existe un peu de variabilité inter-individu. L'emploi d'un plus grand nombre d'individus par groupe permettrait de palier à ce problème et autoriserait, si les autres conditions sont rencontrées, d'utiliser des tests paramétriques dont la puissance est supérieure aux tests non-paramétriques.

L'évaluation de l'aspect fonctionnel du cœur, initialement prévue mais non-réalisée pour cause logistique, pourrait également être intéressante afin de mettre en évidence des lésions cardiaques indétectables par les autres techniques conventionnelles ciblant l'aspect structurel et morphologique uniquement.

Enfin, une comparaison entre la souche de rats SHR et la souche Wistar Kyoto, contrôle de la souche SHR, semble être justifiée afin de s'affranchir de la fragilité cardiovasculaire liée à l'hypertension. Elle permettrait, en comparant des données métabonomiques issues de rats normo-tendus exposés, dans les mêmes conditions, aux mêmes doses de Diclofénac ou de Rofécoxib, d'évaluer l'impact de la présence de l'hypertension sur les effets adverses de ces AINS, en particulier les effets cardiotoxiques.



# **BIBLIOGRAPHIE**



1. Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2014;16(5):821–47.
2. Jouzeau J-Y, Daouphars M, Benani A, Netter P. Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004;28.
3. Singh BK, Haque SE, Pillai KK. Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2014 Feb;10(2):143–56.
4. Chaiamnuay S, Allison JJ, Curtis JR. Risks versus benefits of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Health Syst Pharm*. 2006 Oct 1;63(19):1837–51.
5. Tomic Z, Milijasevic B, Sabo A, Dusan L, Jakovljevic V, Mikov M, et al. Diclofenac and ketoprofen liver toxicity in rat. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2008;33(4):253–60.
6. Solomon DH, Avorn J, Stürmer T, Glynn RJ, Mogun H, Schneeweiss S. Cardiovascular outcomes in new users of coxibs and nonsteroidal antiinflammatory drugs: High-risk subgroups and time course of risk. *Arthritis & Rheumatism*. 2006 May;54(5):1378–89.
7. Schjerning Olsen A-M, Fosbøl EL, Gislason GH. The Impact of NSAID Treatment on Cardiovascular Risk - Insight from Danish Observational Data. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2014 Aug;115(2):179–84.
8. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ*. 2011 Jan 11;342(jan11 1):c7086–c7086.
9. McGettigan P, Henry D. Cox-2, NSAID and cardiovascular risks. *Current Cardiovascular Risk Reports*. 2007;1:296–302.
10. Hernández-Díaz S, Varas-Lorenzo C, García Rodríguez LA. Non-steroidal antiinflammatory drugs and the risk of acute myocardial infarction. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2006;98(3):266–74.
11. Bhosale U, Quraishi N, Yegnanarayan R, Devasthale D. A cohort study to evaluate cardiovascular risk of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors (COX-Is) in arthritic patients attending orthopedic department of a tertiary care hospital. *Nigerian Medical Journal*. 2014;55(5):417.
12. Aljadhey H, Tu W, Hansen RA, Blalock SJ, Brater DC, Murray MD. Comparative effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on blood pressure in patients with hypertension. *BMC cardiovascular disorders*. 2012;12(1):93.
13. Hermann M. Differential Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors on Endothelial Function in Salt-Induced Hypertension. *Circulation*. 2003 Nov 3;108(19):2308–11.
14. Solomon DH, Schneeweiss S, Levin R, Avorn J. Relationship Between COX-2 Specific Inhibitors and Hypertension. *Hypertension*. 2004 Aug 1;44(2):140–5.



15. Yarishkin OV, Hwang EM, Kim D, Yoo JC, Kang SS, Kim DR, et al. Diclofenac, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> Channels in Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;13(6):437.
16. Li H, Hortmann M, Daiber A, Oelze M, Ostad MA, Schwarz PM, et al. Cyclooxygenase 2-Selective and Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Oxidative Stress by Up-Regulating Vascular NADPH Oxidases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008 Jun 4;326(3):745–53.
17. Mason RP, Walter MF, McNulty HP, Lockwood SF, Byun J, Day CA, et al. Rofecoxib increases susceptibility of human LDL and membrane lipids to oxidative damage: a mechanism of cardiotoxicity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2006;47:S7–14.
18. Antman EM, Demets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase Inhibition and Cardiovascular Risk. *Circulation*. 2005 Aug 2;112(5):759–70.
19. Liu G, Yan Y-P, Zheng X-X, Xu Y-L, Lu J, Hui R-T, et al. Meta-Analysis of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use and Risk of Atrial Fibrillation. *The American Journal of Cardiology*. 2014 Nov;114(10):1523–9.
20. Bavry AA, Khaliq A, Gong Y, Handberg EM, Cooper-DeHoff RM, Pepine CJ. Harmful Effects of NSAIDs among Patients with Hypertension and Coronary Artery Disease. *The American Journal of Medicine*. 2011 Jul;124(7):614–20.
21. Scott PA, Kingsley GH, Scott DL. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cardiac failure: meta-analyses of observational studies and randomised controlled trials. *European Journal of Heart Failure*. 2008 Nov;10(11):1102–7.
22. Schjerning Olsen A-M, Fosbøl EL, Lindhardsen J, Andersson C, Folke F, Nielsen MB, et al. Cause-Specific Cardiovascular Risk Associated with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs among Myocardial Infarction Patients - A Nationwide Study. Thiem U, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jan 30;8(1):e54309.
23. Ganong W. *Physiologie médicale*. De Boeck Supérieur; 2005. 868 p.
24. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*. 2000;80(3):1107–213.
25. Er A, Dik B, Corum O, Cetin G. Cardiac Safety of Diclofenac at a Single Dose in Ram. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:1–4.
26. Lévy P-Y. Les nouveaux marqueurs cardiaques dans l'exploration des syndromes coronariens aigus. *Sang thrombose vaisseaux*. 2004;16(6):289–94.
27. Brooklyn College. Brooklyn College - Biology [Internet]. Brooklyn College. [cited 2015 Mar 7]. Available from: [http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/coup\\_ox.htm](http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/coup_ox.htm)
28. Cooper GM. *The Molecular Composition of Cells*. 2000 [cited 2015 Jul 3]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9879/>
29. Robertson DG. Metabonomics in Toxicology: A Review. *Toxicological Sciences*. 2005 Feb 2;85(2):809–22.



30. Dieterle F, Riefke B, Schlotterbeck G, Ross A, Senn H, Amberg A. NMR and MS methods for metabonomics. *Methods Mol Biol.* 2011;691:385–415.
31. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols.* 2007 Oct;2(11):2692–703.
32. Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TMD, Holmes E, et al. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat Protoc.* 2010 Jun;5(6):1019–32.
33. Coen M. A metabonomic approach for mechanistic exploration of pre-clinical toxicology. *Toxicology.* 2010 Dec 30;278(3):326–40.
34. Demirdjian H. *Les origines de l'IRM : la résonance magnétique nucléaire.* 2007.
35. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999 Nov;29(11):1181–9.
36. Leser E. Vioxx : Merck condamné à verser 253 millions de dollars à une veuve [Internet]. *Le Monde.fr.* 2005 [cited 2015 Mar 3]. Available from: [http://www.lemonde.fr/economie/article/2005/08/20/vioxx-merck-condamne-a-verser-253-millions-de-dollars-a-une-veuve\\_681452\\_3234.html](http://www.lemonde.fr/economie/article/2005/08/20/vioxx-merck-condamne-a-verser-253-millions-de-dollars-a-une-veuve_681452_3234.html)
37. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D901–6.
38. Hianchi O, Foz O, Imbasciati E. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences.* 1974;14:339–47.
39. Tecniplast. Cage à métabolisme [Internet]. [cited 2015 Dec 18]. Available from: <http://www.tecniplast.it/fr/product/cages-mtabolisme.html>
40. Höcherl K, Endemann D, Kammerl MC, Grobecker HF, Kurtz A. Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br J Pharmacol.* 2002 Aug;136(8):1117–26.
41. Singh BK, Pathan RA, Pillai KK, Haque SE, Dubey K. Diclofenac sodium, a nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drug aggravates doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010 Feb;55(2):139–44.
42. Kent Scientific Corporation. CODA High Throughput [Internet]. [cited 2015 Dec 18]. Available from: [https://www.kentscientific.com/products/productView.asp?productID=6462&Mouse\\_Rat=Non-Invasive+Blood+Pressure&Products=CODA+High+Throughput](https://www.kentscientific.com/products/productView.asp?productID=6462&Mouse_Rat=Non-Invasive+Blood+Pressure&Products=CODA+High+Throughput)
43. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D521–6.
44. Cui Q, Lewis IA, Hegeman AD, Anderson ME, Li J, Schulte CF, et al. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol.* 2008 Feb;26(2):162–4.
45. Nabhan AF, Elsedawy MM. Tight control of mild-moderate pre-existing or non-proteinuric gestational hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(7):CD006907.



46. Hérin M. Atlas d'anatomie pathologie générale [Internet]. Namur; 2002 [cited 2015 Oct 12]. Available from: [http://www.histology.be/Atlas\\_AnaPath\\_M\\_Herin.pdf](http://www.histology.be/Atlas_AnaPath_M_Herin.pdf)
47. XAmplified. Citric Acid or Krebs cycle completed in Nine steps [Internet]. [cited 2015 Dec 27]. Available from: <http://chemistrylearning.com/wp-content/uploads/2009/04/image0013.jpg>
48. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*. 2001 Apr;37(4):1053–9.
49. Murray RK, Doornik L. *Biochimie de Harper*. 3ème édition française. Bruxelles: De Boeck Université; 2008.
50. Lu C, Wang Y, Sheng Z, Liu G, Fu Z, Zhao J, et al. NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Nov 1;248(3):178–84.
51. Liu Y, Huang R, Liu L, Peng J, Xiao B, Yang J, et al. Metabonomics study of urine from Sprague-Dawley rats exposed to Huang-yao-zi using (1)H NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*. 2010 May 1;52(1):136–41.
52. Tang B, Ding J, Wu F, Chen L, Yang Y, Song F. 1H NMR-based metabonomics study of the urinary biochemical changes in Kansui treated rat. *J Ethnopharmacol*. 2012 May 7;141(1):134–42.
53. Yamashita H, Itsuki A, Kimoto M, Hiemori M, Tsuji H. Acetate generation in rat liver mitochondria; acetyl-CoA hydrolase activity is demonstrated by 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jan;1761(1):17–23.
54. Palmer M. Human Metabolism Lecture Notes [Internet]. Ontario; 2014 [cited 2015 Dec 27]. Available from: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/>
55. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem*. 1992 Oct;38(10):1933–53.
56. Gilles R. *Physiologie animale*. Bruxelles: De Boeck; 2006.
57. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr*. 2015;66(3):393–405.
58. Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta*. 2012 Oct 9;413(19-20):1446–53.
59. Hogeveen M, den Heijer M, Semmekrot BA, Sporcken JM, Ueland PM, Blom HJ. Umbilical choline and related methylamines betaine and dimethylglycine in relation to birth weight. *Pediatric Research*. 2013 Jun;73(6):783–7.
60. Meister A, Kleuser BP, Ollert MW, Gercken G. Betaine generation in cardiac myocytes after adrenergic activation of phosphatidylcholine hydrolysis. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 May;28(5):1109–18.
61. Schaffer SW, Jong CJ, Kc R, Azuma J. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *Journal of Biomedical Science*. 2010 Aug 24;17(Suppl 1):S2.



62. Métabolisme de l'hippurate [Internet]. [cited 2015 Dec 27]. Available from: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/737/flashcards/1944737/jpg/hippurate1349835097448.jpg>
63. Tessari P, Vettore M, Millionsi R, Puricelli L, Orlando R. Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Jan;13(1):81–6.
64. Kopple JD. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6 Suppl 1):1586S – 1590S; discussion 1597S – 1598S.
65. Suchy-Dicey AM, Laha T, Hoofnagle A, Newitt R, Sirich TL, Meyer TW, et al. Tubular Secretion in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Nov 27;
66. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food Chem Toxicol*. 2013 Oct;60:38–44.
67. Niwa T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J Med Sci*. 2010 Feb;72(1-2):1–11.
68. Adesso S, Popolo A, Bianco G, Sorrentino R, Pinto A, Autore G, et al. The uremic toxin indoxyl sulphate enhances macrophage response to LPS. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e76778.
69. Cao X-S, Chen J, Zou J-Z, Zhong Y-H, Teng J, Ji J, et al. Association of indoxyl sulfate with heart failure among patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Jan 7;10(1):111–9.
70. Laudanno OM, Cesolari JA, Esnarriaga J, Rista L, Piombo G, Maglione C, et al. Gastrointestinal damage induced by celecoxib and rofecoxib in rats. *Digestive diseases and sciences*. 2001;46(4):779–84.
71. Nevedomskaya E, Pacchiarotta T, Artemov A, Meissner A, van Nieuwkoop C, van Dissel JT, et al. (1)H NMR-based metabolic profiling of urinary tract infection: combining multiple statistical models and clinical data. *Metabolomics*. 2012 Dec;8(6):1227–35.
72. Gupta A, Dwivedi M, Nagana Gowda GA, Ayyagari A, Mahdi AA, Bhandari M, et al. (1)H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed*. 2005 Aug;18(5):293–9.
73. Pelclova D, Zdimal V, Fenclova Z, Vlckova S, Turci F, Corazzari I, et al. Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO<sub>2</sub> (nano)particles. *Occup Environ Med*. 2015 Dec 7;