

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 août 2007 (02.08.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/085652 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/5415 (2006.01) **A61P 17/00** (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01) **A61P 17/04** (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2007/050828

(22) Date de dépôt international :
29 janvier 2007 (29.01.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0600811 30 janvier 2006 (30.01.2006) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **PIERRE
FABRE MEDICAMENT** [FR/FR]; 45, Place Abel Gance,
F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **LATIL,
Alain** [FR/FR]; 15, rue du Canigou, F-31120 Roquettes
(FR). **TISNE-VERSAILLES, Jacky** [FR/FR]; 168 route
de Puech-Auriol, F-81100 Castres (FR).

(74) Mandataire : **SCHRIMPF, WARCOIN, AHNER, TEX-
IER, LE FORESTIER, CALLON DE LAMARCK,
COLLIN, TETAZ-Cabinet Regimbeau**; 20, rue De
Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: USE OF THE (S) ENANTIOMER OF MEQUITAZINE FOR PREPARING A MEDICAMENT, WHILE AT THE SAME
TIME LIMITING GENOMIC TOXICITY

(54) Titre : UTILISATION DE L'ENANTIOMERE (S) DE LA MEQUITAZINE POUR LA PREPARATION D'UN MEDICA-
MENT, TOUT EN LIMITANT LA TOXICITE GENOMIQUE

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a mixture of enantiomers of 10-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylmethyl)-10H-
phenothiazine (Mequitazine) and/or of at least one of its metabolites, and also the pharmaceutically acceptable salts thereof, said
mixture being enriched in the enantiomer of absolute configuration (S), for the preparation of an antihistamine medicament intended
to prevent or treat allergic conditions, while at the same time limiting the risks of cell toxicity, in particular tissue and/or organ
toxicity.

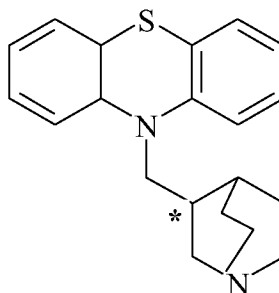
(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'un mélange d'énantiomères du 10-(1- azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl)-mé-
thyl)-10H-phénothiazine (Méquitazine) et/ou d'au moins un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables,
ledit mélange étant enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S), pour la préparation d'un médicament antihistaminique des-
tiné à prévenir ou traiter des affections allergiques, tout en limitant les risques de toxicité cellulaire, notamment la toxicité tissulaire
et/ou organique.

WO 2007/085652 A1

«Utilisation de l'énantiomère (S) de la Méquitazine pour la préparation d'un médicament, tout en limitant la toxicité génomique»

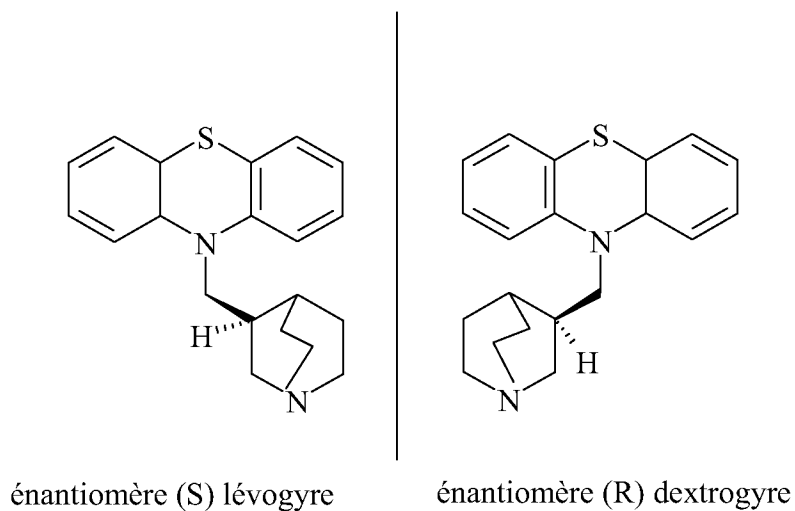
La présente invention concerne l'utilisation d'un mélange d'énantiomères du 10-(1-
5 azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-méthyl)-10H-phénothiazine (Méquitazine) et/ou d'au moins
un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, ledit
mélange étant enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S), pour la préparation
d'un médicament antihistaminique destiné à prévenir ou traiter des affections
allergiques, tout en limitant les risques de toxicité cellulaire, notamment la toxicité
10 tissulaire et/ou organique.

La méquitazine est un dérivé de phénothiazine substitué de formule :



15

La molécule de Méquitazine possède un carbone asymétrique conduisant à deux configurations spatiales différentes :



La Méquitazine existe ainsi sous la forme de deux énantiomères optiquement actifs :
l'énantiomère lévogyre de configuration (S) et l'énantiomère dextrogyre de
5 configuration (R).

Les deux énantiomères de la Méquitazine peuvent être séparés et isolés selon des
procédés décrits par exemple dans les demandes de brevet EP 0089860 ou EP 0093643.

- 10 La Méquitazine est un antihistaminique H1 utilisé pour prévenir ou traiter diverses
manifestations d'origine allergique, telles que :
- les réactions allergiques, à savoir le traitement symptomatique des réactions
d'hypersensibilité immédiate cutanées, oculaires, ORL et des réactions allergiques au
cours des traitements de désensibilisation,
 - 15 • la rhinite allergique, en particulier le rhume des foins,
 - la rhinite vasomotrice,
 - la conjonctivite allergique,
 - le prurit,
 - l'urticaire, en particulier l'urticaire aiguë,
 - 20 • l'allergie médicamenteuse.

En France, le mélange racémique de Méquitazine est commercialisé sous forme de
comprimé (Quitadrill®) ou bien sous forme de sirop (Primalan®).

La méquitazine est classée parmi les antihistaminiques H1 non sédatifs. La méquitazine possède, parallèlement à son activité antihistaminique H1, un effet adrénolytique alpha et un effet atropinique pouvant se traduire, par exemple, par une sécheresse de la bouche
5 ou un trouble de l'accommodation. Les propriétés pharmacologiques de la méquitazine ne diffèrent de celles des antihistaminiques sédatifs qu'à la dose la plus faible 5 mg qui n'est pas sédatif; à la dose de 10 mg elle est sédatif.

Dans certaines conditions, notamment en cas de surdosage ou chez des personnes
10 prédisposées, certains antihistaminiques H1 peuvent induire une toxicité cardiaque et provoquer des troubles cardiaques graves, pouvant être parfois mortels. Par exemple, la terfénadine et l'astémizole ont été retirés du commerce parce qu'ils sont, dans certaines conditions, à l'origine de troubles de la conduction cardiaque, comme l'allongement de l'espace QT pouvant conduire à des torsades de pointe. Cet effet indésirable est lié à leur
15 effet sur les canaux potassiques notamment, conduisant à un ralentissement de la vitesse de repolarisation. Par ailleurs, la mizolastine et l'ébastine peuvent aussi, en cas de surdosage, entraîner un allongement de l'espace QT. La prise concomitante de médicaments pouvant ralentir leur catabolisme est à éviter, notamment macrolides et antifongiques imidazolés.

20

On a étudié le mode d'action de la terfénadine. Cette molécule possède une action bloquante sur les canaux potassiques équivalente à la quinidine et cela avant sa transformation lors du premier passage hépatique, en substance active, la terfénadine carboxylate. Cette dernière, par contre, ne possède pas les mêmes caractéristiques de
25 blocage au niveau des canaux potassiques. L'enzyme responsable de cette biotransformation hépatique est la CYP3A4 dépendante du cytochrome P 450. L'activité de cette enzyme est très variable dans la population générale et la différence de puissance d'activité entre les deux extrêmes de la distribution est de l'ordre d'un facteur 10, ce qui peut expliquer les différences de concentration de terfénadine et de
30 terfénadine carboxylate pour une même dose de médicament absorbée en fonction des individus et en dehors de tout processus pathologique. Ainsi toute substance inhibant cette enzyme hépatique augmente le taux de terfénadine et donc le pouvoir de blocage

des canaux potassiques ce qui allonge le QT de manière pathologique créant des post-potentiels tardifs pouvant déclencher une torsade de pointes. Parmi les substances capables de bloquer cette enzyme, on retient justement l'érythromycine, certains imidazolés ainsi que des substances contenues dans les flavinoïdes (jus de

5 pamplemousse) expliquant ainsi les dangers d'une éventuelle association thérapeutique. S'agissant de la Méquitazine, on a rapporté le cas d'une jeune femme atteinte du syndrome QT long congénital, ayant présenté des complications soudaines cardiaques (des torsades de pointes) suite à l'administration simultanée de Méquitazine et de spiromycine (F. Verdun et al., Arch Mal Cœur Vaiss. 1997 Jan ; 90(1) : 103-6). La

10 responsabilité de l'association méquitazine-spiromycine dans l'augmentation subite du QT, plutôt que celle de l'un des deux médicaments est fortement privilégiée. En effet, on suppose que la spiromycine a peut-être bloqué l'enzyme qui favorise la dégradation de la méquitazine. Cette enzyme pourrait être la CYP2D6 (Janicki et al, Med SCI Monit, 2005 ; 11(10) : RA 322-328).

15

Dans un souci de prévenir la survenue de tels accidents potentiellement dangereux pour la vie des patients, les inventeurs ont maintenant découvert de manière surprenante que l'énantiomère (S) de la Méquitazine induit moins de toxicité cellulaire, en particulier moins de toxicité cardiaque, que le mélange racémique ou l'énantiomère (R) de la

20 Méquitazine.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères du 10-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-méthyl)-10H-phénothiazine (Méquitazine) et/ou d'au moins un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, ledit

25 mélange étant enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S), pour la préparation d'un médicament antihistaminique destiné à prévenir ou traiter des affections allergiques, tout en limitant les risques de toxicité cellulaire, notamment la toxicité tissulaire et/ou organique, en particulier les risques de cardiotoxicité.

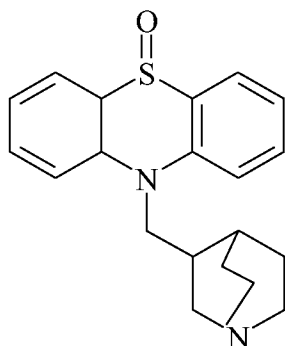
30 On entend par toxicité cellulaire, la toxicité envers les cellules, c'est-à-dire le caractère d'une substance capable d'altérer l'activité normale des cellules ou d'entraîner la mort

des cellules. La toxicité est tissulaire ou organique si l'altération s'étend respectivement au tissu ou à l'organe constitué par ces cellules et à leur fonction.

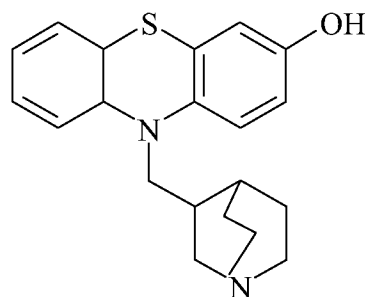
La cardiotoxicité désigne la toxicité envers les cellules cardiaques. Elle entraîne en particulier des altérations de la fonction du myocarde pouvant aller jusqu'à la nécrose ou l'apoptose des cellules myocardiques. Ces altérations peuvent conduire à divers troubles cardiaques, tels que l'ischémie myocardique, la prolongation de l'intervalle QT ou QTc, l'arythmie cardiaque, la cardiomyopathie, l'hypertrophie cardiaque, l'infarctus du myocarde, des troubles diastoliques ou une dysfonction systolique (Y.James Kang, Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiotoxicity, Environmental Health Perspectives, Vol. 109, suppl. 1, March 2001).

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères du 10-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-méthyl)-10H-phénothiazine (Méquitazine) et/ou d'au moins un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, ledit mélange étant enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S), pour la préparation d'un médicament antihistaminique destiné à prévenir ou traiter des affections allergiques, tout en limitant les risques d'ischémie myocardique, de prolongation de l'intervalle QT ou QTc, d'arythmie cardiaque, notamment les torsades de pointes, de cardiomyopathie, d'hypertrophie cardiaque ou d'infarctus du myocarde, de trouble diastolique ou de dysfonction systolique.

La métabolisation de la méquitazine conduit principalement à deux produits : la forme hydroxylée et la forme S-oxydée.



Forme S-oxydée



Forme hydroxylée

On entend par « métabolite » de la méquitazine l'une de ces deux formes.

- 5 «Sel pharmaceutiquement acceptable» désigne tous les sels qui conservent l'efficacité et les propriétés d'un principe actif et qui ne présentent pas d'effets secondaires. De préférence, il s'agit de sels d'acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables. A titre d'exemples préférés, mais non limitatifs, on mentionnera les halogénohydrates, tels que chlorhydrate et le bromhydrate, le fumarate, le maléate, l'oxalate, le citrate, le méthane sulfonate, le glutamate, le tartrate, le mésylate, et leurs
- 10 hydrates éventuels.

Selon la présente invention, le sel préféré de la méquitazine est le chlorhydrate de méquitazine.

- 15 Dans le cadre de la présente invention, « mélange d'énantiomères de la méquitazine enrichi en énantiomère (S) » signifie un mélange d'énantiomère (S) et d'énantiomère (R) de la méquitazine dans lequel le ratio massique entre l'énantiomère (S) et l'énantiomère (R) est supérieur à 1 : 1.

- 20 De préférence, le ratio massique entre l'énantiomère (S) et l'énantiomère (R) de la Méquitazine dans le dit mélange est supérieur à 95 : 5 ((S) : (R)), de préférence supérieur à 99:1, de manière encore plus préférée supérieur à 99,5:0,5. Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, le dit mélange d'énantiomères est substantiellement pur en l'énantiomère (S).

Le mélange d'énantiomères selon la présente invention est particulièrement utile pour la préparation de médicaments destinés à prévenir ou traiter des affections allergiques notamment choisies parmi la rhinite allergique, la rhinite vasomotrice, la rhinite spasmodique, la conjonctivite allergique, l'œdème de Quincke, l'urticaire, les allergies
5 médicamenteuses, les affections dermatologiques prurigineuses.

Le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère (S) substantiellement pur, est administré à tout type de patients nécessitant un tel traitement, que ce soit dans un but thérapeutique et/ou prophylactique. Dans un but thérapeutique,
10 on vise l'éradication ou l'amélioration de l'affection à traiter et/ou d'un ou plusieurs symptôme(s) associé(s). Dans un but prophylactique, on vise la prévention de l'apparition de l'affection à traiter et/ou d'un ou plusieurs symptôme(s) associé(s). Néanmoins, le mélange d'énantiomères selon l'invention est plus particulièrement adapté à des populations de patients à risque qui seraient susceptibles de développer
15 certaines manifestations cliniques indésirables au cours ou à la suite d'un traitement par la Méquitazine sous forme racémique. Il s'agit notamment des patients présentant une cardiopathie, des troubles électrolytiques, une bradicardie ou atteints du syndrome du QT long congénital.

20 EXEMPLE 1 : TEST DE PREDICTIVITE PHARMACO-TOXICO-GENOMIQUE IN VITRO

1. Les composés

Les composés testés sont la méquitazine sous forme racémique, la l-méquitazine et la d-méquitazine. Pour les besoins de l'étude, chaque composé a été solubilisé dans du
25 DMSO du fait de leur insolubilité dans l'eau et de l'impact de l'éthanol et du chlorure de méthylène sur l'extraction des ARNs.

Les principales caractéristiques de ces composés sont résumées dans le Tableau 1 ci-dessous. La Loratadine (SIGMA Catalogue #L9664-10MG) a été utilisée comme
30 comparateur.

Tableau 1 : Les composés

Produit	Quantité	Poids Moléculaire	Etat	Solubilité
Méquitazine	90 mg	322,47	Poudre	chl. Méthylène et éthanol
l-Méquitazine	100 mg	322,47	Poudre	chl. Méthylène et éthanol
d-Méquitazine	90 mg	322,47	Poudre	chl. Méthylène et éthanol
Loratadine	10 mg	382,89	Poudre	DMSO

2. Les cellules

Les cellules testées sont des cardiomyocytes de rat : H9c2 (2-1)

ECACC N° : 88092904 (fournisseur SIGMA)

- 5 Description: Rat DB1X heart myoblast

Les cellules sont amplifiées dans des conditions standard de culture (Voir ci-après).

3. Toxicogénomique

10 3.1 Méthodologie

Des cardiomyocytes de rat (lignée H9c2) sont traités avec 15 μ M de méquitazine, L-méquitazine, d-méquitazine et loratadine.

L'ARN est extrait à la fois des cellules H9c2 traitées avec le véhicule (DMSO, qui sert de contrôle) et des cellules traitées par les composés après une incubation de 6 heures et
15 de 24 heures. L'impact du traitement sur l'expression de 97 gènes sélectionnés comme potentiels marqueurs de toxicité est analysé par RT-PCR quantitative.

Les signatures moléculaires induites par les composés permettent de définir un index de toxicité des différents composés.

20 3.2 Cellules et traitement

Les protocoles utilisés pour la culture et le traitement des cellules sont les suivants :

- Milieu et culture : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) - high glucose (Cambrex Catalogue # BE12-614F) ; 2 mM L-Glutamine (Cambrex Catalogue # US17-605C) ; 10 % Serum de veau fœtal (Gibco BRL, Invitrogen Catalogue # 10108-157).
- 25 • Conditions de culture : 37° C ; 5 % CO₂
- Procédure : 220 000 cellules sontensemencées par puit (6 multi-well plate; Corning Catalogue # 734-1596) à JO dans 3 ml de milieu de culture et incubées à 37° C, 5 %

CO₂ pendant 48 h (NB. Temps de doublement de H9c2 = 39 heures). Le traitement des cellules par les composés à lieu à J2.

La procédure est décrite ci-dessous :

- 5 • Au jour J0, les cellules H9c2 (Passage 27, 97% de viabilité) sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 220 000 cellules par puit dans un volume total de 2,5 ml et placées pendant 48 heures à 37°C, 5% CO₂.
- Au jour J2, les cellules sont traitées par les composés alors que la confluence est d'environ 70 %.
- 10 Pour une "plaque type" le milieu est aspiré et remplacé dans chacun des 6 puits par :
 1. par du milieu neuf avec 0,015 % de DMSO (véhicule des différents composés).
 2. du milieu neuf avec du méquitazine/D02026 à 15 µM.
 3. du milieu neuf avec du l-méquitazine à 15 µM.
 - 15 4. du milieu neuf avec du d-méquitazine à 15 µM.
 5. du milieu neuf avec du loratadine à 15 µM.

De plus chaque plaque est réalisée en 2 exemplaires afin de prélever les ARNs à deux temps différents (6 heures et 24 heures).

- 20 Les cellules sont placées à 37°C, 5% CO₂
 - A J2, 6 heures après le traitement, le milieu est retiré de chacun des 6 puits de trois plaques (une plaque par concentration), les cellules sont lavées au PBS et reprise avec du RNABle® (Eurobio) pour l'extraction de l'ARN.
 - A J3, 24 heures après l'ajout des composés, une deuxième série de 3 plaques est
 - 25 traitée comme précédemment.

3.3. La RT-PCR quantitative en temps réel

3.3.1. Extraction des ARNs totaux et synthèse des ADNc

30

L'extraction a été réalisée d'après la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). Les protocoles expérimentaux d'extraction des ARN totaux et de la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) sont les suivants.

- Protocole d'extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide de RNABle® (Eurobio, Catalogue # GEXEXT00-0U). Les cellules sont recueillies dans 1 mL de RNABle afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques, puis 100 µL de chloroforme sont rajoutés afin de
5 séparer les protéines des acides nucléiques. Après une centrifugation pendant 20 min à 12500 g, 4° C, la phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récupérée.

Les ARN sont alors précipités par ajout de 600 µL d'isopropanol.

Après 15 minutes à 4° C, les échantillons sont placés une nuit à -20° C. Après centrifugation de 15 min à 4° C, le culot d'ARN obtenu est lavé dans 700 µL d'éthanol
10 à 75° C et centrifugé à 12 500 g pendant 15 minutes à 4° C. Enfin, les culots sont séchés et dissous dans de l'eau millipore.

- Protocole pour Reverse Transcription

Produits :

15 Superscript™ II Reverse Transcriptase, RT 5X, DTT (Invitrogen Catalogue # 18064-014) ; Random Hexamer (Amersham Catalogue # 27-2166-01) ; dNTP set 100 mM solution (Amersham Catalogue # 27-2035-01) ; RNAsine Ribonuclease Inhibitor (Promega Catalogue # N211B).

20 La transcription inverse se réalise pour 1 µg d'ARN dans un volume final de 20 µL contenant 4 µl de tampon RT 5X, 4µl de DTT (dithiotréisol), 1 µL de dNTP (10 mM), 6 µL d'hexamères aléatoires (500 ng/µL), 0,5 µL de RNAsine (40 U/µL) et 0,5 µL de RTase Superscript (200 U/µL). Les échantillons sont ensuite incubés 10 min à 25° C, 50 min à 42° C puis 15 min à 75° C afin d'inactiver l'enzyme, et conservés à 4° C.

25 Les ARN totaux extraits ont été dosés et leurs qualités analysées sur le Bio-analyseur Agilent.

3.3.2. La technique de PCR quantitative

30 • Théorique

La PCR en temps réel est une méthode précise, sensible et rapide qui permet la quantification relative du taux d'expression d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence exprimé de façon ubiquitaire.

- Cette technique permet de quantifier l'ARN messager. Cette opération s'effectue après
- 5 transcription inverse des ARNs en ADN complémentaires par extension de deux amorces situées de part et d'autre de la cible à amplifier grâce à une ADN polymérase.
- L'incorporation d'un fluorophore (SYBR Green), lors de l'étape d'hybridation de l'amplification exponentielle, permet la quantification et le suivi en temps réel de la quantité de produit d'amplification néoformé. Les valeurs quantitatives sont obtenues à
- 10 partir du nombre de cycles seuil (Ct : cycle threshold) auquel l'augmentation du signal, associée à une croissance exponentielle du produit de PCR, commence à être détecté en utilisant un programme d'analyse Biosystems PE selon le manuel du fabricant. Ainsi, plus la quantité d'ADNc du gène cible à l'instant zéro est importante plus le nombre de Ct est faible (nombre de cycle pour atteindre le seuil).

15

Afin de standardiser les analyses effectuées en QRT-PCR, il est nécessaire de quantifier en parallèle au moins un contrôle endogène appelé "gène de référence". Ces gènes doivent avoir une expression constitutive indépendante de la situation traitée ou non traitée des cellules.

- 20 Plusieurs gènes de références ont été testés.

Leurs caractéristiques sont données dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Gènes de référence testés pour l'étude

Gènes		Référence	Amorces	Ct	NTC	Pente
ACTB	Cytoplasmic beta-actin	NM_031144	58U / 115L	18,44	33	3,16
B2M	Beta-2-microglobulin	NM_012512	55U / 122L	16,99	39	3,02
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehy.	NM_017008	853U / 931L	16,24	45	3,3
GUSB	Glucuronidase, beta	NM_017015	820U / 907L	25,83	45	3,23
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	NM_013168	545U / 614L	23,15	36	3,37
PGK1	Phosphoglycerate	NM_053291	1005U / 1080L	19,44	36	3,25

	kinase 1					
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	NM_017101	319U / 401L	19,14	36	3,19
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0	Z29530	613U / 676L	18,45	45	3,37
TFRC	Transferrin receptor protein 1	M58040	841U / 903L	21,72	38	3,05

U représente la position 5' de l'amorce sens d'après la référence GenBank (NM_...)

L représente la position 3' de l'amorce anti-sens d'après la référence GenBank (NM_...)

Le Ct (Cycle Threshold) correspond au nombre de cycle nécessaire pour atteindre, à partir de 12,5 ng d'ADNc (ARN de cœur de rat, BD Biosciences Clontech), le seuil de détection

NTC (Non Template Control) est représentatif du bruit de fond du à la formation de "dimer" d'amorces

La pente est obtenue par une dilution successive (4 points) de 10 en 10. Une pente à 3,32 est représentative d'une efficacité de 100% du couple d'amorces

L'efficacité réelle est donnée par la formule $E = e^{2,3026/pente}$

Les gènes les plus stables après stimulation sont choisis grâce au logiciel Genorm (Vandesompele et al., 2002) qui permet de mesurer le niveau de stabilité d'un gène en fonction de la stimulation. La mesure M obtenue doit être inférieure à 1,5.

- 5 Tous les gènes testés répondent à ce critère (Tableau 3).

- 10 Au vu des résultats, nous avons choisi comme gènes de référence pour cette étude d'utiliser les 2 plus stables: GAPDH qui code pour la Glyceraldehyde-3-phosphate et est couramment utilisé comme contrôle endogène et RPLP0 qui code pour la phosphoprotéine ribosomale de rat P0. Il est à noter que RPLP0 est aussi connu sous le nom de 36B4 qui est largement employé comme gène endogène de contrôle en Northern blot.

- 15 Dans chaque plaque 384 puits, à la fois RPLP0 et GAPDH sont quantifiés dans tous les échantillons analysés.

Dans une plaque type, 10 gènes cible ainsi que les deux gènes de référence sont quantifiés dans un même "run" pour tous les échantillons.

L'expression relative des 97 gènes sélectionnés est calculée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ et le logiciel RQ fournie par le fabricant (Applied Biosystem).

Les valeurs d'expression de chaque gène sont également normalisées, dans un premier temps, de telle manière que la valeur des cellules H9c2 traitées avec le véhicule
5 (contrôle) soit égale à 1.

Ainsi, la valeur RQ obtenue pour chaque composé à un temps donné pour un gène donné, représente l'expression relative du gène après traitement par la même dose de composé (15 μ M) par rapport aux cellules contrôles dont l'ARN a été prélevé au même
10 temps (6 heures ou 24 heures).

Tableau 3: Stabilité des gènes de référence

	HMBS	PGKI	TFRC	PPIA	B2M	RPLP0	GUSB	GAPDH	ACTB
Méquitazine (5mM / 24h)	0,46854678	0,114612992	0,204560146	0,400860175	0,224156618	0,623422552	0,306213862	0,365897636	0,285015049
l-Méquitazine (5mM / 24h)	0,98142573	0,47684986	0,444833239	0,867174056	0,694117111	0,910639377	0,868466738	0,476962253	0,430324385
d-Méquitazine (5mM / 24h)	1,00E+00	0,260455986	0,477940026	0,836324076	0,722621458	0,957802263	0,886458502	0,579028394	0,454646216
Loratadine (5mM / 24h)	0,533792522	0,472691229	0,137815876	0,64573248	0,246913821	0,66507537	0,401076127	0,494472777	0,421992277
DMSO (0,05% / 24h)	0,663691407	0,485725287	0,23411106	0,749570198	0,405563156	0,763885997	0,507530525	0,563188976	0,577676816
Méquitazine (15mM / 6h)	0,544978606	0,486615945	0,3457242	0,828450555	0,552219026	0,72728602	0,637915837	0,612770819	0,510025488
l-Méquitazine (15mM / 6h)	0,355673896	0,411714168	0,159661182	0,462200428	0,229192859	0,672037084	0,29946473	0,368694807	0,388478995
d-Méquitazine (15mM / 6h)	0,487567714	0,532195236	0,251619476	0,762885264	0,305225309	0,744154584	0,494869146	0,580612686	0,547594553
Loratadine (15mM / 6h)	0,588115737	0,647446325	0,183658936	0,862001031	0,286367763	0,792134188	0,483839514	0,517477306	0,798211517
DMSO (0,15% / 6h)	0,745030039	0,677384321	0,797436198	1,00E+00	0,784782078	0,805049417	0,764952727	0,735879781	1,00E+00
Méquitazine (15mM / 24h)	0,534112295	0,320680604	0,256333964	0,267754829	0,217017607	0,550520713	0,255337705	0,246242724	0,245630736
l-Méquitazine (15mM / 24h)	0,727518833	0,378080933	0,667785189	0,520124716	0,610620953	0,875678533	0,736406619	0,454484816	0,347231202
d-Méquitazine (15mM / 24h)	0,528096872	0,369191182	0,604290849	0,436081744	0,682746775	0,704729983	0,669724894	0,340683859	0,295005652
Loratadine (15mM / 24h)	0,443434062	0,279817675	0,1788955	0,33892031	0,157292796	0,397261049	0,196047208	0,333113563	0,403677337
DMSO (0,15% / 24h)	0,140975513	0,101910492	0,067781224	0,159660296	0,028134429	0,137965289	0,034367828	0,089815547	0,134875901
Loratadine (25mM / 24h)	0,871211559	0,746272537	1,00E+00	0,673936702	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,648111752
DMSO (0,25%)	0,850364927	1,00E+00	0,025323322	0,952459729	0,767065404	0,934058782	0,871570638	0,476607315	0,526765585
M < 1,5	0,611	0,772	1,282	0,619	0,780	0,573	0,703	0,578	0,670

La stabilité des gènes de référence est donnée par le logiciel Genorm (Vandesompele et al., 2002). Un facteur de dispersion $M < 1,5$ indique que le gène peut être considéré comme stable. Les gènes les plus stables dans cette étude sont 1. RPLP0 2. GAPDH 3.HMBS 4. PPIA.....

- **Choix des amorces**

Le choix des amorces a été réalisé avec l'assistance de programmes informatiques dont Oligo 4 (National Biosciences, Plymouth, MN). Les critères de sélection concernent la taille du fragment à amplifier (entre 80 et 120 nucléotides), la taille des amorces (entre 21 et 25 nucléotides), la température d'hybridation des amorces (environ 65°C) et la position des amorces; en effet, les amorces sont dessinées de façon à ce que l'une des 2 amorces soit à cheval sur un intron et un exon ou que les 2 amorces soient dans deux exons différents si l'intron les séparant est supérieur à 2KB (sauf pour quelques exceptions de gènes sans intron). Le choix de la position bien spécifique des amorces permet d'éviter l'amplification d'ADN génomique en cas de contamination des échantillons même si aucune contamination n'a été observée sur le Bio-Analyseur (Agilent). Un autre critère de choix important est de s'assurer que le couple d'amorces choisi ne forme pas de duplex qui interférerait de façon non spécifique avec le produit PCR spécifique obtenu et fausserait ainsi le résultat (inhérent à la technique de SYBR). Enfin, les amorces sont choisies de façon à ce qu'elles ne contiennent pas de régions consensus et/ou polymorphismes.

La spécificité totale des séquences nucléotidiques choisies comme amorces du gène cible est testée en réalisant un collage (nucleotide-nucleotide blastn) sur l'ensemble du génome de rat (Altschul et al., 1990).

- **Courbe standard d'amplification**

L'efficacité des amorces est testée par une gamme de dilutions de 10 en 10 (4 points) réalisé sur de l'ARN de cœur de rat (BD Biosciences Clontech, Catalog #: 636623). Seul les couples d'amorces avec une efficacité d'au moins 90% (pente entre 3,32 et 3,70) sont retenus.

Une amplification sans matrice (NTC pour Non Template Control) est également réalisée afin de s'assurer qu'il ne se forme pas de duplex pouvant fausser les résultats de PCR quantitative obtenus par la méthode de SYBR Green.

- **Amplification**

Les amplifications sont réalisées sur un appareil ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) par la méthode de SYBR Green (SYBR Green PCR Core

Reagents kit, Applied Biosystems). L'amplification est constituée d'une étape de dénaturation (10 min à 95°C) puis par la répétition de 40 cycles d'hybridation (15 sec. à 95°C) et d'extension (1 min. à 65°C) qui assurent une duplication exponentielle de chaque brin.

- 5 Les expériences sont effectuées en double pour chaque point de données et les valeurs sont retenues avec un intervalle de confiance de 95%. La courbe de dissociation obtenue sur l'appareil 7900HT permet de s'assurer que le produit d'amplification obtenu est unique et sa spécificité est contrôlée par séquençage direct du produit PCR.

10 • **Choix des Gènes**

Les gènes sélectionnés l'ont été afin de cribler différents processus métaboliques induit en réponse à un stress oxydatif ou métabolique.

- Pour cela, nous avons sélectionné des enzymes de réparation (MGMT, MLH1...), des régulateurs du cycle cellulaire (CDK2, GADD45A, PCNA,...), des facteurs impliqués
15 dans les phénomènes inflammatoires (Chemokines, Interleukines....) et bien évidemment les gènes de la mort cellulaire soit par apoptose (Caspases, gènes de la famille de BCL2....), soit par nécrose (gènes de la famille du TNF...).

Tous ces gènes ont été sélectionnés d'après la littérature et avec l'aide des Oligo GEArray® dédiés.

- 20 La liste des 97 gènes sélectionnés est donnée dans le tableau 4.

4. RESULTATS

- 25 **4.1 Les cellules H9c2 ont été traitées avec 15 µM de méquitazine, de l-méquitazine, de d-méquitazine et de loratadine.**

Les variations d'expression des 97 gènes sélectionnés ont été étudiées, par RT-PCR quantitative (voir Tableau 4).

- L'expression de chacun de ces gènes a été validée sur des ARNs de cœur de rat (BD
30 Biosciences Clontech, Catalog #: 636623). Toutefois, les résultats obtenus sur 16 de ces gènes n'ont pas été retenus du fait de leur faible expression (Ct>33) et par voie de

conséquence de la difficulté d'interprétation des résultats. Ces 16 gènes apparaissent en gras dans le tableau.

Tableau 4 : Liste des gènes quantifiés par RT-PCR quantitative

ADRB2	BETA 2 ADRENERGIC RECEPTOR
ADORA1	ADENOSIN RECEPTOR
ADORA3	ADENOSIN RECEPTOR
ADPRT	(PARP) ADP-RIBOSYLTRANSFERASE (NAD ⁺ ; POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE
AGTRAP	ANGIOTENSIN II RC-ASSOCIATED PROTEIN
AHR	ARYL HYDROCARBON RECEPTOR
AKT1	AKT1 ONCOGENE
ANK3	ANKIRIN G (ASSOCIATED TO NAV 1.5)
ANXA5	ANNEXIN A5
APAF1	APOPTOTIC PROTEASE ACTIVATING FACTOR 1
BAX	BCL2-ASSOCIATED X PROTEIN
BCL2	APOPTOSIS REGULATOR BCL-2
BCL2L1	BCL2-LIKE 1 (BCL-XL)
BCL2L2	BCL2-LIKE 2 (BCLX)
BDKRB1	BRADYKININ RECEPTOR B1
BDKRB2	BRADYKININ RECEPTOR B2
BID	BH3 INTERACTING DOMAIN DEATH AGONIST
BIRC3	INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN 1
CA2	CARBONIC ANHYDRASE II (CYTOSOLIC)
CA4	CARBONIC ANHYDRASE IV (MEMBRANE)
CAPN1	CALPAIN 1 (PTROTEASE)
CAPN2	CALPAIN 2 (PTROTEASE)
CAPN5	CALPAIN 5
CASP1	CASPASE 1, APOPTOSIS-RELATED CYSTEINE PROTEASE
CASP3	CASPASE 3, APOPTOSIS-RELATED CYSTEINE PROTEASE
CASP8	CASPASE 8, APOPTOSIS-RELATED CYSTEINE PROTEASE
CASP9	CASPASE 9, APOPTOSIS-RELATED CYSTEINE PROTEASE
CAT	CATALASE
CCL2	CHEMOKINE, CC MOTIF, LIGAND 2

CCL4	CHEMOKINE, CC MOTIF, LIGAND 4
CCL5	CHEMOKINE, CC MOTIF, LIGAND 5
CDK2	CYCLIN-DEPENDENT KINASE 2
CHEK2	CHECKPOINT KINASE 2
CKM	MUSCLE CREATINE KINASE
CLU	CLUSTERIN
COMT	CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE
CTF1	CARDIOTROPHIN 1
CYCS	CYTOCHROME C SOMATIC
DDIT3	DNA DAMAGE-INDUCIBLE TRANSCRIPT 3
EDN1	ENDOTHELIN 1
EGR1	EARLY GROWTH RESPONSE 1
F2R	COAGULATION FACTOR II (THROMBIN) RECEPTOR 1 SEUL EXON
F3	COAGULATION FACTOR III
FGG	FIBRINOGEN, GAMMA POLYPEPTIDE
FMO4	OXIDATIVE OR METABOLIC STRESS
GADD45A	GROWTH ARREST- AND DNA DAMAGE-INDUCIBLE GENE GADD45, ALPHA
GDF15	GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 15
GPX1	GLUTATHIONE PEROXIDASE
HIF1A	HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1, ALPHA
HMOX1	HEME OXYGENASE (DECYCLING) 1
HSPA1A	HEAT-SHOCK 70-KD PROTEIN 1A
HSPCA	HEAT-SHOCK 90-KD PROTEIN 1, ALPHA
ICAM1	EXTRACELLULAR MATRIX & ADHESION MOLECULE
IL1B	INTERLEUKIN 1-BETA
IL6	INTERLEUKIN 6
IL10	INTERLEUKIN 10
IL18	INTERLEUKIN 18
ITGA7	EXTRACELLULAR MATRIX & ADHESION MOLECULE
ITGB1	EXTRACELLULAR MATRIX & ADHESION MOLECULE
KCNA5	POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SHAKER- RELATED SUBFAMILY, MEMBER 5
KCNB1	POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SHAB-RELATED

	SUBFAMILY, MEMBER 1
KCNE1	POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, ISK-RELATED SUBFAMILY, MEMBER 1
KCNH2	POTASSIUM CHANNEL VOLTAGE GATED (HERG)
LPA	LYSOPHOSPHATIDIC ACID RECEPTOR EDG-2 (LPA RECEPTOR 1) (LPA-1)
MGMT	O-6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE
MIF	MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR
MKI67	PROLIFERATION-RELATED KI-67 ANTIGEN
MLH1	MISMATCH REPAIR PROTEIN 1
MMP9	MATRIX METALLOPROTEINASE 9
MYC	MYC ONCOGENE
NOS1	ENOS, NITRIC OXYDE SYNTHASE 1 (NEURONAL)
NOS3	ENOS, NITRIC OXYDE SYNTHASE 3 (ENDOTHELIAL)
PCNA	PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN
PLAU	PLASMINOGEN ACTIVATOR, UROKINASE
PLAUR	PLASMINOGEN ACTIVATOR, UROKINASE RECEPTOR
PPARG	PEROXISOME PROLIFERATIVE ACTIVATED RECEPTOR, GAMMA
PRDX1	PEROXIREDOXIN 1
PRKAA2	AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE ALPHA 2 CATALYTIC
PRKAB1	AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE BETA 1
PRKAG1	AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE, NONCATALYTIC
PRKAG2	AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE GAMMA 2
RYR2	RYANODINE RECEPTOR (PARTIAL)
SCN5A	(NAV 1.5) PRINCIPAL VOLTAGE-GATED NA CHANNEL
SERPINE1	SERINE (OR CYSTEINE) PROTEINASE INHIBITOR, CLADE
SLC8A1	NCX1 EXHANGER
SLC9A1	SOLUTE CARRIER FAMILY 9, ISOFORM A1 (NHE1)
SOD1	SUPEROXIDE DISMUTASE 1
SOD2	SUPEROXIDE DISMUTASE 2
TIMP1	TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 1
TNF	TUMOR NECROSIS FACTOR
TNFSF5	TUMOR NECROSIS FACTOR (LIGAND) SUPERFAMILY
TNFSF6	TUMOR NECROSIS FACTOR LIGAND SUPERFAMILY,

MEMBER 6

TNFSF10	TUMOR NECROSIS FACTOR LIGAND SUPERFAMILY, MEMBER 10
TNFRSF1A	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 1A
TNFRSF1B	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY
TNFRSF6	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY
TNNI3	TROPONIN
TOP2A	TOPOISOMERASE (DNA) 2 ALPHA
TP53	TUMOR PROTEIN P53
TPSB1	TRYPTASE ALPHA/BETA 1
TPSG1	TRYPTASE GAMMA 1
TRPC1	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, SUBFAMILY C, MEMBER 1
VDAC1	VOLTAGE-DEPENDENT ANION CHANNEL 1

Les gènes en gras n'ont pas été analysés du fait de leurs faibles expressions (Ct > 33) dans le modèle H9c2

Sur les 81 gènes qui ont été analysés, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à tous les gènes qui sont dérégulés d'un facteur > 2 par rapport à la situation des cellules non-traitées.

5

Quelques inductions ou répressions sont observées dès 6 heures d'exposition avec les composés, il s'agit des gènes impliqués dans les phénomènes d'apoptose : APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1), BCL2L1 (Bcl2-Like 1 connu sous le nom de BCL-XL), EGR1 (Early growth response 1), des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) et GADD45A (growth arrest-
 10 and DNA damage-inducible gene gadd45, alpha), de IL6 (Interleukine 6) marqueur de l'inflammation et de l'enzyme de "détoxification" HMOX1 (Heme oxygenase decycling 1).

15 Ces inductions à 6 heures sont également observées après 24 heures d'exposition avec les composés. Pour plus de clarté dans les résultats, nous avons considéré uniquement les signatures moléculaires induites à 24 heures.

Les résultats présentés dans les tableaux sont représentatifs des régulations transcriptionnelles observées après 24 heures d'exposition avec les composés.

A la dose de 15 μ M, trente gènes sont dérégulés d'un facteur > 2 par au moins un composé. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 5 ci-après.

5

Tableau 5 : Gènes dérégulés d'un facteur >2 par au moins un composé.

	méquitazine	l-méquitazine	d-méquitazine	loratadine
AHR	1,30	1,96	2,80	1,40
BCL2	0,89	1,71	2,42	1,28
BCL2L1	4,11	4,11	5,02	1,68
BCL2L2	1,17	1,77	2,26	1,4
BID	1,65	1,67	2,50	0,93
BIRC3	3,80	4,39	5,53	1,55
CASP8	2,14	2,37	2,52	1,62
EGR1	2,78	3,04	3,31	2,44
HMOX1	1,23	1,52	2,38	0,97
TNFRSF6	1,24	1,91	2,82	1,69
DDIT3	3,50	4,00	7,70	1,25
GADD45A	2,30	3,70	5,50	1,06
MGMT	3,59	3,79	4,60	1,55
HSPCA	0,35	0,50	0,50	0,67
IL6	3,31	4,20	3,32	1,35
CDK2	0,27	0,58	0,53	0,84
PCNA	0,25	0,36	0,49	0,64
TOP2A	0,15	0,22	0,25	0,73
EDN1	0,29	0,54	0,30	0,78
ITGA7	0,47	0,85	0,53	1,06
PLAUR	0,44	0,66	0,42	0,74
SERPINE1	0,25	0,27	0,21	0,71
TIMP1	0,06	0,07	0,06	0,6
ADRB2	4,54	4,36	3,95	1,71
AGTRAP	2,43	2,57	3,93	1,89
CAT	3,45	5,27	10,16	2,06
KCNH2	2,99	3,96	4,73	3,61

LPA	0,28	0,52	0,42	0,77
SLC8A1	0,43	0,82	0,72	1,37
TNNI3	0,19	0,54	0,76	1,56

Les valeurs d'expression sont données par rapport à une expression = 1 dans les cellules H9c2 traitées avec le véhicule (DMSO)

On trouve des gènes directement ou indirectement liés au phénomène d'apoptose (BCL2, CASP8, GADD45A..), des gènes impliqués dans la prolifération (CDK2, PCNA...), l'invasion (PLAUR, TIMP1...), l'inflammation (IL6..) ou des protéines de choc thermique (HSPCA,..).

On note également l'impact sur des gènes sélectionnés pour rendre compte d'une potentielle ischémie myocardique (TNNI3....).

Les gènes directement liés au phénomène d'apoptose sont : AHR, BCL2, BCL2C1, BCL2L2, BID, BIRC3, CASP8, DDIT3, EGR1, GADD45A, HMOX1, MGMT, NFKB1, TNFRSF6. Les gènes pouvant rendre compte d'une potentielle ischémie myocardique et sûrement modèle-dépendant sont repris dans le tableau 8. L'expression des gènes sur-exprimés varie d'un facteur 2,06 (CAT par la loratadine) à un facteur 10,16 (CAT par la d-méquitazine) par rapport aux cellules non-traitées.

La répression varie, elle, d'un facteur 2 (PCNA par la d-méquitazine) à une perte presque totale d'expression (TIMP1 par la Méquitazine racémique).

En considérant une différence d'un facteur > 2 par rapport à la situation "non-traitée", à la dose de 15 µM, la l-méquitazine induit la dérégulation de 16 gènes, la d-méquitazine celle de 25 gènes, la Méquitazine racémique 24 gènes et la loratadine celle de 6 gènes (Tableau 5).

Si l'index de toxicité est établi en fonction du nombre de gènes dérégulés, on peut proposer le classement suivant du plus toxique au moins toxique : d-méquitazine > méquitazine > l-méquitazine >> loratadine.

Ces index de toxicité sont représentés dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6: Index de toxicité des composés à la dose de 15 µM.

Composé	Index de Toxicité
méquitazine	24

l-méquitazine	16
d-méquitazine	25
loratadine	6

* L'index de toxicité représente le nombre de gènes dérégulé d'un facteur

>2 par le composé par rapport au contrôle (cellules traitées par le véhicule, DMSO 0,15%)

En considérant en détail les variations d'expression induites par la Méquitazine, on peut noter que bon nombre des gènes impliqués dans l'apoptose sont dérégulés sous l'action des composés et ceci avec une dérégulation maximale pour l'énantiomère dextrogyre. En particulier, tous les gènes sélectionnés sont surexprimés sous l'action de la d-méquitazine et certains ne le sont que sous l'action de ce composé, par exemple :

BID (Wang & al, Genes Dev., 10 : 2859-2869, 1996), inducteur d'apoptose au niveau mitochondrial dans la chaîne signalitique induite par FAS (TNFRSF6), ce dernier étant lui-même surexprimé sous l'action de l'énantiomère dextrogyre,

BCL2 (Hockenbery & al, Nature, 348 : 334-336, 1997) et BCL2L2 (Gibson & al, Oncogene, 13 : 665-675, 1996) qui sont des promoteurs de survie lorsque les cellules sont soumises à des conditions de cytotoxicité,

AHR (Puga & al, Biochem. Pharmacol. 199-207, 2005) bien connu en toxicologie pour son rôle dans la réponse à une toxicité via la régulation de CYP1A1,

HMOX1 (Yoshida & al, Europ. J. Biochem. 171 : 457-461, 1998) codant pour une Heat Shock Protein (HSP 32) dont l'augmentation est directement corrélée à un stress oxydatif.

20

Il est à noter que l'on observe également une sous-expression de gènes impliqués dans la prolifération tels que CDK2, PCNA, TOP2A, et AGTRAP. Une telle diminution est en accord avec l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire afin de réparer les dommages causés à l'ADN, dont les marqueurs principaux DDIT3 et GADD45A sont particulièrement affectés dans le sens de la surexpression.

25

L'induction d'expression accrue engendrée par la d-méquitazine en ce qui concerne des gènes apoptotiques ou marqueurs de stress oxydatif indique clairement que l'énantiomère dextrogyre est plus toxique que l'énantiomère lévogyre.

30

Ces observations indiquent clairement qu'à la concentration de 15 mM les cellules H9c2 sont soumises à des conditions cytotoxiques. Nous observons une augmentation des gènes bloquant le cycle cellulaire (DDIT3 et GADD45A) ainsi que des gènes impliqués dans la machinerie de mort cellulaire programmée (famille BCL2, Caspases, TNF) et par voie de conséquence une répression des gènes impliqués dans la prolifération (CDK2, PCNA, TOP2A); ex. GADD45A interagit avec PCNA pour arrêter la prolifération cellulaire (Smith et al., 1994).

Le fait que les variations d'expression de ces gènes soient moins marquées lorsque les cellules H9c2 sont traitées avec l'énantiomère l-méquitazine, indique que ce composé induit un stress moins important aux cellules et de ce fait est moins toxique que la Méquitazine racémique et l'énantiomère d-méquitazine.

L'expression de KCNH2 (HERG) est induite par la Méquitazine racémique et ses énantiomères. KCNH2 est associé à une augmentation du QT (LQT2 syndrome) et aux torsades de pointes.

4.2 Comparaison de l'impact de l'énantiomère l-méquitazine versus l'énantiomère d-méquitazine sur l'expression de gènes marqueurs de toxicité.

20

Dans un souhait de discriminer l'action des deux énantiomères au niveau génomique, les résultats ont été également analysés indépendamment du contrôle négatif (cellules H9c2 non-traitées).

Pour ce faire nous avons considéré l'impact de la Méquitazine racémique et de ses deux énantiomères sur l'expression des gènes sélectionnés comme marqueurs classiques de toxicité en faisant abstraction du type cellulaire. Nous avons retenu les gènes de l'apoptose/nécrose (gènes de la famille BCL2, des Caspases, du Tumor Necrosis Factor.....), les marqueurs de stress en réponse à un dommage engendré dans l'ADN des cellules (DDIT3, CHEK2, GADD45A...) ou dû à un stress oxydatif (CAT, PDRX2, SOD2...), des enzymes de détoxification (HMOX1, MGMT, PTGS2....), les protéines de choc thermique (HSPCA, HSPB1....) ou encore les marqueurs de l'inflammation (IL6, MIF1....).

Les résultats sont figurés dans le Tableau 7 où sont représentées les valeurs d'expression des gènes sélectionnés et ceci par rapport à une valeur d'expression de 1 pour les cellules traitées avec le mélange racémique. En outre, est aussi exprimé le rapport d'expression énantiomère dextrogyre / énantiomère lévogyre, ceci mettant en évidence l'impact prépondérant de l'énantiomère dextrogyre sur l'expression de ces gènes lorsque ce rapport est supérieur à 1.

Il ressort que les variations d'expression induites par l'énantiomère dextrogyre sont majoritaires pour près de trois quart (74%) des gènes retenus.

10

Tableau 7: Expression relative des principaux marqueurs de toxicité

	d-méquitazine	l-méquitazine	Rapport *
ADPRT	2,30	1,55	1,48
AHR	2,27	1,54	1,47
AKT1	1,03	1,15	0,89
ANXA5	1,39	0,94	1,48
APAF1	1,31	1,17	1,12
BAX	1,34	1,22	1,09
BCL2	2,53	1,90	1,34
BCL2L1	1,15	1,00	1,15
BCL2L2	1,81	1,50	1,21
BID	1,43	1,01	1,42
BIRC3	1,38	1,16	1,19
CASP1	1,36	1,07	1,27
CASP3	0,82	0,92	0,89
CASP8	1,21	1,10	1,10
CASP9	0,89	0,90	0,98
CYCS	1,58	1,25	1,26
EGR1	1,22	1,08	1,13
NFKB1	0,91	1,13	0,80
TNFSF5	1,20	1,43	0,84
TNFRSF1A	0,77	1,17	0,66
TNFRSF1B	0,93	0,77	1,21
TNFRSF6	1,80	1,31	1,37

CHEK2	1,58	1,14	1,38
DDIT3	2,17	1,12	1,94
GADD45A	2,41	1,61	1,50
HSPA1A	1,24	1,32	0,94
MLH1	1,04	1,31	0,79
TP53	0,80	0,80	1,00
CCL2	0,91	0,93	0,98
HIF1A	1,45	0,95	1,54
IL6	1,06	1,27	0,84
MIF1	1,33	0,94	1,41
CAT	2,94	1,53	1,92
COMT	1,28	1,24	1,03
FMO4	0,95	0,62	1,53
HMOX1	2,11	1,30	1,63
MGMT	1,42	1,13	1,26
PDRX1	1,91	1,44	1,32
PDRX2	1,01	0,96	1,05
SOD2	2,09	1,35	1,55

Les valeurs d'expression sont données par rapport à une expression = 1

dans les cellules H9c2 traitées avec la Méquitazine racémique..

* Le rapport représente le rapport d'expression d-méquitazine versus l-méquitazine

- 5 Le fait que les variations d'expression de ces gènes soient moins marquées lorsque les cellules sont traitées avec l'énantiomère lévogyre indique que ce composé induit un stress moins important à ces cellules et de ce fait présente une toxicité moindre tant par rapport au racémate que par rapport à l'énantiomère dextrogyre.

10 **4.3 Comparaison de l'impact de l'énantiomère lévogyre versus l'énantiomère dextrogyre sur l'expression de gènes biomarqueurs d'une ischémie myocardique.**

- 15 Dans l'optique de mettre en évidence un effet différentiel spécifique des énantiomères en ce qui concerne une toxicité cardiovasculaire, 6 gènes ont été sélectionnés comme bio-marqueurs d'une ischémie myocardique.

En particulier, parmi les gènes retenus, on peut citer :

KCNH2 est un gène associé au syndrome du QT long congénital (De Bruin & al. Pharmacoevidemiol. Drug Saf. 2005),

EDG2 récepteur de l'acide lysophosphatidique est considéré comme marqueur de l'infarctus du myocarde (Pastinen & al. Human Molec. Genet. 7 : 1453-1462, 1998),

ADRB2 dont les antagonistes (beta-bloquants) constituent une classe de médicaments utilisés en cardioprotection (Baker, Br. J. Pharmacol. 317-322, 2005),

TNNI3, gène de le Troponine I cardiaque, en tant que marqueur du risque de développement de maladies cardiaques (Mogensen & al, J. Am. Coll. Cardiol., 44, 12. 2315-2325, 2004).

Selon un modèle identique à l'exemple précédent, on a aussi évalué la variation d'expression de ces gènes en fonction de leur exposition à l'un ou à l'autre des énantiomères. Le Tableau 8 met en évidence la dérégulation des gènes sélectionnés par les composés. Le rapport d'expression dextrogyre/lévogyre est aussi reporté.

Tableau 8 : Gènes biomarqueurs d'une ischémie myocardique et dérégulés d'un facteur >2 par au moins un composé

	Méquitazine	l-méquitazine	d-Méquitazine	Loratadine	Rapport*
ADRB2 beta 2 adrenergic receptor	4,54	4,36	3,95	1,71	0,91
AGTRAP angiotensin II RC-associated protein	2,43	2,57	3,93	1,89	1,53
KCNH2 potassium channel voltage gated (herg)	2,99	3,96	4,73	3,61	1,19
EDG2 endothelial differentiation gene 2	0,28	0,52	0,42	0,77	0,81
SLC8A1 ncx1 exchanger	0,43	0,82	0,72	1,37	0,88
TNNI3 troponin	0,19	0,54	0,76	1,56	1,41

* Le rapport représente le rapport d'expression de la d-méquitazine versus la l-méquitazine

On constate que l'énantiomère dextrogyre affecte à la hausse l'expression d'un nombre majoritaire de gènes et ceci dans une ampleur non négligeable. Ceci témoigne donc d'un

toxicité cardiaque plus marquée pour l'énantiomère dextrogyre par rapport au lévogyre et ceci d'autant plus que les patients susceptibles de recevoir un traitement à base de Méquitazine présentent un déterminisme génétique ou physiologique représentatif d'une sensibilité cardiaque. Il ressort que l'utilisation d'un mélange enrichi en énantiomère

5 lévogyre de la méquitazine pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les affections de nature allergique chez des populations de patients à risque, en particulier des patients présentant ou susceptibles de présenter une cardiopathie, des troubles électrolytiques, une bradycardie ou du syndrome du QT long congénital présente un intérêt capital.

10

EXEMPLE 2 : EVALUATION DE LA TOXICITE AIGUË CHEZ LE RAT –
DETERMINATION DE LA DL50

La toxicité aiguë a été évaluée chez des rats mâles et femelles par administration orale

15 de dose croissante de méquitazine (racémique, énantiomère d ou énantiomère l) afin de déterminer la dose létale pour 50% de la population évaluée.

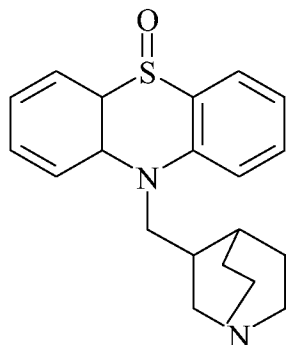
	Mâles	Femelles
Racémique	920 mg/kg	670 mg/kg
d-méquitazine	780 mg/kg	420 mg/kg
l-méquitazine	1210 mg/kg	1210 mg/kg

Il ressort de ce test que la l-méquitazine présente une toxicité aiguë bien plus faible que

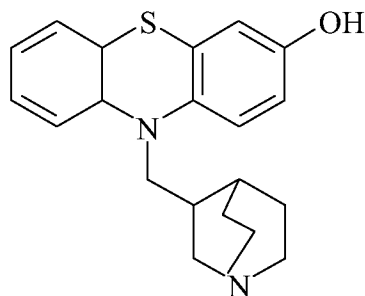
20 la d-méquitazine et que le mélange racémique.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un mélange d'énantiomères du 10-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-méthyl)-10H-phénothiazine (Méquitazine) et/ou d'au moins un de ses métabolites,
5 ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, ledit mélange étant enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S), pour la préparation d'un médicament antihistaminique destiné à prévenir ou traiter des affections allergiques, tout en limitant les risques de toxicité cellulaire, notamment la toxicité tissulaire et/ou organique.
10
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit mélange enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S) permet de prévenir ou traiter des affections allergiques, tout en limitant les risques de cardiotoxicité.
- 15 3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit mélange enrichi en l'énantiomère de configuration absolue (S) permet de prévenir ou traiter des affections allergiques, tout en limitant les risques d'ischémie myocardique, de prolongation de l'intervalle QT ou QTc, d'arythmie cardiaque, notamment les torsades de pointes, de cardiomyopathie, d'hypertrophie cardiaque ou d'infarctus du
20 myocarde, de trouble diastolique ou de dysfonction systolique.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les métabolites de la Méquitazine sont choisis parmi la forme hydroxylée ou la forme S-oxydée suivante :



Forme S-oxydée



Forme hydroxylée

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le sel de la Méquitazine est le chlorhydrate de méquitazine.

5

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le ratio massique entre l'énantiomère (S) et l'énantiomère (R) dans le dit mélange est supérieur à 95 : 5 ((S) : (R)), de préférence supérieur à 99:1, de manière encore plus préférée supérieur à 99,5:0,5.

10

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dit mélange d'énantiomères est substantiellement pur en l'énantiomère (S).

15

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les affections allergiques sont choisies parmi la rhinite allergique, la rhinite vasomotrice, la rhinite spasmodique, la conjonctivite allergique, l'œdème de Quincke, l'urticaire, les allergies médicamenteuses, les affections dermatologiques prurigineuses.

20

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, chez des patients choisis parmi des patients présentant une cardiopathie, des troubles électrolytiques, une bradicardie ou atteints du syndrome du QT long congénital.

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/050828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/5415 A61P37/08 A61P27/14 A61P17/00 A61P17/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 772 029 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 11 June 1999 (1999-06-11) page 1, lines 5-16 page 3, line 31	1-3,5-7, 9
X	EP 0 089 860 A (PHARMUKA LABORATOIRES) 28 September 1983 (1983-09-28) cited in the application page 1, lines 4-35 page 3, lines 1-10 page 6, lines 15-25	1-3,6,7, 9
	----- -/-- -----	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2007

Date of mailing of the international search report

05/04/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

HOUYVET, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/050828

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; November 1981 (1981-11), HOJO M ET AL: "[Pharmacological study of Mequitazine (LM-209). (V). Pharmacological actions of a main metabolite of LM-209, mequitazine sulfoxide (LM-209 SO) (author's transl)]" XP002401845 Database accession no. NLM6120129 abstract & NIPPON YAKURIGAKU ZASSHI. FOLIA PHARMACOLOGICA JAPONICA. NOV 1981, vol. 78, no. 5, November 1981 (1981-11), pages 431-438, ISSN: 0015-5691 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/050828

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2772029	A	11-06-1999	AT 215948 T	15-04-2002
			DE 69804853 D1	16-05-2002
			DE 69804853 T2	14-11-2002
			EP 1037891 A1	27-09-2000
			ES 2175823 T3	16-11-2002
			WO 9929692 A1	17-06-1999
EP 0089860	A	28-09-1983	AU 1213283 A	08-09-1983
			DK 57883 A	06-09-1983
			ES 8403896 A1	01-07-1984
			FI 830739 A	06-09-1983
			FR 2522660 A1	09-09-1983
			GR 78102 A1	26-09-1984
			JP 58162588 A	27-09-1983
			MA 19731 A1	25-02-1983
			NO 830745 A	06-09-1983
			PT 76348 A	01-04-1983
			ZA 8301441 A	30-11-1983

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2007/050828

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A61K31/5415 A61P37/08 A61P27/14 A61P17/00 A61P17/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 772 029 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 11 juin 1999 (1999-06-11) page 1, ligne 5-16 page 3, ligne 31	1-3,5-7, 9
X	EP 0 089 860 A (PHARMUKA LABORATOIRES) 28 septembre 1983 (1983-09-28) cité dans la demande page 1, ligne 4-35 page 3, ligne 1-10 page 6, ligne 15-25	1-3,6,7, 9



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 mars 2007

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2007

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5318 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

HOUYVET, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2007/050828

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; novembre 1981 (1981-11), HOJO M ET AL: "[Pharmacological study of Mequitazine (LM-209). (V). Pharmacological actions of a main metabolite of LM-209, mequitazine sulfoxide (LM-209 SO) (author's transl)]" XP002401845 Database accession no. NLM6120129 abrégé & NIPPON YAKURIGAKU ZASSHI. FOLIA PHARMACOLOGICA JAPONICA. NOV 1981, vol. 78, no. 5, novembre 1981 (1981-11), pages 431-438, ISSN: 0015-5691 -----	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2007/050828

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2772029	A	11-06-1999	AT 215948 T	15-04-2002
			DE 69804853 D1	16-05-2002
			DE 69804853 T2	14-11-2002
			EP 1037891 A1	27-09-2000
			ES 2175823 T3	16-11-2002
			WO 9929692 A1	17-06-1999
EP 0089860	A	28-09-1983	AU 1213283 A	08-09-1983
			DK 57883 A	06-09-1983
			ES 8403896 A1	01-07-1984
			FI 830739 A	06-09-1983
			FR 2522660 A1	09-09-1983
			GR 78102 A1	26-09-1984
			JP 58162588 A	27-09-1983
			MA 19731 A1	25-02-1983
			NO 830745 A	06-09-1983
			PT 76348 A	01-04-1983
			ZA 8301441 A	30-11-1983