

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR
PHILIPPE-AUBERT CÔTÉ
B. Sc. (BIOLOGIE)

CYTOTOXICITÉ DE L'ISOCARYOPHYLLÈNE SUR LES CELLULES
L-929 : CARACTÉRISATION DU MÉCANISME D'ACTION

AOÛT 2006



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

À mes parents, André et Marie-Madeleine, pour leur amour, leur encouragement dans mes (nombreux) projets et pour m'avoir mis des livres entre les mains. Et à Mamie, pour le reste.

RÉSUMÉ

L'isocaryophyllène, un sesquiterpène d'origine végétale, s'est révélé toxique contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses tout en étant significativement moins toxique envers les cellules saines. Cette molécule pourrait, par conséquent, être éventuellement intégrée à un traitement anticancéreux. Toutefois, son mécanisme d'action est inconnu.

Le projet rapporté dans le présent mémoire a pour but de caractériser le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène. Pour atteindre cet objectif, les effets de l'isocaryophyllène sur une lignée de cellules tumorigènes, les cellules L-929 (fibrosarcomes murins), ont été étudiés. L'administration d'isocaryophyllène à ces cellules s'est accompagnée d'une génération d'espèces oxygénées réactives (ROS). Une peroxydation des lipides membranaires et une perméabilisation de la membrane plasmique ont aussi été observées. La protection des membranes plasmiques avec un antioxydant liposoluble, l' α -tocophérol, a diminué la cytotoxicité de l'isocaryophyllène. À l'inverse, la protection avec un antioxydant hydrosoluble, le trolox, s'est révélé sans effet. Aucune implication du glutathion (GSH) et de la chaîne de transport des électrons n'a été observée dans le processus. Toutefois, certains indices permettraient d'envisager la possibilité que l'isocaryophyllène est oxydé par l'anion superoxyde pour former un époxyde. Cet époxyde pourrait avoir un rôle dans la toxicité de la molécule.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Jean Legault, pour m'avoir proposé ce projet de maîtrise et m'avoir donné l'occasion de le réaliser au sein de son équipe de recherche. Merci aussi au Dr André Pichette, autant pour ses conseils avisés que pour son *soutien* lors des péripéties qui ont troublé le déroulement de ma maîtrise. Merci aussi à Angélique Longtin, Maxime Lebrun et Serge Lavoie pour leur aide. Je remercie aussi mes collègues immédiats pour leur compagnie à fois agréable et fructueuse, notamment Jérôme Bérubé-Gagnon, Dominic Dufour, Audrey Gagnon et Karl Girard-Lalancette. Je dois aussi une fière chandelle à Isabelle Besson pour sa précieuse assistance. Merci également au personnel et aux autres étudiants du laboratoire LASEVE, pour leur aide dans la réalisation des expériences rapportées ici.

Il existe encore de véritables savants, auprès de qui on apprend ce que les livres ne disent pas. Je tiens à remercier certaines d'entre eux, autant pour leur discussion brillante que leurs précieux conseils, soit le Dr Raynald Côté, le Dr André Francoeur, le Dr François-Xavier Garneau, Mme France-Ida Jean et M. Robert Loïselle. Merci aussi à Mme Suzanne Fillion et Mme Linda Grenon pour leur aide précieuse.

Enfin, je tiens à remercier Léonard de Vinci (1452-1519) et Herbert Georges Wells (1866-1946), pour m'avoir fait comprendre autrefois qu'un individu doué pour les arts et les lettres l'est également pour les sciences.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Introduction générale	2
1.2 Le cancer : définition et incidence	5
1.3 L'ADN : l'une des principales cibles de la chimiothérapie conventionnelle.....	8
1.4 Limites de la chimiothérapie conventionnelle	9
1.5 De nouvelles cibles pour la chimiothérapie	11
1.5.1 L'angiogenèse.....	12
1.5.2 Les protéines impliquées dans le cycle cellulaire.....	13
1.5.2.1 Protéines stimulant la prolifération cellulaire	14
1.5.2.2 Protéines inhibant la prolifération cellulaire.....	15
1.5.3 La télomérase.....	17
1.5.4 Les espèces oxygénées réactives (ROS).....	18
1.5.4.1 Nature des ROS.....	19
1.5.4.2 Génération endogène des ROS	20
1.5.4.3 Dommages provoqués par les ROS	22

1.5.4.4 Mécanismes cellulaires de défense contre les ROS	25
1.5.4.5 ROS et cancer	26
1.6 Importance de caractériser le mécanisme d'action	28
1.7 Résumé des travaux antérieurs.....	30
1.7.1 Activité antitumorale de l'huile de sapin baumier et de ses constituants	30
1.7.2 Effets de l' α -humulène sur le GSH intracellulaire des cellules L-929	32
1.7.3 Effet de l' α -humulène sur la génération de ROS chez les cellules L-929	35
1.7.4 Effet de l'inhibition de la chaîne de transport des électrons sur la production de ROS induite par l' α -humulène	37
1.7.5 Conclusions de l'étude et perspectives pour l'isocaryophyllène	39
CHAPITRE 2 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	40
CHAPITRE 3 ARTICLE	42
3.1 Résumé	44
3.2 Introduction	44
3.3 Matériel et méthodes	46
3.3.1 Produits chimiques	46
3.3.2 Culture cellulaire	46
3.3.3 Évaluation de la cytotoxicité	47
3.3.4 Quantification des espèces oxygénées réactives (ROS)	47
3.3.5 Évaluation de la peroxydation lipidique	48

3.3.6 Évaluation de la perméabilité membranaire	49
3.3.7 Quantification du contenu intracellulaire en glutathion	50
3.3.8 Quantification de la croissance cellulaire.....	51
3.3.9 Analyse statistique.....	51
3.4 Résultats	52
3.4.1 Quantification des espèces oxygénées réactives (ROS)	52
3.4.2 Évaluation de la peroxydation lipidique	53
3.4.3 Évaluation de l'altération membranaire.....	54
3.4.4 Évaluation de l'effet protecteur des antioxydants.....	55
3.4.5 Effet de l'isocaryophyllène sur le GSH	57
3.4.6 Effet de l'inhibition de la chaîne de transport des électrons.....	59
3.5 Discussion	60
3.6 Références	62
CHAPITRE 4 CONCLUSIONS GÉNÉRALES	74
BIBLIOGRAPHIE.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

CAT : catalase

DCFH-DA : dichlorofluorescéine diacétate

DEM : diéthyl maléate ester

GDP : guanine-diphosphate

GSH : glutathion

GST : glutathion-S-transférase

GTP : guanine-triphosphate

MCB : monochlorobimane

PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate

ROS : espèces oxygénées réactives

SOD : superoxyde dismutase

tBH : tert-butyl hydroperoxyde

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Estimation des nouveaux cas et décès pour dix types de cancers au Canada, selon le sexe, pour l'année 2006	6
Tableau 2. Effet de l'huile de sapin baumier sur l'inhibition de la croissance de plusieurs lignées cellulaires (tiré de Legault <i>et al.</i> , 2003).....	31
Tableau 3. Effet de l' α -humulène, du β -caryophyllène, du β -caryophyllène oxydé et de l'isocaryophyllène sur l'inhibition de la croissance de plusieurs lignées cellulaires (tiré de Legault <i>et al.</i> , 2003)	32

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure moléculaire de l'isocaryophyllène et de l' α -humulène	6
Figure 2 : Effets de l'huile de sapin baumier et de l' α -humulène sur le contenu intracellulaire en GSH des cellules L-929 après 1 heure ou 4 heures	34
Figure 3 : Production de ROS induite par l'huile de sapin baumier et l' α -humulène chez les cellules L-929 après 1 heure ou 4 heures	36
Figure 4 : Effets des antioxydants ou d'un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transport mitochondriale sur la production de ROS induite par l' α -humulène chez les cellules L-929	38

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

L'industrie pharmaceutique redécouvre de plus en plus l'intérêt des produits naturels. Il est bien établi que, depuis ses origines, l'être humain a employé les substances issues de plantes à des fins médicinales. À cause des croyances superstitieuses qui motivaient leur emploi, ces plantes ont longtemps été écartées par la médecine [Balunas et Kinghorn, 2005; Lee, 2004; Raven *et al.*, 2000]. Ce n'est qu'au 19^e siècle que les chimistes ont commencé à isoler les principes actifs contenus dans les végétaux pour en faire des médicaments, par exemple avec la quinine, la codéine et la morphine [Phillipson, 2001]. Au cours des vingt dernières années, environ 50% des médicaments introduits sur le marché étaient d'origine biologique. Aussi, plus de 50% des agents anticancéreux autorisés par la *Food and Drug Administration* depuis 1960 proviennent de sources naturelles, essentiellement de plantes. Certains rapportent qu'entre seulement 5% et 10% des 250 000 espèces de plantes que compte la planète ont été ainsi exploitées [Modzelewska *et al.*, 2005]. Parmi les molécules isolées dans les fluides de nombreux végétaux, certains monoterpènes et sesquiterpènes se sont révélés dotés de propriétés antimicrobiennes, insecticides et anticancéreuses. Par exemple, l' α -bisabolol a montré une certaine toxicité envers des gliomes cancéreux humains et murins [Cavalieri *et al.*, 2004]. Les vernolides, une classe de sesquiterpènes monocycliques a aussi montré une toxicité envers plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines [Kuo *et al.*, 2003]. Enfin, même observation pour l' α -humulène, un sesquiterpène issu des aiguilles du sapin baumier (*Abies balsamea*) [Legault *et al.*, 2003]. La figure 1 montre la structure de l' α -humulène.

Au cours des recherches sur l' α -humulène, d'autres molécules apparentées ont aussi été testées sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses. L'une d'elles, l'isocaryophyllène, dont on peut voir la structure à la figure 1, s'est montrée toxique envers toutes les lignées testées [Legault *et al.*, 2003]. De plus, les cellules saines semblent moins sensibles à l'isocaryophyllène que l' α -humulène. On mentionne aussi que l'isocaryophyllène possède une activité antimicrobienne [Ricci *et al.*, 2005]. On la retrouve d'ailleurs à une concentration tournant autour de 20% dans des huiles essentielles ayant montré une activité antimicrobienne, comme l'huile du *Teucrium marum* (Lamiaceae), du *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae) et de l'*Aristolochia elegans* [Ricci *et al.*, 2005, Hernandez *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 1997]. Considérant que l' α -humulène s'est révélée anticancéreuse et que l'isocaryophyllène, une molécule dont la structure est très proche, a montré une activité plus grande contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses, cette dernière molécule pourrait constituer un candidat intéressant pour la mise au point d'un nouveau traitement contre le cancer. Cependant, son mécanisme d'action est inconnu. Il est important de l'élucider afin de progresser au niveau de son développement pré-clinique. L'objectif principal de ce travail de recherche consistera donc à caractériser le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène.

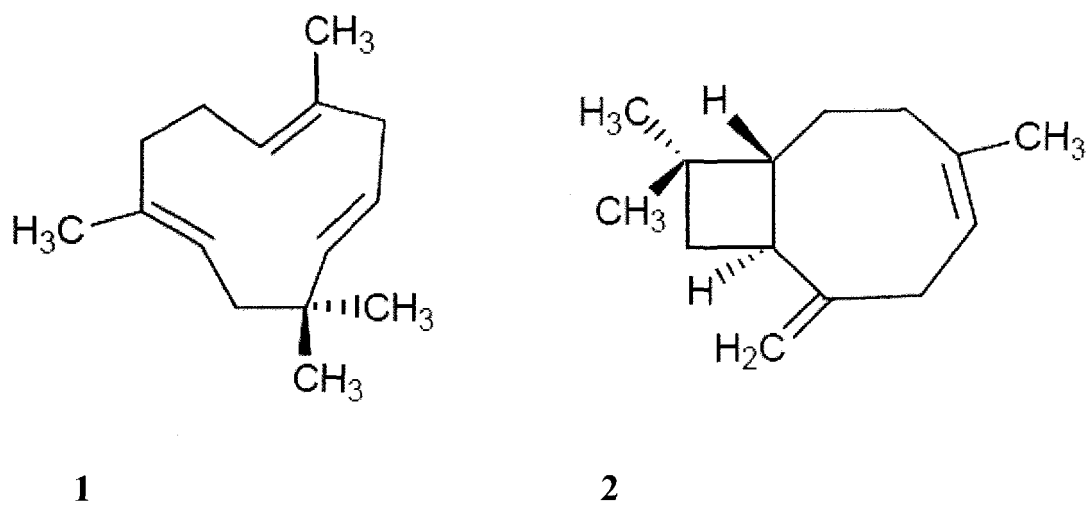


Figure 1. Structure moléculaire de l'α-humulene (1) et de l'isocaryophyllène (2)

[Legault *et al.*, 2003]

Ce mémoire sera divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre, en plus de la présente introduction générale, présentera une revue de littérature exposant l'intérêt de développer de nouveaux agents pour la chimiothérapie. Cette revue aura aussi pour but de faire prendre conscience de l'importance de caractériser le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène plutôt que de se limiter au simple constat de sa toxicité envers les cellules cancéreuses. Enfin, cette introduction permettra de résumer les travaux antérieurs sur l' α -humulène et l'isocaryophyllène, réalisés par le groupe au sein duquel les expériences rapportées ici ont eu lieu, et qui constituent le point de départ du présent projet. Le second chapitre mettra en évidence les objectifs généraux et spécifiques du projet de recherche. Le troisième chapitre présentera l'article dans lequel les résultats du projet de recherche seront rapportés. Enfin, une conclusion résumera les principales observations faites sur le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène. Les perspectives offertes par cette molécule, à la fois dans la lutte contre le cancer et dans l'exploitation de nos ressources végétales, seront abordées en dernier lieu.

1.2 Le cancer : définition et incidence

Le terme « cancer » désigne un large éventail de maladies caractérisées par une prolifération cellulaire incontrôlée. Causées par de nombreux facteurs, ces maladies peuvent survenir dans de nombreux endroits de l'organisme et impliquer plusieurs types de cellules ou de tissus. La cellule cancéreuse se divise sans fin, engendrant des masses qui envahissent progressivement le territoire des autres organes. Cette invasion provoque

de nombreux dommages et conduit fréquemment à la mort de l'individu [Cattley et Radinsky, 2004; Karp, 2004].

La Société canadienne du cancer est l'auteur de plusieurs monographies concernant l'incidence et la mortalité associées aux types de cancer courants. Ces documents effectuent également quelques prévisions sur l'apparition de nouveaux cas pour l'année à venir [Société canadienne du cancer, 2006]. Les prévisions du rapport de l'année 2006, pour dix types de cancer, sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Estimation des nouveaux cas et décès pour dix types de cancers au Canada, selon le sexe, pour l'année 2006

Type de cancer	Hommes		Femmes		Total	
	Nouveaux cas	Décès	Nouveaux cas	Décès	Nouveaux cas	Décès
Estomac	1 750	1 100	990	720	2 800	1 850
Colorectal	10 800	8 500	9 100	3 900	20 000	8 500
Pancréas	1 700	1 650	1 800	1 750	3 500	3 400
Poumon	12 000	10 700	10 600	8 600	22 700	19 300
Sein	160	45	22 200	5 300	22 300	5 300
Prostate	20 700	4 200	----	----	20 700	4 200
Vessie	4 700	1 200	1 650	500	6 400	1 700
Rein	2 900	970	1 700	590	4 600	1 550
Encéphale	1 400	950	1 100	720	2 500	1 650
Leucémie	2 400	1 300	1 700	930	4 100	2 200
Tous les cancers	78 400	37 000	74 700	33 400	153 100	70 400

Selon ces estimations, environ 153 100 nouveaux cas de cancer surviendront en 2006. Parallèlement, on prévoit, pour la même année, 70 400 décès liés à cette maladie. La même étude remarque que, chez l'homme, la majorité des nouveaux cas de cancer est associée principalement à trois types de cancer, soit le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer colorectal. Chez la femme, il s'agit surtout du cancer du sein, du cancer du poumon et du cancer colorectal. Sexe confondu, le cancer du poumon constitue la cause de décès par cancer la plus fréquente. Enfin, concernant la probabilité d'être atteint du cancer, il semblerait qu'actuellement un canadien sur trois sera atteint du cancer et que un sur quatre en mourra [Société canadienne du cancer, 2006].

Ces quelques chiffres montrent que le cancer est une maladie courante dont la gravité est très variable. Mais elle reste tout de même mortelle, répandue et, par conséquent, à combattre. Trois approches sont normalement exploitées pour le soigner : l'opération chirurgicale (retrait des tumeurs), la radiothérapie et la chimiothérapie. La dernière approche est la plus employée, principalement lorsqu'il y a des métastases et, parfois, en prévention après une chirurgie [Novotny et Szekeres, 2003]. Malheureusement, en dépit du fait que la chimiothérapie nous a permis de sauver des milliers de vie et reste l'une des meilleures façons de traiter le cancer, le manque de sélectivité des produits employés provoque de nombreux effets secondaires : vomissements, perte de cheveux, mort des cellules de la moelle osseuse, altération de la division cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal, etc. Ces effets secondaires peuvent entraîner des infections, ainsi qu'une diminution de la qualité de vie du patient. Dans le pire des cas, il nécessite l'arrêt du traitement. Or, l'arrêt du traitement implique

souvent le retour de la maladie [Nam et Parang, 2003; Novotny et Szekeres, 2003; Tubiana, 2003].

1.3 L'ADN : l'une des principales cibles de la chimiothérapie conventionnelle

Pour devenir cancéreuse, une cellule doit accumuler certaines altérations précises de sa physiologie, notamment [Hanahan et Weinberg, 2000]:

- 1) Indépendance envers les signaux chimiques stimulant la prolifération cellulaire;
- 2) Insensibilité aux signaux inhibant cette prolifération;
- 3) Inhibition des mécanismes de l'apoptose;
- 4) Capacité illimitée de réplication;
- 5) Capacité à stimuler l'angiogenèse (formation de vaisseaux sanguins);
- 6) Capacité à envahir les autres tissus pour y former des métastases.

Des mutations génétiques différentes peuvent engendrer ces mêmes caractéristiques. Ainsi, il n'est pas surprenant de trouver deux cancers impliquant le même tissu d'origine, mais causés par des mutations totalement différentes [Cattley et Radinsky, 2004].

Ces caractéristiques nous permettent de croire que nous pouvons attaquer les cellules cancéreuses sur plusieurs plans, mais ce n'est actuellement pas le cas. En effet,

les chimiothérapies conventionnelles ciblent généralement l'ADN des cellules cancéreuses, ainsi que la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication de cet ADN et à la division cellulaire [Marchini *et al.*, 2004]. Par exemple, la doxorubicine et la ciplastine endommagent l'ADN, alors que le paclitaxel et la vincristine affectent les microtubules, empêchant la division cellulaire [Blagosklonny, 2003]. Des drogues comme les anthracyclines, les anthraquinones et les camptothécines peuvent forcer les topoisomérases, des enzymes intervenant dans la réplication de l'ADN juste avant la mitose, à endommager le matériel génétique. Ces dommages conduisent inévitablement à la mort de la cellule [Cheng *et al.*, 2005; Palumbo, 2004; Novotny et Szekeres, 2003]. Actuellement, plusieurs dérivés de la camptothécine sont étudiés et tout porte à croire que la recherche prenant l'ADN des cellules cancéreuses comme cible vont continuer pour longtemps [Bailly *et al.*, 2004; Capranico, 2004].

1.4 Limites de la chimiothérapie conventionnelle

Pourquoi les agents chimiothérapeutiques conventionnels ont-ils des effets secondaires si désastreux ? Certains auteurs répondent à cette question en faisant remarquer que la plupart des agents chimiothérapeutiques ne sont pas des *anticancéreux* au pied de la lettre, mais des agents *antiprolifératifs*. Ce que ces agents ciblent, ce n'est pas les caractéristiques qui permettent de différencier la cellule cancéreuse de la cellule normale, mais plutôt les mécanismes qui permettent de différencier les cellules en prolifération de celles qui ne le sont pas. Ainsi, il n'est pas surprenant que les chimiothérapies endommagent les cellules de la moelle osseuse ou de la lumière de

l'intestin : ces cellules sont saines, certes, mais elles connaissent une prolifération intense [Cross, 2005; Marchini *et al.*, 2004].

Des raisons historiques expliquent, entre autres, ce fait. C'est un accident qui fit remarquer à un médecin militaire, le Dr Gilman, que l'exposition d'un sujet à des gaz asphyxiants provoquait une diminution des globules blancs. Comprenant que le gaz inhibait la prolifération des cellules sanguines, Gilman eut l'idée de tester d'autres produits voisins (notamment des gaz moutardes) pour le traitement des cancers des tissus hématopoïétiques (ex : leucémies). La recherche qui s'ensuivit permit d'identifier de nouvelles substances thérapeutiques, comme l'actinomycine D en 1952, le cyclophosphamide en 1958 et le taxol en 1990 [Tubiana, 2003]. Cependant, lors de la mise au point des premiers agents chimiothérapeutiques, on cherchait des substances toxiques pour les cellules cancéreuses sans se soucier de la cible cellulaire qui était attaquée. Aujourd'hui, les chercheurs tentent la démarche inverse, soit définir des cibles cellulaires propres aux cellules cancéreuses pour ensuite trouver une substance capable de s'y attaquer [Marchini *et al.*, 2004]. De ce survol historique, nous pouvons aussi retenir ceci : à l'origine, les agents chimiothérapeutiques étaient recherchés pour leur cytotoxicité, mais on s'intéressait peu à leur mécanisme d'action. Cette attitude est vivement critiquée aujourd'hui. En effet, on a constaté, depuis, que ces agents pouvaient agir sur d'autres processus physiologiques de l'organisme et créer des effets secondaires indésirables. Il apparaît maintenant logique et nécessaire d'établir le mécanisme d'action de toute nouvelle molécule qui se révèle un agent anticancéreux intéressant [Capranico, 2004]. C'est le cas pour l'isocaryophyllène.

1.5 De nouvelles cibles pour la chimiothérapie

Bien que le risque de mortalité lié au cancer justifie, aux yeux de certains qu'on emploie, faute de mieux, des agents possédant autant d'effets secondaires [Bailly *et al.*, 2004], la recherche actuelle vise d'abord à identifier les caractéristiques des cellules cancéreuses qui les distinguent vraiment des cellules normales, pour ensuite trouver des composés susceptibles de reconnaître ces caractéristiques [Blagosklonny, 2004; Cattley et Radinsky, 2004; Palumbo, 2004]. Vouloir mettre au point de tels composés est logique, mais difficile. Certes, il est possible avec la génomique d'identifier, dans un type de cancer donné, un gène altéré produisant une protéine altérée responsable du phénotype cancéreux. Toutefois, trouver un agent capable d'agir sur cette protéine pour empêcher l'apparition de ce phénotype est compliqué. D'une part, il faut s'assurer que la cible choisie puisse être atteinte par un agent quelconque. Ensuite, il faut s'assurer que la drogue élaborée n'interagisse pas avec les autres processus métaboliques de la cellule. Dans la pratique, ce processus peut prendre plusieurs années. Le Gleevec®, un agent inhibant la protéine mutée Bcr-Abl kinase, très caractéristique de la leucémie myéloïde chronique, est l'un des rares exemples de drogues dont la mise au point a suivi cette stratégie [Kunick, 2004; Marchini *et al.*, 2004]. Nous allons détailler ici quelques unes des nouvelles cibles qui intéressent les chercheurs.

1.5.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe au cours duquel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux préexistants. Si ce phénomène peut survenir dans des conditions normales (par exemple au cours de l'embryogenèse), il est aussi impliqué dans certaines pathologies, comme le glaucome et l'arthrite rhumatoïde [Nam et Parang, 2003]. Il est aujourd'hui bien établi que le développement d'une vascularisation est essentiel pour la croissance des tumeurs, ainsi que leur dispersion dans l'organisme pour former des métastases [La Porta, 2004].

Le processus de l'angiogenèse comprend de nombreuses étapes, notamment la dégradation de la lame basale d'un vaisseau sanguin proche, la migration des cellules endothéliales vers la tumeur, la multiplication de ces cellules endothéliales et la formation d'une lame basale pour consolider le nouveau vaisseau sanguin [Lodish *et al.*, 2000]. Le nombre élevé de molécules impliquées dans l'angiogenèse offre plusieurs cibles potentielles pour inhiber ce processus, et, par conséquent, le développement des tumeurs. Plusieurs substances naturelles possèdent ce pouvoir inhibiteur. Par exemple, nous avons l'endostatine, un peptide de 183 acides aminés issu du collagène XVIII, et la caplostatine, un co-polymère hydrosoluble du N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA). Ce dernier inhibe le récepteur 2 du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur sécrété par les tumeurs cancéreuses pour stimuler l'angiogenèse [Broxterman et Georgopadakou, 2005]. La thalidomide, qui a jadis fait les manchettes

pour ses terribles effets sur le développement embryonnaire, inhibe aussi l'angiogenèse [Karp, 2004; Nam et Parang, 2003].

1.5.2 Les protéines impliquées dans le cycle cellulaire

L'altération des protéines régulant le cycle cellulaire peut provoquer l'apparition d'un phénotype cancéreux. Ces altérations ont souvent pour origine une mutation des gènes codant pour ces protéines. On distingue normalement deux familles de gènes dont la modification peut engendrer le phénotype cancéreux [Karp, 2004; Griffiths *et al.*, 2001]:

1) Les *oncogènes* : ces gènes, une fois mutés, provoquent une stimulation continue de la prolifération cellulaire.

2) Les *anti-oncogènes* (gènes suppresseurs de tumeurs) : ces gènes ont pour rôle d'inhiber la prolifération cellulaire, par exemple en provoquant l'apoptose. L'inactivation de ces gènes, en empêchant l'inhibition de la prolifération cellulaire, peut favoriser l'apparition d'une tumeur.

Les gènes et les protéines impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont très nombreux. Une altération susceptible de provoquer le cancer peut donc survenir à plusieurs endroits. On peut croire que ce vaste ensemble de protéines nous offre un grand nombre de cibles potentielles pour une chimiothérapie. Seulement, il est peu évident de

concevoir des produits susceptibles d'agir spécifiquement sur l'une de ces protéines sans agir sur les autres [Kunick, 2004]. Certains spécialistes pensent qu'il faudrait, avant de traiter un patient, identifier le gène responsable de son cancer pour prescrire le médicament adéquat [Cook et Wakelam, 2005]. Cette approche, combinée à l'évaluation du métabolisme du patient, pourrait conduire à une thérapie personnalisée susceptible de déclencher une réponse favorable envers le traitement [Chaisemartin et Lorient, 2005]. Nous allons voir quelques exemples de produits suggérés pour atteindre ces protéines.

1.5.2.1 Protéines stimulant la prolifération cellulaire

L'exemple le plus connu de protéine impliquée dans la prolifération cellulaire est celui de la protéine Ras. Le gène codant pour cette protéine fut le premier oncogène mis en évidence [Griffiths *et al.*, 2001].

La protéine Ras constitue l'une des étapes d'une voie de signalisation servant à stimuler la prolifération cellulaire. Lorsque la cellule reçoit un signal favorisant la prolifération cellulaire, Ras se fixe à une molécule de guanine-triphosphate (GTP), ce qui la rend active. Sous cette forme, Ras active une sérine/thréonine kinase en aval. Le signal parcourt ainsi le reste de la voie, déclenchant, en bout de ligne, la prolifération cellulaire. Pour s'inactiver, Ras hydrolyse elle-même le GTP en guanine-diphosphate (GDP). Sous sa forme mutée, Ras diffère du phénotype sauvage par un seul acide aminé. Cette simple mutation faux-sens rend la protéine incapable d'hydrolyser le GTP. Par conséquent, comme elle reste toujours fixée à du GTP, elle reste toujours active. Même si aucun

facteur de prolifération n'est fixé à la cellule, cette dernière continue de se multiplier, favorisant ainsi l'apparition d'une tumeur [Janeway *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2001].

De nombreuses autres protéines semblables à Ras sont impliquées dans la signalisation cellulaire. Par exemple, les récepteurs membranaires avec une activité tyrosine kinase sont impliqués dans l'apparition de cancer lorsqu'ils transmettent en permanence un signal incitant à la prolifération cellulaire. Comme ces récepteurs sont beaucoup moins actifs et moins exprimés dans les cellules normales que chez les cellules cancéreuses, ils constituent une cible intéressante [Guillermard et Saragovi, 2004]. Deux approches sont étudiées pour agir sur ces récepteurs : l'emploi d'anticorps monoclonaux capables de fixer le domaine extracellulaire de ces récepteurs [Cross, 2005], et l'emploi de molécules capables d'inhiber l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire du récepteur. Cette dernière stratégie s'est révélée efficace contre la leucémie myéloïde chronique avec la mise au point du Gleevec® [Cattley et Radinsky, 2004; Kunick, 2004].

1.5.2.2 Protéines inhibant la prolifération cellulaire

Actuellement, les chercheurs ont identifié trois processus par lesquels une cellule peut mourir : l'apoptose, l'autophagie (sur laquelle nous ne nous attarderons pas) et la nécrose [Bras *et al.*, 2005]. Le processus de l'apoptose, ou suicide cellulaire programmé, est l'un des processus fondamentaux de l'organisme. Il intervient au cours de l'embryogenèse, de l'action du système immunitaire et dans le maintien de l'homéostasie en régulant le nombre de cellules [Cristea et Espoti, 2004]. Son activation peut reposer

sur des facteurs extrinsèques, par exemple la liaison de FAS ligand au récepteur FAS. Le récepteur FAS contient dans son extrémité cytoplasmique un domaine (appelé « domaine de mort ») qui active une cascade de protéases cellulaires nommées « caspases ». L'activation des caspases conduit à l'apoptose. Également, l'apoptose peut aussi être déclenchée par des facteurs intrinsèques. En effet, la libération du cytochrome c par les mitochondries endommagées (ex : au cours d'un stress oxydatif) déclenche, elle aussi, la cascade des caspases. Au cours de l'apoptose, la cellule condense sa chromatine, découpe son ADN en fragments de longueurs spécifiques et se recroqueville sans endommager sa membrane plasmique. Cette dernière forme des replis internes très caractéristiques, connus sous le nom de « corps apoptotiques ». En fin de suicide, la cellule est absorbée par les cellules du système immunitaire [Hong *et al.*, 2004; Janeway *et al.*, 2003].

Par comparaison, la mort de la cellule au cours d'une nécrose est un processus passif au cours duquel on observe une augmentation du volume de la cellule, une rupture de la membrane plasmique et un déversement du cytoplasme dans le milieu environnant [Chandra et Orrenius, 2002]. L'intégrité de la membrane plasmique constitue donc l'une des principales différences entre l'apoptose et la nécrose.

Une altération dans les voies de signalisation régulant l'apoptose peut empêcher la réalisation de celle-ci. La cellule qui échappe ainsi à l'apoptose peut alors se multiplier sans tenir compte des signaux l'incitant au suicide. Étant donné que plusieurs agents chimiothérapeutiques, ainsi que la radiothérapie, tuent les cellules cancéreuses en provoquant leur apoptose, les tumeurs qui ont perdu cette capacité d'autodestruction

résistent à ces traitements. Pire encore, certains cancers en cours de traitement peuvent acquérir cette résistance [Blagosklonny, 2004].

Les mutations inhibant l'apoptose peuvent intervenir autant au niveau des protéines qui réalisent le processus d'autodestruction qu'au niveau des récepteurs des signaux déclenchant le processus [La porta, 2004]. La réactivation de l'apoptose pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique, par exemple en inhibant des kinases anti-apoptotiques (ex : avec des inhibiteurs de Raf-1) ou en activant les caspases (ex : avec un activateur de la caspase-8 ou de la caspase-9). Des agents comme la cisplatine, le 5-fluorouracil (5-FU) et le Teniposide (VM-26) peuvent déclencher l'apoptose dans les cancers de la tête et du cou. Combiner ces agents avec des agents chimiothérapeutiques conventionnels serait envisageable [Blagosklonny, 2004; Hsu *et al.*, 2003].

1.5.3 La télomérase

Les chromosomes linéaires des cellules eucaryotes possèdent à leurs extrémités des structures appelées « télomères ». Ces structures sont formées par de courtes séquences répétées en tandem. Elles auraient un rôle à jouer dans la stabilité du chromosome, le protégeant contre la dégradation et les réarrangements anormaux. À chaque cycle de division cellulaire, les télomères se raccourcissent d'environ cinquante nucléotides. Après plusieurs cycles, les chromosomes deviennent instables et la cellule meurt. En moyenne, une lignée cellulaire peut se diviser une cinquantaine de fois avant de mourir. Ce phénomène a alimenté de nombreuses théories sur les causes et les

traitements de la sénescence cellulaire observées au cours du vieillissement. Mais également, les télomères ont peut-être un rôle important dans la formation des tumeurs [Palumbo, 2004; Garrett et Grisham, 2000].

Il existe en effet une enzyme, la télomérase, qui permet à chaque division cellulaire de reconstituer les télomères. Cette enzyme est active dans la division des cellules germinales, comme les spermatozoïdes. Ces cellules peuvent ainsi se diviser un nombre supérieur de fois [Lodish *et al.*, 2000]. Or, il a été constaté qu'environ 80% des cancers étudiés montrent une activité de la télomérase. On pense que l'activation de la télomérase dans des cellules somatiques, où normalement elle n'est pas exprimée, peut conduire à l'apparition d'un phénotype cancéreux. Cette enzyme pourrait constituer un marqueur facilitant les diagnostics de cancer, ainsi qu'une cible. En effet, certains agents comme les dérivés de l'anthraquinone (ex : 2,6-diaminoanthraquinone BSU-1051) et les fluorenones peuvent inhiber la télomérase [Palumbo, 2004; Nam et Parang, 2003]. Il est également possible d'administrer des agents susceptibles de se fixer aux télomères et qui peuvent ensuite inhiber la télomérase (ex : telomestatine) [Kelland, 2005].

1.5.4 Les espèces oxygénées réactives (ROS)

Les espèces oxygénées réactives (ROS) ont beaucoup retenu l'attention de la communauté scientifique au cours des dernières années. Les ROS semblent en effet impliqués dans de nombreuses maladies neurodégénératives (notamment la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson), le diabète, le cancer et le vieillissement [Karp,

2004; Enns, 2003]. Si les ROS peuvent favoriser l'apparition d'un cancer, il est apparu récemment qu'ils pourraient aussi aider à éliminer les cellules cancéreuses [Pelicano *et al.*, 2004; Brown et Bicknell, 2001]. Comme l'étude des ROS occupe une place importante dans ce mémoire, il est essentiel de bien définir la nature des ROS, leurs effets sur les cellules et leur rôle potentiel dans la lutte contre le cancer.

1.5.4.1 Nature des ROS

Le métabolisme de la cellule eucaryote emploie l'oxygène, notamment au niveau de la respiration cellulaire (chaîne de transport des électrons). L'emploi d'oxygène dans la respiration cellulaire permet d'optimiser l'extraction de l'énergie au cours de la digestion du glucose. En effet, sans oxygène, les cellules ne peuvent extraire de leur nourriture qu'une infime quantité d'énergie, ce qui limite leur activité. Malgré l'avantage que l'oxygène représente sur le plan énergétique, ce gaz reste toxique, vu sa capacité à oxyder et endommager les molécules biologiques. Une des conséquences fâcheuses de l'emploi de l'oxygène par le métabolisme vient d'ailleurs du fait que celui-ci génère de nombreux composés intermédiaires oxygénés : les « espèces oxygénées réactives » (ROS), dont il a été question [Karp, 2004; Korsloot *et al.*, 2004]. Comme leur nom l'indique, les ROS sont réactifs, pouvant oxyder et endommager les molécules biologiques. Toutefois, à faible dose, ces mêmes ROS peuvent jouer un rôle bénéfique, comme, par exemple, stimuler la prolifération cellulaire. On peut diviser les ROS en deux grandes catégories [Korsloot *et al.*, 2004]:

1) Les *radicaux libres*, porteurs d'un électron libre : par exemple l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et l'oxyde nitrique (NO^{\bullet});

2) Les *ROS non-radicalaires*; par exemple : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (O_2).

1.5.4.2 Génération endogène des ROS

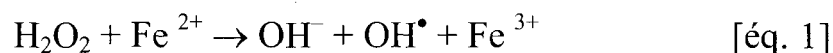
Les ROS sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote. Les principales sources *exogènes* de ROS comprennent les autres cellules, les produits chimiques et les radiations ionisantes. Les principales sources *endogènes* de ROS comprennent les processus métaboliques employant de l'oxygène. On peut citer en exemple la chaîne de transport des électrons, située à l'intérieur de la mitochondrie et les réactions oxydantes impliquées dans la détoxification des xénobiotiques [Barzilai et Yamamoto, 2004]. À cette liste de sources endogènes, nous pouvons aussi ajouter la production de ROS en présence de métaux. Nous détaillerons, ci-dessous, certaines sources endogènes de ROS, soit la chaîne de transport des électrons et la production de ROS en présence de métaux.

On considère la chaîne de transport des électrons comme étant la principale source endogène de ROS. Lors de la respiration cellulaire, les différents complexes protéiques qui composent cette chaîne transportent des électrons chargés d'énergie jusqu'à un atome d'oxygène. Cet atome d'oxygène, une fois combiné avec l'électron, s'associe avec les

ions hydrogène environnants pour former une molécule d'eau. Au cours de son transport dans la chaîne, l'électron dissipe son énergie, laquelle est récupérée pour former de l'ATP [Karp, 2004]. Seulement, cette chaîne peut laisser fuir les électrons dans la matrice de la mitochondrie avant la fin du transport, notamment au niveau des complexes protéiques I et III [Szewczyk et Wojtczak, 2002]. Ces électrons fugitifs peuvent s'associer aux atomes d'oxygène environnants pour former des ROS, notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). On estime généralement que de 1% à 2% de l'oxygène consommée par la mitochondrie est ainsi « gaspillé » dans la formation d'anions superoxydes [Korsloot *et al.*, 2004; Enns, 2003]. Cependant, le taux d'anion superoxyde reste bas, dans l'ordre du picomolaire, parce que ce ROS est rapidement détoxifié. L'anion superoxyde est peu réactif, mais il peut inhiber plusieurs enzymes en pénétrant dans leur site actif. De plus, il peut engendrer des ROS plus réactifs. Par exemple, en milieu acide, l'anion superoxyde peut être converti en radical hydroxyle (OH^{\bullet}), un ROS à la fois très réactif et cytotoxique. En présence d'oxyde nitrique (NO^{\bullet}), l'anion superoxyde peut former un peroxynitrite ($ONOO^-$), lequel peut à son tour se décomposer en radical hydroxyle en présence de fer [Korsloot *et al.*, 2004].

Cette dernière réaction nous montre un autre processus important dans la production de ROS, soit celui de leur génération en présence de métaux comme le fer et le cuivre. La réaction de Fenton, qui permet de générer le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), illustre bien ce phénomène. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne possède pas une grande réactivité intracellulaire, mais il peut former des radicaux libres plus dangereux en présence de métaux. Au cours de la réaction de Fenton,

un atome de métal, généralement du fer ou du cuivre, facilite la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en radicaux plus réactifs (éq. 1) [Korsloot *et al.*, 2004]:



1.5.4.3 Dommages provoqués par les ROS

Il a été dit que le principal danger des ROS vient de leur capacité à oxyder et endommager les composantes de la cellule. Pour minimiser ces dommages, la cellule eucaryote emploie des mécanismes de défense, que nous détaillerons plus loin, permettant d'établir un équilibre entre la production et l'élimination des ROS. Lorsque la production excède l'élimination, l'accumulation des ROS conduit à l'apparition d'un stress oxydatif. Toutes les molécules biologiques majeures peuvent être endommagées, notamment les protéines, les acides nucléiques et les lipides [Korsloot *et al.*, 2004, Chandra et Orrenius, 2002]. Les dégâts causés par cette oxydation peuvent conduire la cellule à l'apoptose ou à la nécrose [Vergani *et al.*, 2004; Korsloot *et al.* 2004; Morel et Barouki, 1998]. Une augmentation progressive des ROS peut conduire à un ralentissement du cycle cellulaire et son arrêt. La cellule doit en effet cesser ses activités liées à sa division pour réparer les dégâts [Barzilai et Yamamoto, 2004].

Les lipides membranaires sont particulièrement sensibles aux attaques des ROS, étant donné qu'ils peuvent subir, lors de ces attaques, une dégradation en chaîne connue sous le nom de « peroxydation lipidique » [Korsloot *et al.*, 2004; Rémita, 2001]. Ce type

de dégradation peut altérer la membrane plasmique entière d'une cellule. On le trouve impliqué dans de nombreuses pathologies, ainsi que dans les effets délétères de plusieurs polluants [Valavanidis *et al.*, 2006; Enns, 2003]. Comme la peroxydation lipidique est étudiée au cours des travaux rapportés ici, ce processus sera détaillé ci-dessous.

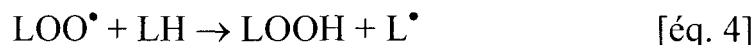
La peroxydation lipidique peut être résumée en quatre grandes étapes. Au cours de la première étape, un ROS, (R^\bullet), réagit avec les atomes d'hydrogène présents sur les lipides membranaires (LH). Le ROS arrache l'hydrogène et laisse le lipide avec un électron libre (L^\bullet), rendant ce dernier capable de réagir avec les autres lipides environnants (éq. 2) [Korsloot *et al.*, 2004; Rémita, 2001]:



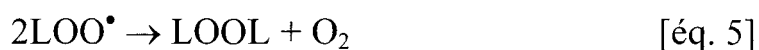
À la seconde étape, la réaction de ce lipide porteur d'un électron libre avec l'oxygène engendre ensuite un radical peroxyde (LOO^\bullet) (éq. 3):



À la troisième étape, ce radical peroxyde réagit à son tour avec un autre lipide membranaire, arrachant à ce dernier un hydrogène. Au cours de cette réaction, le radical peroxyde est converti, par l'ajout de cet hydrogène, en radical hydroperoxyde stable. Seulement, le lipide d'où provient l'hydrogène se retrouve lui-même transformé en radical libre porteur d'un électron célibataire (éq. 4):



Ce radical peut à son tour réagir avec l'oxygène, engendrer un nouveau radical peroxy et réagir avec un autre lipide et etc. La réaction de dégradation des lipides se poursuit, chaque cycle générant un nouveau radical. La fin de cette réaction en chaîne survient lorsqu'un antioxydant fixe le radical, ou lorsque deux radicaux se combinent (éq. 5):



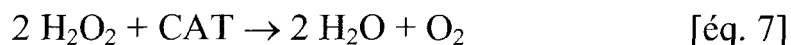
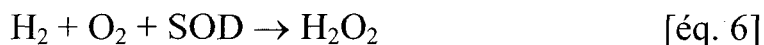
Une telle réaction en chaîne peut facilement endommager la membrane plasmique entière d'une cellule et conduire celle-ci à la mort. L'intervention de la peroxydation lipidique dans de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, en fait un phénomène souvent quantifié en médecine. Seulement, quantifier la peroxydation lipidique est une opération difficile, surtout *in vivo*. En effet, la plupart des méthodes d'évaluation consiste à détecter et mesurer les produits résultant de la dégradation des lipides au cours du processus. Seulement, ces produits sont très diversifiés. De plus, ils peuvent être rapidement éliminés par le métabolisme de la cellule, ce qui peut fausser les mesures [Rémita, 2001]. Par exemple, le malondialdéhyde, un produit de dégradation souvent employé en médecine, peut être quantifié par spectrophotométrie au moyen d'un test employant l'acide thiobarbiturique. Mais le malondialdéhyde est une molécule rapidement métabolisée par l'organisme, et sa

détection doit s'accompagner de nombreuses précautions [Lefèvre *et al.*, 1998]. *In vitro*, différents fluorochromes peuvent être utilisés pour détecter la peroxydation lipidique. Généralement, ces fluorochromes s'insèrent dans les membranes plasmiques des cellules en culture, où ils peuvent être oxydés au cours de la peroxydation. La quantification des fluorochromes oxydés peut être effectuée par fluorométrie. Le BODIPY C-11, employé dans le présent mémoire, illustre bien ce genre de fluorochrome [Drummen *et al.*, 2004].

1.5.4.4 Mécanismes cellulaires de défense contre les ROS

Sous des conditions normales, les mécanismes de défense contre les ROS font en sorte que ceux-ci restent en quantité minime malgré leur génération continue. Ces mécanismes se classent en deux catégories majeures : les systèmes *enzymatiques* et les systèmes *non-enzymatiques*.

Dans les systèmes *enzymatiques*, des enzymes spécialisées transforment les excès de ROS en eau. On peut donner en exemple le tandem formé par la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), qui convertissent les excès d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en eau au cours des deux réactions suivantes (éq. 6 et éq. 7) [Korsloot *et al.*, 2004]:



Le système enzymatique le plus important dans les défenses antioxydantes de la cellule reste sans contredit les enzymes employant comme cofacteur le glutathion (GSH), un tripeptide capable de fixer les ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^\bullet). Le GSH est l'une des plus abondantes molécules de la cellule, se retrouvant à des concentrations intracellulaires variant entre 0,5 mM et 10 mM. On estime que le GSH est responsable de l'élimination de 80% à 95% des ROS formés par une cellule. Outre sa capacité à fixer les ROS, le GSH peut aussi fixer les xénobiotiques, ce qui en fait un acteur important pour la détoxification et le maintien de l'homéostasie. Le GSH peut fixer les ROS soit par interaction directe, soit en servant de cofacteur sur lequel une enzyme antioxydante peut fixer un ROS. Nous pouvons citer, en exemple, la glutathion peroxydase, capable de fixer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur le GSH. [Balendiran *et al.*, 2004; Korsloot *et al.*, 2004]

Dans les systèmes *non-enzymatiques*, des molécules spéciales captent les ROS, les empêchant de réagir avec des structures plus importantes. Les antioxydants comme les vitamines A, C et E peuvent capter les ROS par interaction directe. La vitamine E, qui est un liposoluble, constitue un excellent protecteur des membranes plasmiques.

1.5.4.5 ROS et cancer

Comparées aux cellules normales, les cellules cancéreuses sont en état de stress oxydatif. Leur métabolisme est en effet altéré et fort élevé, peut-être pour combler les dépenses énergétiques que demande une intense prolifération, ce qui entraîne une

génération accrue de ROS [Pelicano *et al.*, 2004]. Pour combattre ce surplus de ROS, les cellules cancéreuses activent leurs défenses antioxydantes, rétablissant leur homéostasie. Plusieurs voies de signalisation contrôlent ces défenses antioxydantes, offrant de nouvelles cibles pour une chimiothérapie. En court-circuitant ces voies de contrôle avec un agent adéquat, les cellules cancéreuses deviendraient incapables de se protéger. L'augmentation du stress oxydatif qu'elles subiraient aboutirait à leur mort [Pennington *et al.*, 2005].

Il a été suggéré également qu'un stress oxydatif intense peut aider les cellules cancéreuses à résister aux agents chimiothérapeutiques. En effet, un tel stress peut provoquer la peroxydation des lipides membranaires, ce qui amène une génération d'aldéhydes capables d'inhiber l'apoptose [Conklin, 2004]. Or, comme nous l'avons mentionné antérieurement, certains agents chimiothérapeutiques agissent en induisant l'apoptose chez les cellules cancéreuses (ex : agents antineoplastiques). Ce type de chimiothérapie pourrait donc tirer avantage d'un usage parallèle d'antioxydants.

Toutefois, ce stress oxydatif peut être tourné à notre avantage : un agent susceptible d'augmenter la génération de ROS dans les cellules ne causera pas de dommage aux cellules normales, capables d'absorber ce surplus. Mais les cellules cancéreuses sont plus vulnérables à une telle augmentation, étant donné qu'elles peuvent se retrouver facilement au delà du seuil de tolérance au stress oxydatif [Pelicano *et al.*, 2004; Brown et Bicknell, 2001]. À titre d'exemple, les anthracyclines provoquent la mort des cellules cancéreuses en augmentant leur stress oxydatif [Jung et Reszka, 2001].

Mentionnons également que certaines expériences ont montré l'intérêt de diminuer les défenses antioxydantes des cellules cancéreuses. En réduisant le GSH chez des cellules pancréatiques cancéreuses avec un inhibiteur de la synthèse de GSH, le buthionine sulfoximine, on a pu provoquer une diminution de leur prolifération, puis leur apoptose [Schnelldorfer *et al.*, 2000]. Or, chez des cellules normales, on observe qu'une telle fixation du GSH peut provoquer un important stress oxydatif et conduire à la nécrose ou à l'apoptose [Schulz *et al.*, 2000; Bains et Shaw, 1997]. Il n'est pas étonnant que certains chercheurs considèrent le GSH comme une cible intéressante pour tuer les cellules cancéreuses [Balendiran *et al.*, 2004].

1.6 Importance de caractériser le mécanisme d'action

La littérature abondante consacrée à ces nouvelles cibles reflète l'intérêt porté aujourd'hui au mécanisme d'action des agents chimiothérapeutiques. Comprendre ces mécanismes nous a permis de mieux orienter la recherche dans le domaine du cancer, et ainsi de faciliter la mise au point de nouveaux anticancéreux [Tubiana, 2003]. Mais plus encore, nous avons compris que pour administrer un anticancéreux à un patient, nous ne pouvons plus nous contenter de la simple observation d'une toxicité envers les cellules cancéreuses. Autrefois, la caractérisation du mécanisme d'action se déroulait durant les essais cliniques. Or, caractériser le mécanisme d'action d'une molécule avant ces essais peut permettre de prévoir qu'elle ne franchira pas le stade clinique. Une telle prédiction peut nous éviter de perdre temps et argent, et ce sans considérer les patients qui ne seront pas exposés inutilement [Marchini *et al.*, 2004].

Aussi, l'étude du mécanisme d'action des molécules est importante pour comprendre leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique. Depuis les années 1970, on vérifie systématiquement comment chaque médicament est absorbé, distribué, métabolisé puis excrété par l'organisme. Ces informations sont essentielles pour déterminer les doses et les formulations adéquates lors d'une administration à un patient [Appels *et al.*, 2005; Heath et Colburn, 2000]. Enfin, le mécanisme d'action des molécules est essentiel à l'élaboration de thérapies combinatoires, ainsi que pour anticiper les résistances susceptibles de se développer [Cattley et Radinsky, 2004].

Nous savons que l'isocaryophyllène tue les cellules cancéreuses. Mais avant de l'administrer à un patient, il est primordial de savoir *comment* elle les tue. Cela nous permettra de vérifier si cette molécule n'agit pas sur d'autres processus fondamentaux de l'organisme [Capranico, 2004]. Aussi, comprendre comment l'isocaryophyllène tue les cellules cancéreuses, nous aidera à identifier les médicaments qui agiront en synergie avec elle et ceux qui, au contraire, seront antagonistes. Enfin, la connaissance du mécanisme d'action pourra éventuellement nous aider à modifier l'isocaryophyllène de façon à la rendre plus efficace, voire à diminuer ses effets secondaires. Ces différentes raisons montrent que nous avons tout intérêt à caractériser le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène.

1.7 Résumé des travaux antérieurs

Le point de départ du présent projet de recherche sur l'isocaryophyllène est une étude publiée antérieurement sur l'activité antitumorale de l'huile de sapin baumier par le groupe de Legault [Legault *et al.*, 2003]. Cette étude avait permis d'identifier l' α -humulène comme le produit majoritairement responsable de l'activité anticancéreuse de cette huile. Le mécanisme d'action de l' α -humulène avait été partiellement caractérisé au cours des mêmes travaux. L'activité de l'isocaryophyllène avait aussi été examinée. Comme cette étude est à l'origine des expériences rapportées dans le présent mémoire, elle sera brièvement résumée ici. Les méthodes employés lors de cette étude seront nommées ici mais expliquées plus loin dans l'article constituant le chapitre 4, étant donné qu'elles ont aussi été utilisées dans le présent projet de recherche.

1.7.1 Activité antitumorale de l'huile de sapin baumier et de ses constituants

Dans un premier temps, la cytotoxicité de l'huile de sapin baumier a été évaluée au moyen du test de réduction de la résazurine (voir points 3.3.3 et 3.4.4) sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines, soit MCF-7 (adénocarcinome du sein), PC-3 (adénocarcinome de la prostate), A-549 (carcinome du poumon), DLD-1 (adénocarcinome du colon), L-929 (adénocarcinome de souris), M4BEU (mélanome humain) et CT26 (colon de souris). La même évaluation a été effectuée en parallèle avec

des fibroblastes humains normaux. Les lignées cancéreuses se sont toutes révélées sensibles à l'huile de sapin baumier (tableau 2). Les fibroblastes normaux, quant à eux, ont été significativement moins sensibles. Ces résultats permettaient d'envisager l'existence possible d'un effet sélectif de l'huile de sapin baumier contre les cellules cancéreuses.

Tableau 2 : Effet de l'huile de sapin baumier sur l'inhibition de la croissance de plusieurs lignées cellulaires [Legault *et al.*, 2003]

Lignées cellulaires	MCF-7	PC-3	A-549	DLD-1	M4BEU	Fibro	L-929	CT-26
IC ₅₀ (mg/ml)	1,1 ± 0,2	1,7 ± 0,4	1,1±0,3	1,4±0,3	0,8 ± 0,3	3,1±0,4	1,6±0,1	0,76 ± 0,04

Dans un second temps, une analyse de l'huile de sapin baumier fut réalisée pour en déterminer les constituants. L'activité antitumorale de chacun de ces constituants fut ensuite évaluée contre les cellules de l'adénocarcinome du sein MCF-7. Un seul composé fut observé comme actif, soit l' α -humulène. Étrangement, un autre constituant, le β -caryophyllène, ainsi que son dérivé, le β -caryophyllène oxydé, qui avaient été considéré comme actifs dans d'autres études [Kubo *et al.*, 1996], se révélèrent inactifs. L'évaluation de l'activité antitumorale d'un isomère du β -caryophyllène absent de l'huile de sapin baumier, l'isocaryophyllène (ou γ -caryophyllène), fut aussi effectué. L'isocaryophyllène se révéla actif contre toutes les lignées cancéreuses testées, et parfois même plus actif que l' α -humulène (tableau 3). De plus, l'isocaryophyllène était significativement moins

toxique sur les fibroblastes humains que sur les cellules cancéreuses. Pour la première fois, on rapportait une observation permettant de considérer cette molécule comme un anticancéreux potentiel. Mais comme l'étude portait d'abord sur les constituants de l'huile de sapin baumier, la suite des expériences fut consacrée essentiellement à caractériser le mécanisme d'action de l' α -humulène. Le modèle cellulaire retenu fut les cellules L-929, qui s'étaient révélées plus sensibles que les autres à l' α -humulène.

Tableau 3 : Effet de l' α -humulène, du β -caryophyllène, du β -caryophyllène oxydé et de l'isocaryophyllène sur l'inhibition de la croissance de plusieurs lignées cellulaires [Legault *et al.*, 2003] IC₅₀ en mg/ml

Composé	Lignées cellulaires							
	MCF-7	PC-3	A-549	DLD-1	M4BEU	Fibro	L-929	CT-26
α -humulène	73 \pm 2	73 \pm 2	68 \pm 2	71 \pm 2	55 \pm 2	85 \pm 5	50 \pm 1	53 \pm 1
β -caryophyllène	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
β -caryophyllène oxydé	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Isocaryophyllène	84 \pm 6	87 \pm 8	59 \pm 4	102 \pm 12	43 \pm 3	124 \pm 15	34 \pm 1	46 \pm 1

1.7.2 Effets de l' α -humulène sur le GSH intracellulaire des cellules L-929

Une première série d'expériences eut pour objectif de vérifier les effets de l' α -humulène sur le taux de glutathion (GSH) intracellulaire des cellules L-929. Le GSH, un

tripeptide, est impliqué dans de nombreux processus de détoxification des xénobiotiques, moyennant l'intervention d'enzymes comme la glutathion-S-transferase (GST). Le GSH peut aussi détoxifier les espèces oxygénées réactives (ROS). Il avait déjà été montré que la cytotoxicité de certains produits était provoquée par leur capacité à réduire le taux de GSH. Or, il avait été montré aussi que l' α -humulène semblait induire une activité GST, laissant entrevoir la possibilité d'une détoxification avec le GSH [Zheng *et al.*, 1992]. La capacité de l' α -humulène à diminuer le GSH fut donc vérifiée au moyen de tests au monochlorobimane (voir section 3.3.8). Comme montré dans la figure 2, une réduction dose-dépendante et temps-dépendante fut observée : pour des doses d' α -humulène de 50 μ M et 200 μ M, des diminutions respectives de GSH de 38% et 71% furent observées après une heure, puis de 69% et 98% après quatre heures. Par comparaison, le diéthyl maléate ester (DEM) à 10 μ M, un agent qui réagit avec le GSH, provoqua une baisse de GSH de 43% après une heure d'incubation. Puisque certains travaux rapportaient que la cytotoxicité liée à une diminution du GSH induite par des agents anticancéreux pourrait impliquer partiellement une augmentation de ROS [Timenstein *et al.*, 2000; Miyajima *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996], l'influence de l' α -humulène sur la génération de ROS fut évaluée.

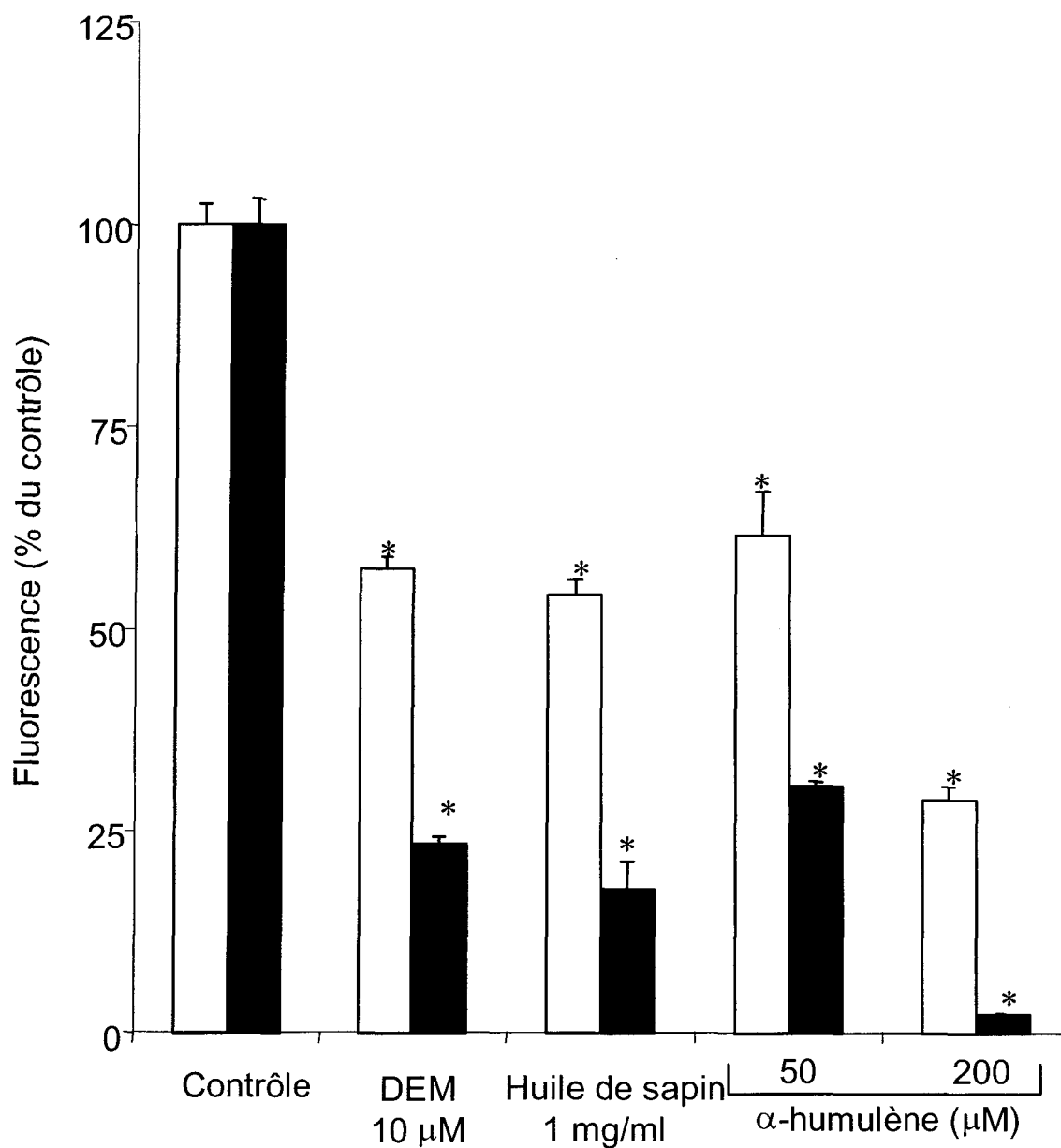


Figure 2. Effets de l'huile de sapin baumier et de l' α -humulène sur le contenu intracellulaire en GSH des cellules L-929 après 1 heure (\square) ou 4 heures (\blacksquare). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. DEM: diethylmaleate. *Différence significative avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

1.7.3 Effet de l' α -humulène sur la génération de ROS chez les cellules L-929

Il est possible, vu le rôle que le GSH joue dans l'élimination des ROS, qu'une réduction du GSH provoque une surproduction de ROS. Ceux-ci peuvent alors endommager les constituants cellulaires, comme les protéines, les lipides et l'ADN, et provoquer la mort de la cellule. L'influence de l' α -humulène sur la production de ROS fut examinée avec un test à la DCFH-DA (voir section 3.4.1). Comme témoin positif, on employa le tert-butyl hydroperoxide (tBH), un générateur de ROS. Tel que montré à la figure 3, on observa une hausse de la génération de ROS en présence de 200 μ M d' α -humulène de 163% et de 278%, après des temps respectifs d'une heure et de quatre heures. Cette production pouvait être diminuée avec des antioxydants comme le PDTC et la déferoxamine. Comme l' α -humulène semblait induire une production de ROS, une série d'expériences supplémentaires fut réalisée pour caractériser le mécanisme derrière la production de ces ROS.

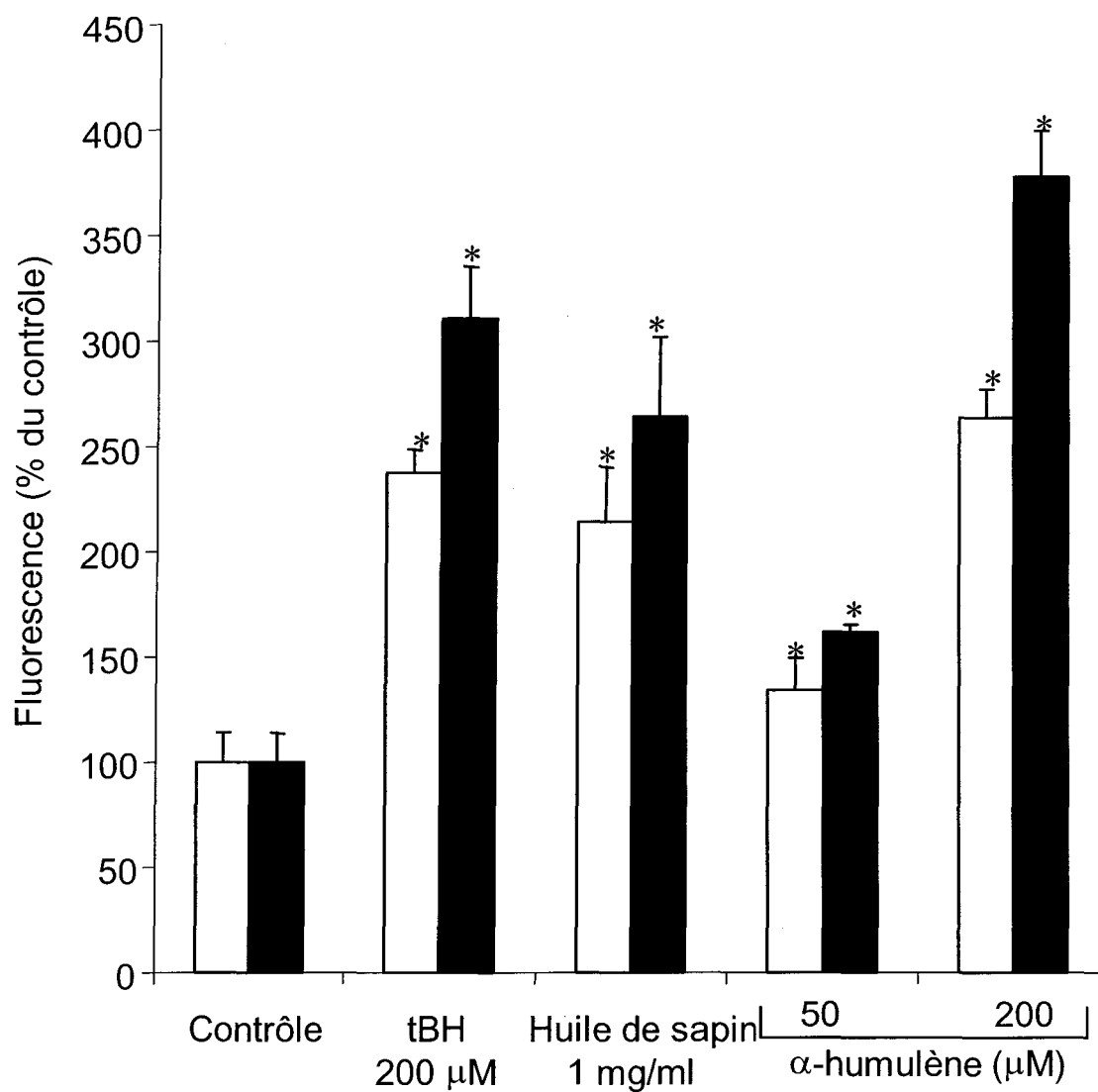


Figure 3. Production de ROS induite par l'huile de sapin baumier et l' α -humulène chez les cellules L-929 après 1 heure (□) ou 4 heures (■). Les valeurs sont la moyenne \pm l'écart-type de trois mesures. tBH: tert-butyl hydroperoxide. *Différence significative avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

1.7.4 Effet de l'inhibition de la chaîne de transport des électrons sur la production de ROS induite par l' α -humulène

Plusieurs processus à l'intérieur de la cellule peuvent entraîner la formation de ROS. Le plus important est sans contredit la chaîne de transport des électrons, localisée dans la mitochondrie. La génération de ROS par cette chaîne peut être augmentée à l'aide de certains agents capables d'altérer la chaîne, comme le TNF- α . Si la chaîne est préalablement inhibée, au moyen d'une substance comme l'antimycine-A qui fixe le cytochrome b de la chaîne, ces agents seront incapables d'augmenter la génération de ROS [Sanchez-Alcazar *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1999].

Pour vérifier si l' α -humulène altère la chaîne de transport, on a donc vérifié si une inhibition de cette chaîne avec l'antimycine-A provoquait une diminution de la production de ROS. Comme montré à la figure 4, l'antimycine-A a pu provoquer une diminution des ROS normalement observés en présence de l' α -humulène. Cette diminution permettait de supposer que l' α -humulène peut altérer la chaîne de transport des électrons.

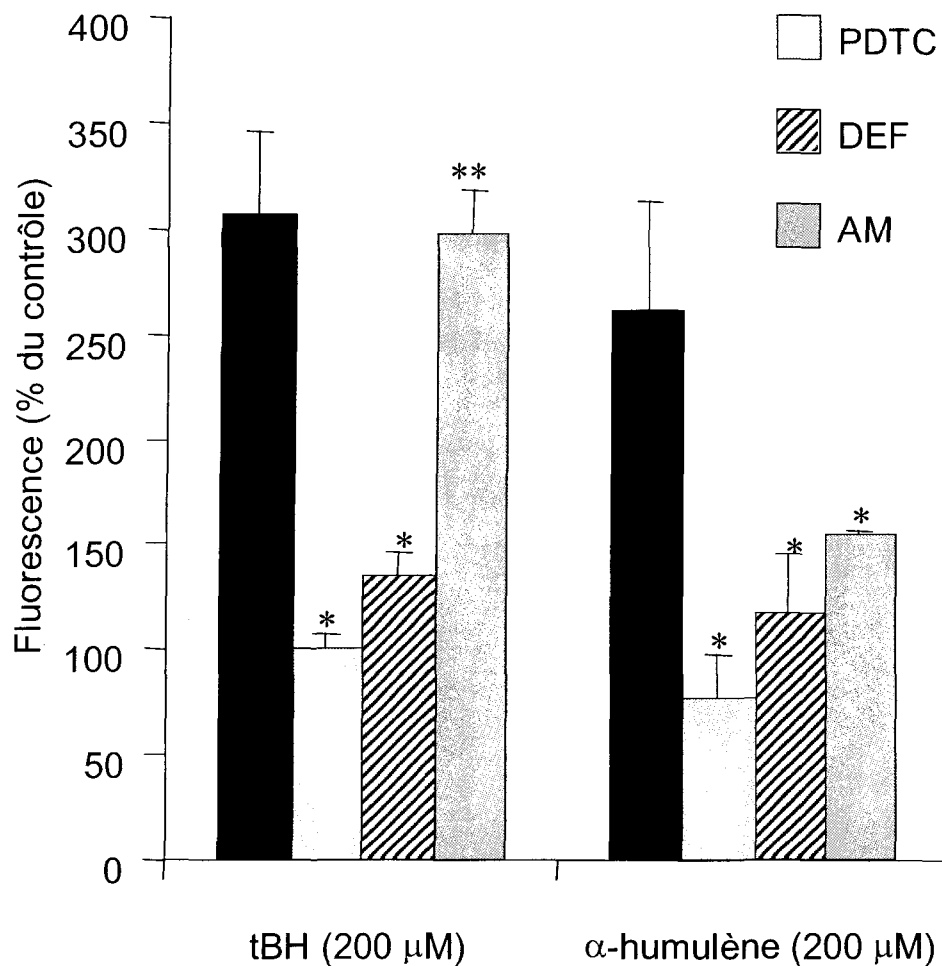


Figure 4. Effets des antioxydants ou d'un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transport mitochondriale sur la production de ROS induite par l' α -humulene chez les cellules L-929. Les valeurs sont la moyenne \pm l'écart-type de trois mesures. tBH: tert-butyl hydroperoxide; PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate; DEF : deferoxamine. *Différence significative avec le tBH ou l' α -humulène; $P \leq 0,05$, test-t de Student; **Aucune différence significative avec le tBH.

1.7.5 Conclusions de l'étude et perspectives pour l'isocaryophyllène

L'huile de sapin baumier s'était révélée active contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses tout en étant moins toxique envers les cellules saines. Cette activité semblait reposer sur l'un des composés de l'huile, l' α -humulène. La caractérisation du mécanisme d'action de l' α -humulène avait permis de supposer que cette molécule provoque une diminution du GSH intracellulaire et une augmentation de la génération de ROS. Cette génération de ROS pourrait être aussi bien le fruit de la réduction du GSH que d'une altération mitochondriale. Seules des expériences supplémentaires permettraient de trancher la question.

Il est intéressant de noter que cette étude était la première à rapporter que l'isocaryophyllène semblait posséder une activité antitumorale. De plus, l'isocaryophyllène s'était révélée plus actif que l' α -humulène contre plusieurs lignées cancéreuses, tout en étant significativement moins toxique que l' α -humulène contre les cellules saines. Cette sélectivité a vite fait d'elle une molécule qui semblait intéressante pour la mise au point d'un anticancéreux. Cependant, comme nous l'avons expliqué à la section 1.6, nous ne pouvons pas nous contenter du simple constat de cette sélectivité avant d'aller plus loin avec cette molécule. Le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène, encore inconnu, devait être caractérisé. Comme les cellules L-929 s'étaient montrées les plus sensibles à cette molécule, elles semblaient idéales pour une telle caractérisation. C'est cette caractérisation qui est rapportée dans le reste du présent mémoire.

CHAPITRE 2

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

L'isocaryophyllène présente un certain intérêt pour la mise au point d'un nouveau traitement contre le cancer. Cette molécule s'est révélée toxique pour de nombreuses lignées de cellules cancéreuses tout en étant moins toxique envers les cellules normales. Avant de poursuivre toute recherche avec ce composé, il faut caractériser son mécanisme d'action, ce qui permettra ultérieurement de vérifier qu'il n'interfère pas avec d'autres processus métaboliques importants. L'objectif principal du présent projet de recherche consistera donc à caractériser le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène en étudiant ses effets sur les cellules L-929 (fibrosarcomes murins). Le choix de ce modèle de cellules repose sur le fait que, parmi toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées, ce sont les plus sensibles à l'isocaryophyllène.

Les objectifs spécifiques consisteront à :

- 1) Évaluer les effets de l'isocaryophyllène sur la génération des ROS intracellulaires;
- 2) Évaluer les effets de l'isocaryophyllène sur la membrane plasmique, notamment la peroxydation lipidique et la perméabilité membranaire;
- 3) Évaluer les effets de l'isocaryophyllène sur le GSH intracellulaire et la chaîne mitochondriale.

CHAPITRE 3

ARTICLE

**Cytotoxicité de l'isocaryophyllène contre les cellules L-929 :
caractérisation du mécanisme d'action**

Philippe-Aubert Côté, André Pichette, Maxime Lebrun et Jean Legault

*Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales, Département des sciences
fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Canada, G7H 2B1*

3.1 Résumé

L'isocaryophyllène, un sesquiterpène, s'est révélé toxique envers plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Dans le présent travail, le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène a été en partie caractérisé à l'aide des cellules L-929 (fibrosarcomes murins). Les effets de l'isocaryophyllène sur la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), sur la peroxydation des lipides membranaires, sur la perméabilité membranaire, sur le taux de glutathion (GSH) intracellulaire et sur l'activité de la chaîne de transport mitochondriale ont été évalués. L'isocaryophyllène a provoqué une hausse de la génération de ROS, ainsi qu'une peroxydation et une perméabilisation de la membrane plasmique chez les cellules exposées. La protection des membranes plasmiques par l' α -tocophérol (vitamine E), un antioxydant liposoluble, a diminué les effets de l'isocaryophyllène. Aucun effet sur le contenu intracellulaire en GSH et la chaîne de transport des électrons n'a été observé. Ces résultats suggèrent que l'isocaryophyllène provoque la mort des cellules cancéreuses en provoquant un stress oxydatif, une peroxydation et une perméabilisation de la membrane plasmique. Rien ne permet de relier le mécanisme d'action de cette molécule à une altération du GSH ou de la chaîne de transport mitochondriale.

3.2 Introduction

Il a été rapporté que l'isocaryophyllène, un sesquiterpène, possède une activité antimicrobienne. On le retrouve d'ailleurs en grande quantité dans des huiles essentielles

ayant démontré une activité antimicrobienne, comme l'huile de *Teucrium marum* (Lamiaceae), de *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae) et de l'*Aristolochia elegans* [1-3]. D'autres sesquiterpènes ont révélé des propriétés anticancéreuses, comme l' α -bisabolol [4] et l' α -humulène, un sesquiterpène présent dans l'huile essentielle des aiguilles du sapin baumier (*Abies balsamea*) [5]. Au cours de travaux antérieurs portant sur l'activité antitumorale de l' α -humulène et de l'isocaryophyllène [5], l'isocaryophyllène avait montré une activité contre plusieurs lignées de cellules tumorales, soit le cancer du sein (adénocarcinome) MCF-7, l'adénocarcinome de la prostate PC-3, le carcinome du poumon A-549, l'adénocarcinome du colon DLD-1, le mélanome humain M4BEU, le fibrosarcome murin (L-929) et le carcinome du colon CT-26. La lignée cellulaire la plus sensible avait été la lignée L-929, avec un IC_{50} de 34 μ M. L'activité de l'isocaryophyllène était souvent supérieure à celle de l' α -humulène. Sur les cellules L-929 par exemple, l'isocaryophyllène s'est révélé plus actif (3,6 fois) contre les cellules L-929 (IC_{50} de 34 μ M) que contre les cellules normales (IC_{50} de 124 μ M), alors que l' α -humulène s'est révélé seulement 1,7 plus actif. Cette plus grande sélectivité de l'isocaryophyllène pour les cellules cancéreuses, par rapport à la sélectivité de l' α -humulène, a permis de suggérer que l'isocaryophyllène pourrait constituer un candidat intéressant pour la mise au point de nouveaux agents anticancéreux. Une caractérisation du mécanisme d'action de l' α -humulène avait ensuite eu lieu sur les cellules L-929, choisies comme modèles parce qu'elles s'étaient révélées les plus sensibles à cette molécule parmi toutes les lignées testées. Cette caractérisation avait permis de suggérer qu'une réduction du GSH intracellulaire des cellules L-929 et une hausse de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), induites par l' α -humulène, étaient

impliquées dans la cytotoxicité de cette molécule. Malheureusement, aucune étude semblable n'a été effectuée sur l'isocaryophyllène, aussi le mécanisme d'action de cette molécule est-il inconnu. Dans le présent travail, la toxicité de l'isocaryophyllène sur les cellules L-929 a été étudiée et son mécanisme d'action mieux caractérisé.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Produits chimiques

Tous les produits chimiques proviennent de la Compagnie *Sigma-Aldrich* (Oakville, Canada) et ont été solubilisés dans l'éthanol 100 %. La concentration finale d'éthanol dans le milieu de culture a été fixée à 0,5 % (v/v).

3.3.2 Culture cellulaire

La lignée cellulaire L-929 (fibroblastes murins) a été fournie par la Compagnie *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA). Les cellules ont été cultivées, selon les protocoles de la Compagnie, dans le milieu essentiel minimum (MEM) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal, une solution de vitamines 100X, du pyruvate de sodium 100X, une solution d'acides aminés non-essentiels 100X, 100 IU de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5 % CO₂, dans une atmosphère humidifiée.

3.3.3 Évaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité a été mesurée par le test de réduction à la résazurine [6]. La cytotoxicité des composés a été exprimée en pourcentages de survie par rapport au témoin. La fluorescence a été mesurée avec un lecteur automatique de plaque 96 puits Fluoroskan Ascent FLTM (Labsystems), avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Pour étudier les effets des antioxydants sur la survie cellulaire en présence d'isocaryophyllène, l' α -tocophérol (vitamine E) à 200 μ M et le (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) à 100 μ M ont été utilisés.

3.3.4 Quantification des espèces oxygénées réactives (ROS)

La production d'espèces oxygénées réactives (ROS) a été mesurée au moyen de la 2,7-dichlorofluorescein-diacétate (DCFH-DA) [7]. Les cellules L-929 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, avec 1×10^4 cellules dans 100 μ l de médium de culture par puits, et incubées pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées avec 100 μ l de PBS 1X et incubées pendant 1 heure à 37°C avec 100 μ l de HBSS 1X contenant de la DCFH-DA (20 μ M). Après un autre lavage avec 100 μ l de PBS 1X, les cellules ont été incubées de nouveau à 37°C dans du HBSS 1X avec ou sans tert-butyl hydroperoxide (tBH) 200 μ M (témoin positif), EtOH (témoin solvant) et isocaryophyllène (de 400 μ M à 50 μ M) avec ou sans antioxydant. Les mêmes antioxydants que ceux indiqués dans la section sur l'évaluation de la cytotoxicité ont été employés aux mêmes concentrations. La

fluorescence a été mesurée sur le lecteur automatique de plaque 96 puits Fluoroskan Ascent FLTM (Labsystems), avec une longueur d'onde d'excitation à 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm.

3.3.5 Évaluation de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été mesurée avec le BODIPY-C11 (Molecular Probes) selon un test adapté [8]. Les cellules L-929 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à 5×10^3 cellules par 100 μ l de milieu de culture par puits et incubées pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées avec 100 μ l de HBSS et incubées de nouveau pendant 24 heures à 37°C dans 100 μ l de milieu avec ou sans antioxydant. Pour étudier les effets des antioxydants sur la peroxydation lipidique en présence d'isocaryophyllène, la vitamine E à 400 μ M et le trolox à 100 μ M ont été employés. Après cette seconde incubation, les cellules ont été lavées avec 100 μ l de HBSS et incubées pendant 30 minutes à 37°C avec une solution de BODIPY C-11 (10 μ M) dans du milieu de culture. Après un second lavage avec 100 μ l HBSS, les cellules ont été incubées à 37°C dans du HBSS avec ou sans EtOH (témoin solvant), isocaryophyllène (400 μ M à 50 μ M) et cumène hydroperoxyde (CHP) 20 mM (témoin positif). La fluorescence a été mesurée dans un lecteur automatique de plaque 96 puits Varioskan Thermo (Electron Corporation) à une longueur d'onde d'excitation de 590 nm et une longueur d'onde d'émission de 635 nm.

3.3.6 Évaluation de perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire a été évaluée à l'aide d'un test à l'iodure de propidium (Molecular Probes) adapté [9, 10] et d'un test à la calcéine-AM (Molecular Probes) adapté des protocoles suggérés par le fournisseur.

Pour le test à l'iodure de propidium, les cellules L-929 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits, avec 15×10^4 cellules dans 100 μ l de médium de culture par puits, et incubées 24 heures à 37°C. Après un lavage au PBS (100 μ l), les cellules ont été incubées à 37°C pendant 60 minutes dans du médium de culture avec ou sans EtOH (témoin solvant), isocaryophyllène (de 400 μ M à 50 μ M) et CHP (20 mM) (témoin positif). Les cellules ont ensuite été lavées au PBS (100 μ l) avant d'être incubées à 37°C avec l'iodure de propidium (25 μ g/ml) en solution dans du PBS. La fluorescence a été mesurée dans un lecteur automatique de plaque 96 puits Varioskan Thermo (Electron Corporation) à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et une longueur d'onde d'émission de 617 nm.

Pour le test à la calcéine-AM, les cellules L-929 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à 1×10^4 cellules par 100 μ l de médium de culture par puits et incubées 24 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec 100 μ l de MEM et incubées 90 minutes avec une solution de calcéine-AM (4 μ M) à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées avec 100 μ l de MEM et incubées 90 minutes à 37°C dans du MEM avec ou sans EtOH (témoin solvant), isocaryophyllène (de 400 μ M à 50 μ M) et saponine 2 % (témoin

positif). Après, le milieu a été retiré et remplacé par du MEM. La fluorescence a été mesurée sur un lecteur de plaque automatique Varioskan Thermo (Electron Corporation) à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm.

3.3.7 Quantification du contenu intracellulaire en glutathion

Le contenu intracellulaire en glutathion (GSH) a été mesuré avec le monochlorobimane (Molecular Probes) [11]. Cette molécule peut se fixer au GSH, moyennant l'intervention de la glutathion-S-transferase, et ainsi devenir fluorescente [12, 13]. Les cellules L-929 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits avec 15×10^4 cellules dans 100 μ l de médium de culture par puits et incubées 24 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec 100 μ l de PBS 1X et incubées 1 heure à 37°C avec 200 μ l de médium de culture en présence ou absence de EtOH (témoin solvant), isocaryophyllène (de 800 μ M à 6,25 μ M) et de diéthyl maléate ester (DEM) 10 μ M (témoin positif). Les cellules ont ensuite été lavées avec 100 μ l de PBS 1X et incubées à température ambiante avec 100 μ l de HBSS 1X, pH 7,4, contenant du monochlorobimane à 7,5 μ M. La fluorescence a été mesurée sur un lecteur automatique de plaque 96 puits Fluoroskan Ascent FLTM (Labsystems) avec une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. Pour vérifier l'effet des antioxydants sur les taux intracellulaires de GSH, nous avons employé les mêmes concentrations que celles fixées dans la section sur l'évaluation de la cytotoxicité.

3.3.8 Quantification de la croissance cellulaire

Après la quantification du GSH, les plaques ont été vidées délicatement à l'aide d'une pompe aspirante, pour éviter d'aspirer les cellules fixées au fond, et placées au congélateur à -80°C pour au minimum 24 heures. Les plaques ont ensuite été décongelées à température ambiante. Un volume de 100 μl de dodécyl sulfate de sodium (SDS) 0,01 % a été ajouté à chaque puits, afin de lyser les cellules restantes. Les plaques ont été congelées à -80°C pour 24 heures. Elles ont ensuite été décongelées à la température de la pièce avant d'ajouter dans chaque puits 100 μl d'une solution de bisbenzimidazole (Hoechst 33342) 30 $\mu\text{g/ml}$ dans du TNE 2X (solution de 10 mM tris-HCL, 1 mM EDTA et 4 M de NaCl). Les plaques ont ensuite été agitées pendant deux heures dans l'obscurité à température ambiante. La fluorescence a été mesurée sur le lecteur automatique de plaque 96 puits Fluoroskan Ascent FLTM (Labsystems), à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm.

3.3.9 Analyse statistique

Les données ont été analysées avec le logiciel Statview 5.0 (SAS Institute Inc.). Les données présentées ont été obtenues en faisant la moyenne de trois mesures \pm l'écart type. La comparaison avec les témoins, ou entre deux groupes de données, ont été réalisées avec le t-test de Student pour échantillons non-appariés. Le seuil de signification est $P \leq 0,05$. Chaque expérience a été répétée au minimum trois fois.

3.4 Résultats

3.4.1 Quantification des espèces oxygénées réactives (ROS)

Dans les travaux antérieurs [5], il avait été observé que l' α -humulène induisait une hausse de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). Il était logique de vérifier si cela était aussi le cas pour l'isocaryophyllène, une molécule de structure similaire. La production de ROS en présence d'isocaryophyllène a été évaluée au moyen de la DCFH-DA. La DCFH-DA traverse la membrane plasmique avant d'être clivée en DCFH par une estérase. La DCFH peut alors être oxydée en DCF fluorescente par le peroxyde d'hydrogène intracellulaire ou d'autres ROS. Ce fluorochrome est fréquemment utilisé pour quantifier les ROS, bien que son oxydation ne permette pas de déterminer précisément les types de ROS présents dans la cellule [14]. Cependant, la DCFH est capable de détecter aussi bien les ROS présents dans la membrane plasmique que ceux présents dans le cytoplasme [15]. Dans le présent travail, la DCFH-DA a permis, en présence d'isocaryophyllène, de détecter une hausse dose-dépendante des ROS (Figure 1). Également, une diminution significative de cette production de ROS en présence d'antioxydants a été observée. En présence de vitamine E 200 μ M, un agent liposoluble capable de protéger les membranes cellulaires [16], la production de ROS a diminué de 69 % et de 75 % pour des concentrations respectives d'isocaryophyllène de 100 μ M et 200 μ M (Figure 1A). En présence de trolox 100 μ M, un antioxydant hydrosoluble constitué par la partie hydrophile de l' α -tocophérol et capable de protéger les

biomolécules du cytoplasme [17], la production de ROS a diminué de 5 % et de 49 % pour des concentrations respectives d'isocaryophyllène de 100 μ M et de 200 μ M (Figure 1B). Comme il est bien connu qu'une surproduction de ROS peut endommager les membranes cellulaires [18], et que la vitamine E, un antioxydant liposoluble capable de protéger les membranes, a permis de diminuer la production de ROS, les effets de l'isocaryophyllène sur la peroxydation des membranes ont ensuite été évalués.

3.4.2 Évaluation de la peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides de la membrane plasmique survient lors de stress oxydatifs intenses. Ce phénomène peut conduire à une perméabilisation de la membrane plasmique et à la mort de la cellule [18]. Pour le présent travail, il a été choisi d'évaluer la peroxydation lipidique au moyen du BODIPY C-11. Le BODIPY C-11 peut, comme la DCFH-DA, réagir avec les ROS et devenir fluorescent. Cependant, ce fluorochrome est hautement hydrophobe et s'insère de préférence dans les membranes plasmiques. Cette caractéristique en fait un bon marqueur pour mesurer la peroxydation des lipides membranaires [15]. Le témoin positif employé dans l'évaluation de la peroxydation est le cumène hydroperoxyde (CPH), une molécule lipophile capable de pénétrer facilement les membranes biologiques et, en présence de métaux, de former notamment des radicaux hydroxyles capables d'initier une peroxydation lipidique [8]. Comme montré à la figure 2, une peroxydation dose-dépendante des lipides membranaires a été observée en présence d'isocaryophyllène, la peroxydation augmentant significativement de 70 % et 111 %, par rapport au témoin, pour des concentrations respectives d'isocaryophyllène de

100 μM et de 200 μM . Il a été constaté aussi que l' α -tocophérol (400 μM) diminue significativement cette peroxydation, la réduisant de 39 % et 40 % pour des concentrations respectives d'isocaryophyllène de 100 μM et 200 μM (Figure 2A). Aucune diminution significative n'a été observée en présence de trolox (Figure 2B). Ce résultat suggère que les ROS observés en présence d'isocaryophyllène provoquent une peroxydation des lipides membranaires chez les cellules L-929. Comme la peroxydation des lipides membranaires peut affecter la perméabilité de la membrane plasmique [18], l'effet de l'isocaryophyllène sur une éventuelle perméabilisation membranaire a ensuite été évalué.

3.4.3 Évaluation de l'altération membranaire

L'intégrité de la membrane plasmique en présence d'isocaryophyllène fut évaluée dans un premier temps au moyen de la calcéine-AM. La calcéine-AM est normalement absorbée par les cellules. Elle est ensuite clivée en calcéine par des estérases, devenant ainsi fluorescente, et ne peut franchir la membrane plasmique pour ressortir. Lorsque la fluidité de la membrane plasmique est altérée, la calcéine diffuse à l'extérieur et les cellules deviennent moins fluorescentes [19, 20]. En présence d'isocaryophyllène, une perméabilisation significative de la membrane plasmique a été observée à partir d'une concentration d'isocaryophyllène de 200 μM (Figure 3A). La diminution de la rétention de la calcéine-AM était de 43 % et 57% pour des concentrations respectives de 200 μM et 400 μM d'isocaryophyllène. L'observation de la perméabilisation membranaire a été confirmée au moyen de l'iodure de propidium. Ce fluorochrome ne peut franchir les

membranes plasmiques des cellules saines. Lorsque la membrane plasmique est perméabilisée ou lysée, l'iodure de propidium peut pénétrer dans la cellule et se lier à l'ADN, devenant ainsi fluorescent. Ce fluorochrome sert souvent pour détecter la nécrose. En effet, au cours de l'apoptose, la membrane plasmique reste intacte. Au cours de la nécrose, on observe une perte de l'intégrité membranaire. Cette perte d'intégrité peut être détectée avec des fluorochromes comme le bleu trypan, le bisbenzimidazole et l'iodure de propidium [21]. En présence d'isocaryophyllène, une perméabilisation membranaire a aussi été observée à partir de 200 μM (Figure 3B). La diffusion de l'iodure de propidium à travers la membrane plasmique augmente de 363 % et de 1103%, par rapport au témoin, pour des concentrations respectives d'isocaryophyllène de 200 μM et 400 μM . Ces résultats renforcent l'observation d'une perméabilisation membranaire faite avec la calcéine-AM. De plus, il permet de penser que la cytotoxicité de l'isocaryophyllène pourrait être le fruit d'un phénomène de nécrose plutôt que d'apoptose. Cependant, cette hypothèse devrait être testée avec de nouvelles expériences. Si les altérations de la membrane plasmique sont impliquées dans la cytotoxicité de la molécule, la protection de ces membranes devrait réduire cette toxicité. C'est ce qui a ensuite été étudié.

3.4.4 Évaluation de l'effet protecteur des antioxydants

Vu que les ROS pourraient être impliqués dans la peroxydation puis la perméabilisation des membranes plasmiques, il était logique de vérifier si, en protégeant les membranes des ROS avec des antioxydants, il était possible de diminuer la toxicité de

immédiatement envisageables. Premièrement, il est possible que l'isocaryophyllène fixe le GSH intracellulaire, une molécule importante dans l'élimination des ROS. Une diminution de la concentration de GSH pourrait éventuellement provoquer une hausse des ROS. Deuxièmement, une inhibition de la chaîne de transport des électrons par l'isocaryophyllène arriverait au même résultat en facilitant le contact entre les électrons de la chaîne et l'oxygène environnant. Ces deux possibilités ont donc été vérifiées pour l'isocaryophyllène.

3.4.5 Effet de l'isocaryophyllène sur le GSH

Il est admis que le glutathion (GSH), un tripeptide, joue un rôle important dans le métabolisme des cellules cancéreuses. D'une part, le GSH peut fixer les ROS, moyennant l'intervention d'une enzyme comme, par exemple, la glutathion peroxydase. Il constitue par le fait même un acteur important dans la protection contre les ROS générés par la cellule cancéreuse [23]. D'autre part, il est souvent impliqué dans la détoxification des molécules toxiques pour la cellule, incluant les agents chimiothérapeutiques dans certains cas de résistance [24]. Certaines expériences ont montré qu'une diminution du GSH chez les cellules cancéreuses, par exemple avec un inhibiteur de la synthèse du GSH comme le buthionine sulfoximine, peut inhiber leur multiplication [25]. De plus, il est admis qu'une diminution de la concentration intracellulaire de GSH peut engendrer un stress oxydatif et conduire à la nécrose ou l'apoptose des cellules [26, 27]. Certains chercheurs considèrent le GSH comme une cible intéressante dans la lutte contre le cancer [28]. Or, il a été montré que la production de ROS de l' α -humulène pourrait être liée à une diminution du

GSH des cellules L-929 [5]. La logique recommandait de vérifier s'il en était de même pour l'isocaryophyllène, étant donné la production de ROS observée en présence de cette dernière. Cette vérification a été effectuée avec le monochlorobimane (MCB), un fluorochrome capable de se fixer au GSH pour former un composé fluorescent. Cette évaluation nous a permis d'observer une chute du GSH à la dose maximale d'isocaryophyllène, 400 μ M, mais non aux doses inférieures (Figure 6A). Pour contre-vérifier ce résultat, le nombre de cellules restantes après la quantification au monochlorobimane a été évalué par dosage avec le Hoescht 33342. Le Hoescht 33342 devient fluorescent lorsqu'il se fixe à l'ADN cellulaire [29]. De cette façon, il est possible de quantifier l'ADN présent et de déduire le nombre de cellules qui étaient présentes au fond des puits lorsque l'expérience au monochlorobimane a été réalisée. Une baisse du nombre de cellules lors de cette expérience entraînerait en effet une diminution de la fluorescence du monochlorobimane. Or, l'isocaryophyllène peut provoquer la mort des cellules aux plus fortes concentrations. Et une diminution du nombre de cellules pourrait provoquer une diminution de fluorescence que l'on pourrait considérer à tort comme une réduction du GSH libre. Une diminution significative du nombre de cellules a été observée à la même concentration d'isocaryophyllène où une baisse du GSH a été observée (Figure 6B). Par conséquent, ces résultats ne permettent pas de suggérer que l'isocaryophyllène fixe le GSH.

3.4.6 Effet de l'inhibition de la chaîne de transport des électrons

La chaîne de transport des électrons, localisée dans la mitochondrie, constitue une des sources principales de production de ROS de la cellule. Cette génération de ROS peut être augmentée à l'aide de certains agents susceptibles de bloquer la chaîne, comme le TNF- α [30]. Un inhibiteur de la chaîne de transport mitochondrial, comme l'antimycine A, un inhibiteur du complexe III, peut empêcher un tel stress oxydatif [30]. Il a été suggéré que l' α -humulène pourrait provoquer une hausse de la production des ROS en se fixant sur le complexe III de la chaîne de transport des électrons [5]. La même vérification allait de soi pour l'isocaryophyllène. Au moyen de la DCFH-DA, la production de ROS a été évaluée chez des cellules L-929 traités avec une dose constante d'isocaryophyllène (200 μ M) mais des doses croissantes d'antimycine A (0,78 μ M à 100 μ M). Si l'antimycine A provoque une diminution des ROS normalement générés par l'isocaryophyllène, il serait possible que la production de ROS dépend de cette chaîne. L'expérience n'a pas permis de mettre en évidence une influence significative de l'isocaryophyllène sur l'activité de la chaîne de transport mitochondriale. En effet, l'antimycine-A n'a causé aucune diminution significative de la production de ROS en présence d'isocaryophyllène (Figure 7). Aucune évidence ne permet de suggérer que cette molécule altère la chaîne de transport des électrons.

3.5 Discussion

L'isocaryophyllène, qui a été remarquée à la fois pour sa toxicité supérieure à celle de l' α -humulène sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses ainsi que sa meilleure sélectivité, induit une surproduction de ROS mise en évidence au moyen de la DCFH-DA. La diminution de cette surproduction au moyen d'un antioxydant liposoluble capable de protéger les membranes cellulaires a aussi provoqué une diminution de la cytotoxicité de l'isocaryophyllène, laquelle semble dès lors impliquer les membranes cellulaires. L'évaluation de l'état des membranes cellulaires en présence d'isocaryophyllène a justement permis d'observer plusieurs altérations, notamment une peroxydation lipidique, mise en évidence avec le BODIPY C-11, et une perméabilisation membranaire, mise en évidence avec la calcéine-AM. Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien possible entre cette production de ROS, cette peroxydation des lipides membranaires et la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules. La vitamine E, en protégeant les membranes, peut inhiber ces altérations augmenter la survie des cellules. Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle les différentes altérations des membranes observées ont un rôle à jouer dans la cytotoxicité de l'isocaryophyllène.

Aucun résultat ne permet de conclure que la production de ROS observée ici serait liée à une réduction du GSH intracellulaire ou à une altération de la chaîne de transport mitochondriale. Cependant, des travaux préliminaires, dont les résultats ne sont pas présentés ici, ont montré que l'isocaryophyllène peut réagir directement avec l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et former un dérivé oxydé, possiblement un époxyde ou un

endoperoxyde, dérivés bien connus pour leur réactivité avec les molécules biologiques et leur toxicité [31]. Or, il a déjà été observé que l'anion superoxyde est présent en grande quantité dans certains types de cellules cancéreuses, lesquelles sont soumises à un intense stress oxydatif [32]. Il est possible que les dérivés oxydés de l'isocaryophyllène ainsi formés réagissent avec les lipides membranaires, initient une peroxydation lipidique, perméabilisent la membrane plasmique et provoquent la mort de la cellule. D'autre part, il a été montré au cours de ces mêmes travaux préliminaires que la vitamine E réagit plus rapidement avec l'anion superoxyde que l'isocaryophyllène, ce qui pourrait expliquer l'effet protecteur de la vitamine E. L'oxydation de l'isocaryophyllène par l'anion superoxyde, suivi de la formation d'un dérivé oxydé, pourrait constituer une étape nécessaire d'activation de cette molécule. Si cela se confirmait, la sélectivité de l'isocaryophyllène observée auparavant pourrait peut-être s'expliquer par la différence entre les cellules normales et les cellules cancéreuses au niveau de leur état redox. Les cellules cancéreuses sont, en effet, plus oxydantes que les cellules saines [33]. Par conséquent, les cellules cancéreuses pourraient activer l'isocaryophyllène à un degré plus élevé que les cellules saines. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse et approfondir les présentes observations sur le mécanisme d'action de l'isocaryophyllène.

3.6 Références

- [1] Ricci, D., D. Fraternal, L. Giamperi, A. Bucchini, F. Epifano, G. Burini et M. Curini; **2005**, Chemical composition, antimicrobial and antioxydant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 195-200.

- [2] Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. M. Garcia, A. Martinez, J. Caballero, A. Romo de Vivar et R. Lira; **2005**, Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 551-554.

- [3] Vila, R., M. Mundina, L. Muschietti, H. A. Priestap, A. L. Bandoni, T. Adzet et S. Canigual; **1997**, Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*, *Phytochemistry*, 46(6), 1127-1129.

- [4] Cavalieri, F., S. Mariotto, C. Fabrizi, A. C. de Prati, R. Gottardo, S. Leone, L. V. Berra, G. M. Lauro, A. R. Ciampa et H. Suzuki, **2004**, α -Bisabolol, a nontoxic natural compound strongly induces apoptosis uin glioma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 315 (3), 589-594.

- [5] Legault, J., W. Dahl, E. Debiton, A. Pichette et J.-C. Madelmont; **2003**, Antitumor activity of balsam fir oil : production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action, *Planta Medica*, 69(5), 402-407.

- [6] O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton et F. Pognan, **2000**, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-5426.

- [7] Wang, H. et J. A. Joseph; **1999**, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radical Biology & Medicine*, 27(5/6), 612-616.
- [8] Drummen, G. P., M. Makkinje, A.J. Verkley, J. A. Op den Kamp et J.A. Post; **2004**, Attenuation of lipid peroxidation by antioxidants in rat-1 fibroblasts comparison of the lipid peroxidation reporter molecules cis-parinaric acid and C-11 BODIPY (581/591) in a biological setting, *Biochimica Biophysica Acta*, 1636, 136-150.
- [9] Hoffmann, S. D. Spitkovsky, J. P. Radicella, B. Epe et R. J. Wiesner; **2004**, Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells, *Free Radical Biology & Medicine*, 36(6), 765-773.
- [10] Cuadrado, A., L. F. Garcia-Fernandez, L. Gonzalez, Y. Suarez, A. Losada, V. Alcades, T. Martinez, J. M. Fernandez-Sousa, J. M. Sanchez-Puelles et A. Munoz; **2003**, AplidinTM induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (1), 241-250.
- [11] Hedley, D. W. et S. Chow; **1994**, Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry, *Cytometry*, 15, 349-358.
- [12] Eklund, B. I., M. Edalat, G. Stenberg et B. Mannervik; **2002**, Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane, *Analytical Biochemistry*, 309, 102-108.
- [13] Kamencic, H., A. Lyon, P. G. Patterson et B. H. J. Juurlink; **1999**, Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione, *Analytical Biochemistry*, 286, 35-37.

- [14] Afri, M., A. A. Frimer et Y. Cohen; **2004**, Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer part IV : locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF, 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer, *Chemistry and Physics of Lipids*, 131, 123-133.

- [15] Yoshida, Y., S. Shimakawa, N. Itoh et E. Niki; **2003**, Action of DCFH and Bodipy as a probe for radical oxidation in hydrophilic and lipophilic domain, *Free Radical Research*, 37(8), 861-872

- [16] Chow, C. K., W. Ibrahim, Z. Wei et A. C. Chan; **1999**, Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation, *Free Radical Biology & Medicine*, 27(5/6), 580-587.

- [17] Sagach, V. F., M. Scrosati, J. Fielding, G. Rossoni, C. Galli et F. Visioli; **2002**, The water-soluble vitamin E trolox protects against ischaemia/reprfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E. *Pharmacological Research*, 45(6), 435-439.

- [18] Rémita, S; **2001**. De la peroxydation lipidique radioinduite: les facteurs determinant l'oxydabilité des lipides, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 79, 144-153.

- [19] Guzman, E. et M. A. McCrae; **2005**, A rapid and accurate assay for assessing the cytotoxicity of viral proteins, *Journal of Virological Methods*, 127, 119-125.

- [20] Hanning, J., D. Zhang, D. J. Canaday, M. A. Beckett, R. D. Astumian, R. R. Weichsekbaum et R. C. Lee; **2000**, Surfactant sealing of membranes permeabilized by ionizing radiation, *Radiation Research*, 154, 171-177.

- [21] Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota et F. Traganos; **1992**, Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry*, 13, 795-808.
- [22] Horakova, K., A. Sovcikova, Z. Seemannova, D. Syrova, K. Busanyova, Z. Drobna et M. Ferencik; **2001**, Detection of drug-induced, superoxyde-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 30(6), 650-664.
- [23] Pennington, J. D., T. J. C. Wang, P. Nguyen, L. Sun, K. Bisht, D. Smart et D. Gius; **2005**, Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy, *Drug Resistance Updates*, 8(5), 322-330.
- [24] Longley, D. B. et P. G. Johnston; **2005**, Molecular mechanisms of drug resistance, *Journal of Pathology*, 205, 275-292.
- [25] Schnelldorfer, T., S. Gansauge, F. Gansauge, S. Schlosser, H. G. Beger et A. K. Nussler; **2000**, Gluthatione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells, *Cancer*, 89, 1440-1447.
- [26] Schulz, J. B., J. Lindenau, J. Seyfried et J. Dichgans; **2000**, Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration, *European Journal of Biochemistry*, 276, 4904-4911.
- [27] Bains, J. S. et C. A. Shaw; **1997**, Neurodegenerative disorders in humans : the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain Research Reviews*, 25, 335-358.
- [28] Balendiran, G. K., R. Dabur et D. Fraser; **2004**, The role of glutathione in cancer, *Cell Biochemistry and Function*, 22, 343-352.
- [29] Cosa, G., K.-S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee et J. C. Scaiano; **2001**, Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-

stranded DNA in aqueous buffered solution, *Photochemistry and Photobiology*, 73(6), 585-599.

- [30] Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA, Carmona P., Hernandez-Munoz L, Siles E, De la Torre P., Ruiz-Cabello J, Garcia I, Solis-Heruzo JA; **2000**, Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 13 353-13361.
- [31] Clayden, J., N. Greeves, S. Warren et P. Wothers; **2001**. Organic chemistry. Oxford University Press. Oxford. 1536 p.
- [32] Zhou, Y., E. O. Hileman, W. Plunkett, M. J. Keating et P. Huang; **2003**, Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents, *Blood*, 101, 4098-4104.
- [33] Pelicano, H., D. Carney et P. Huang; **2004**, ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, *Drug Resistance Updates*, 7, 97-110.

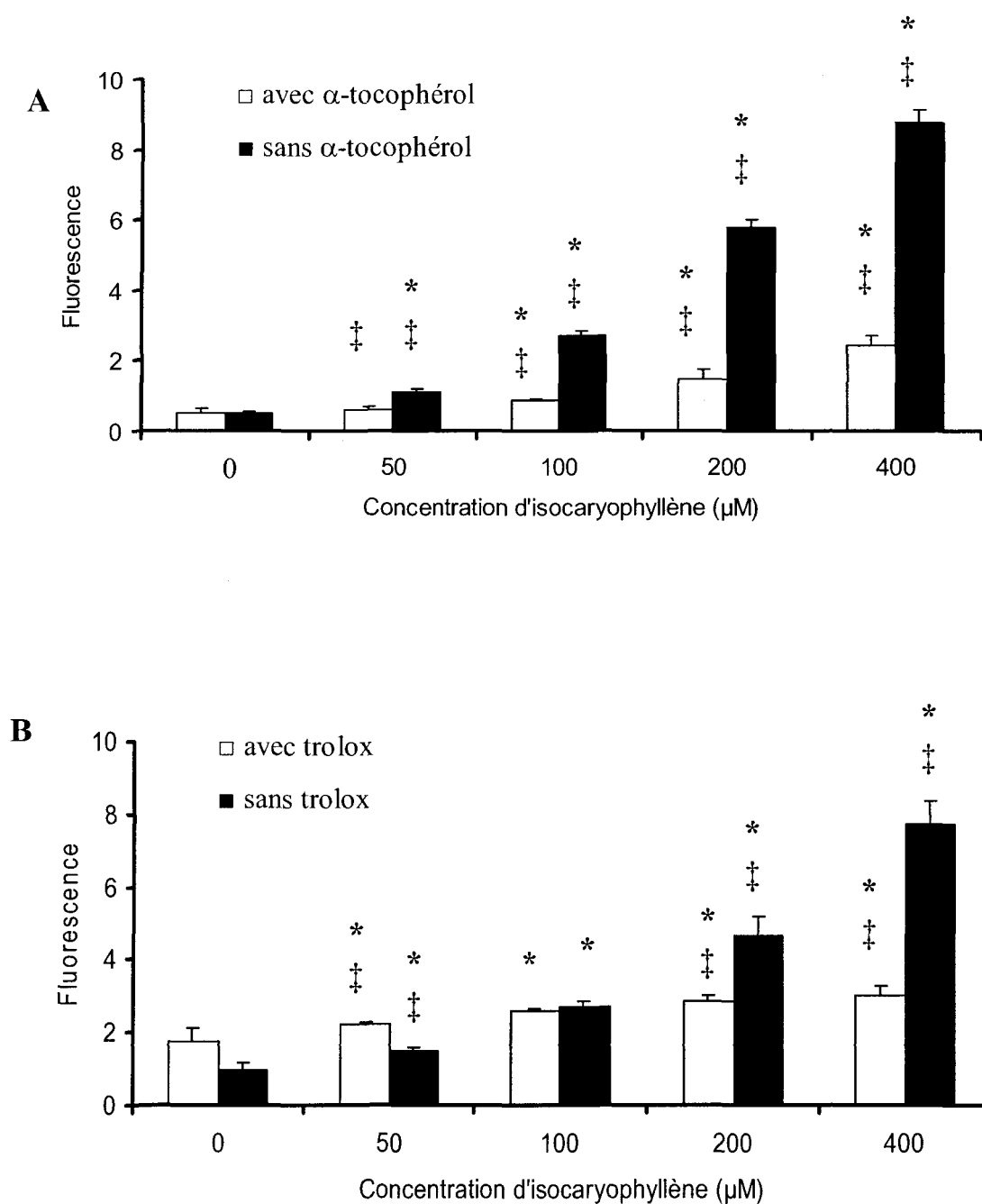


Figure 1. Effet de l'α-tocophérol (A) et du trolox (B) sur la production de ROS induite par l'isocaryophyllène. Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student. ‡ Différence significative entre les traitements avec ou sans antioxydant; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

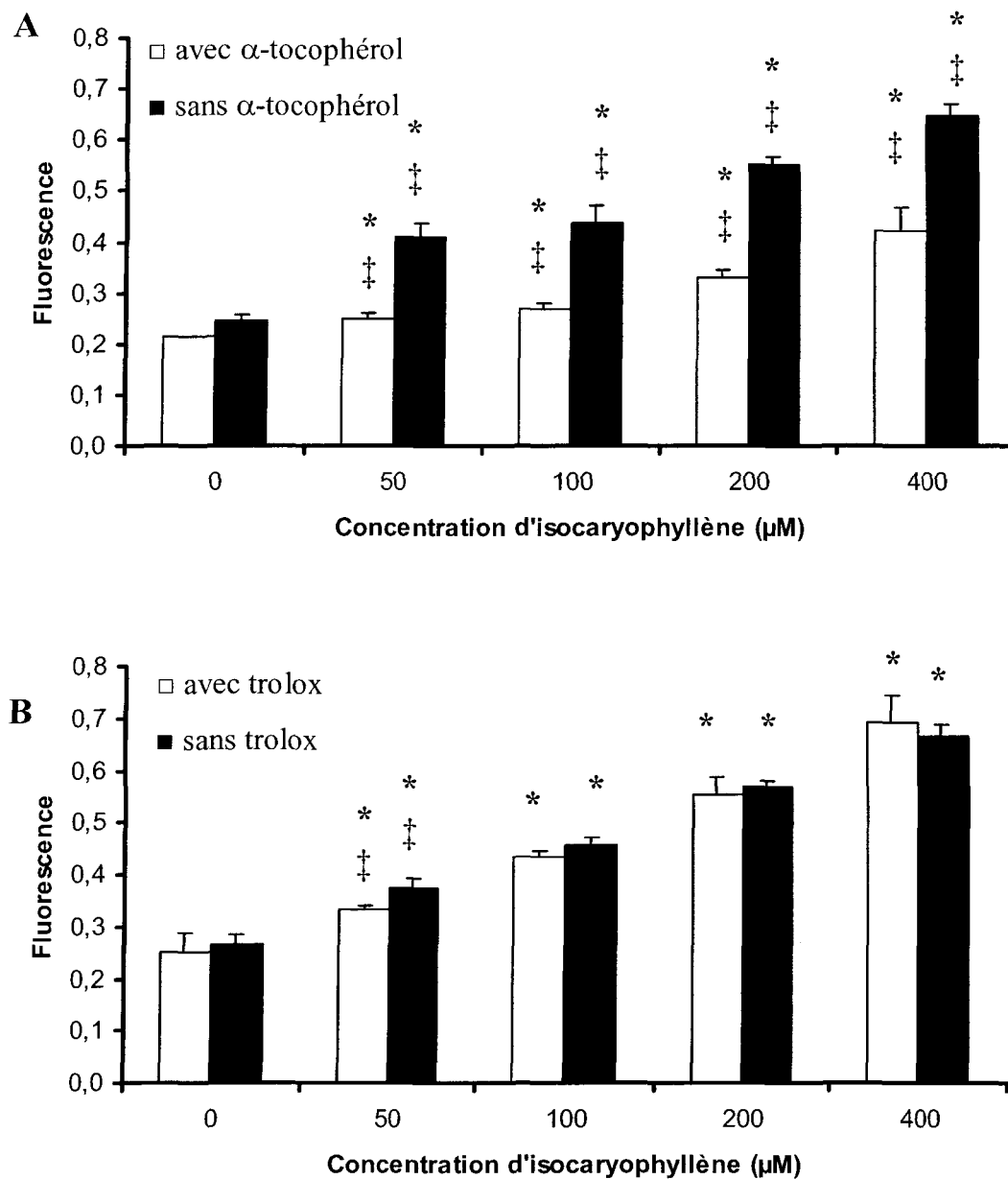


Figure 2. Effet de l' α -tocophérol (A) et du trolox (B) sur la peroxydation lipidique induite par l'isocaryophyllène (test au BODIPY C-11). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student. ‡ Différence significative entre les traitements avec ou sans antioxydant; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

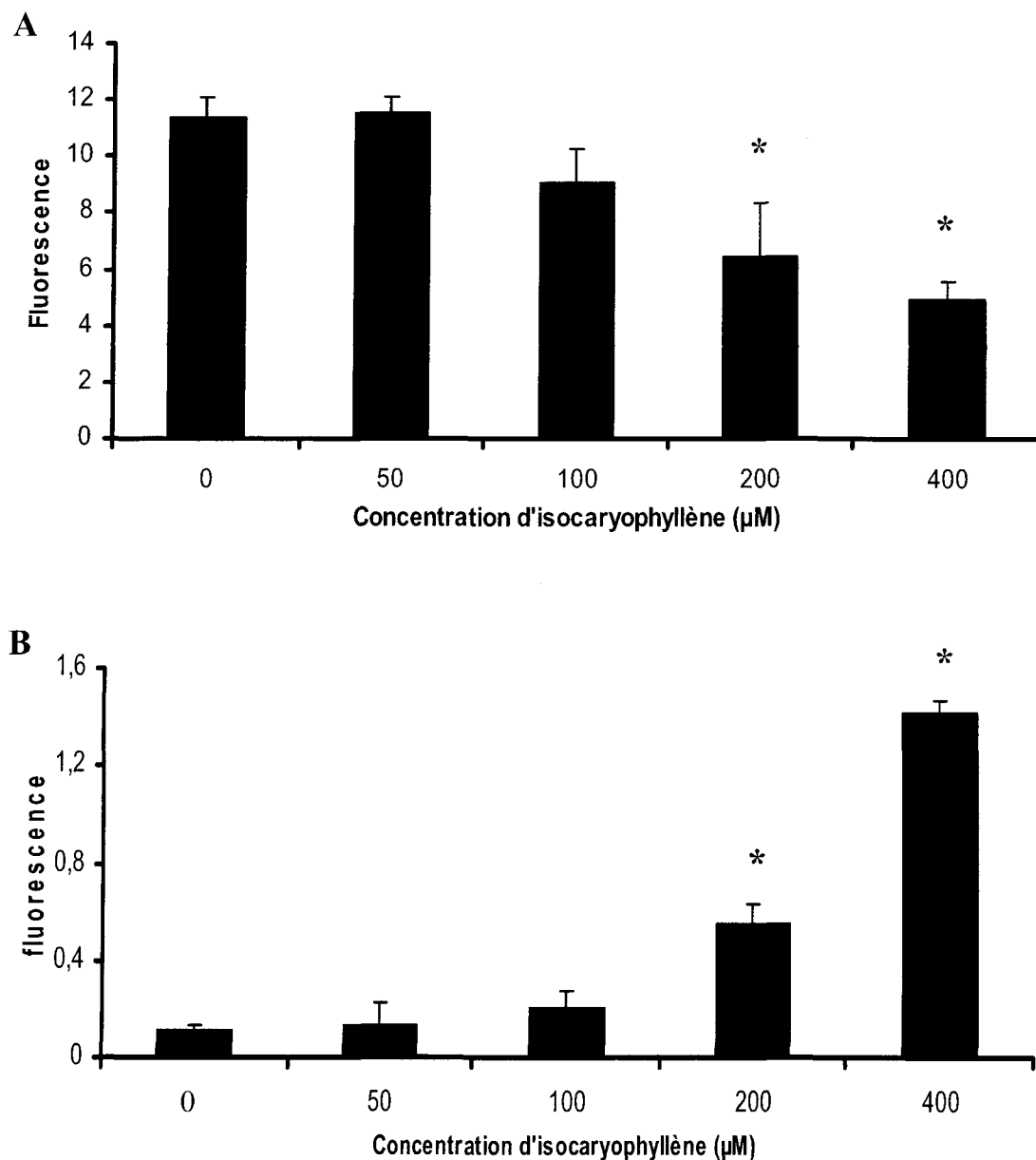


Figure 3. Perméabilisation membranaire provoquée par l'isocaryophyllène sur les cellules L-929 mesurée avec la calcéine-AM (A) et l'iodure de propidium (B). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

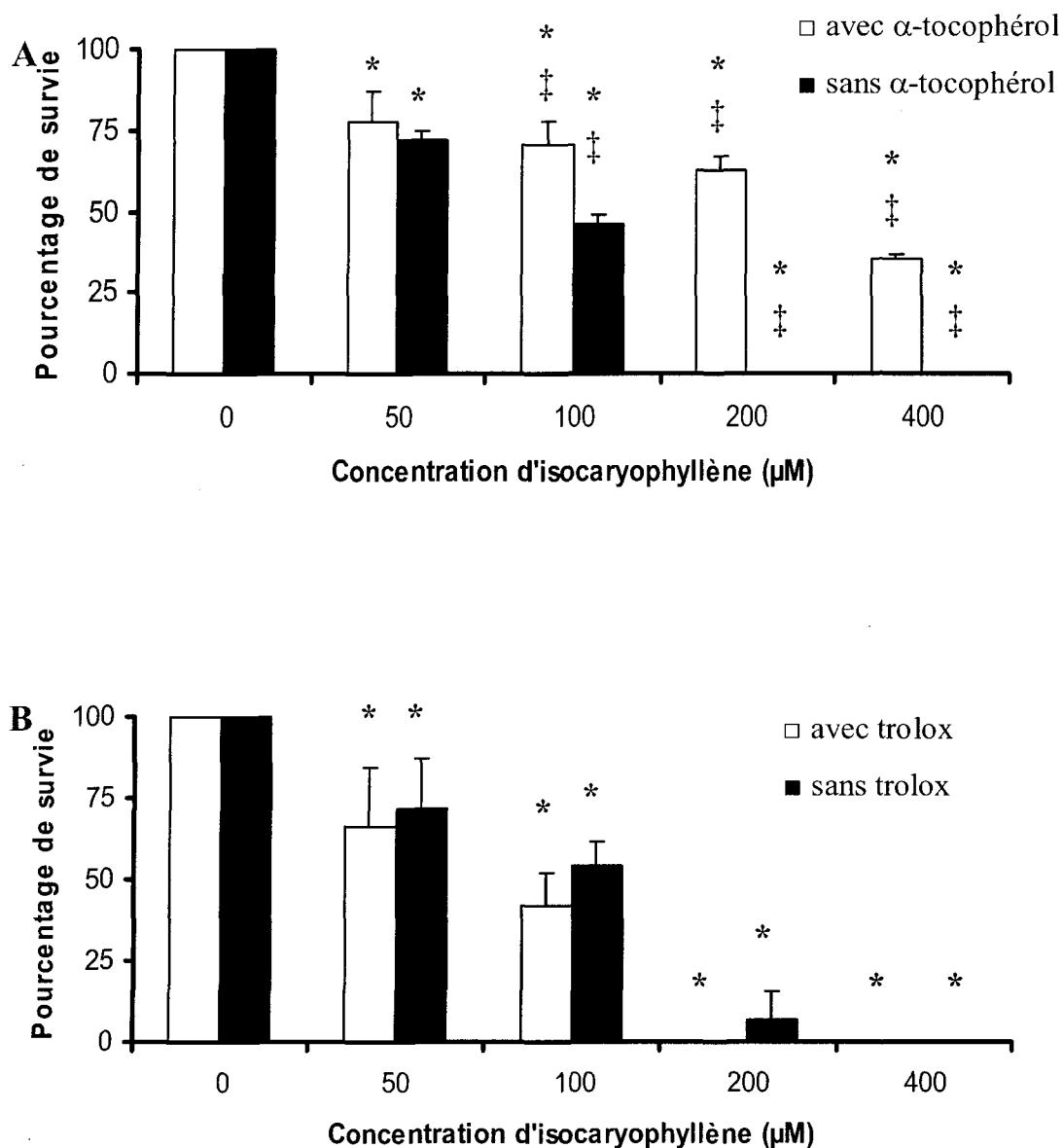


Figure 4. Effet de l'α-tocophérol (A) et du trolox (B) sur la toxicité induite par l'isocaryophyllène sur les cellules L-929 (test à la résazurine). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student. † Différence significative entre les traitements avec ou sans antioxydant; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

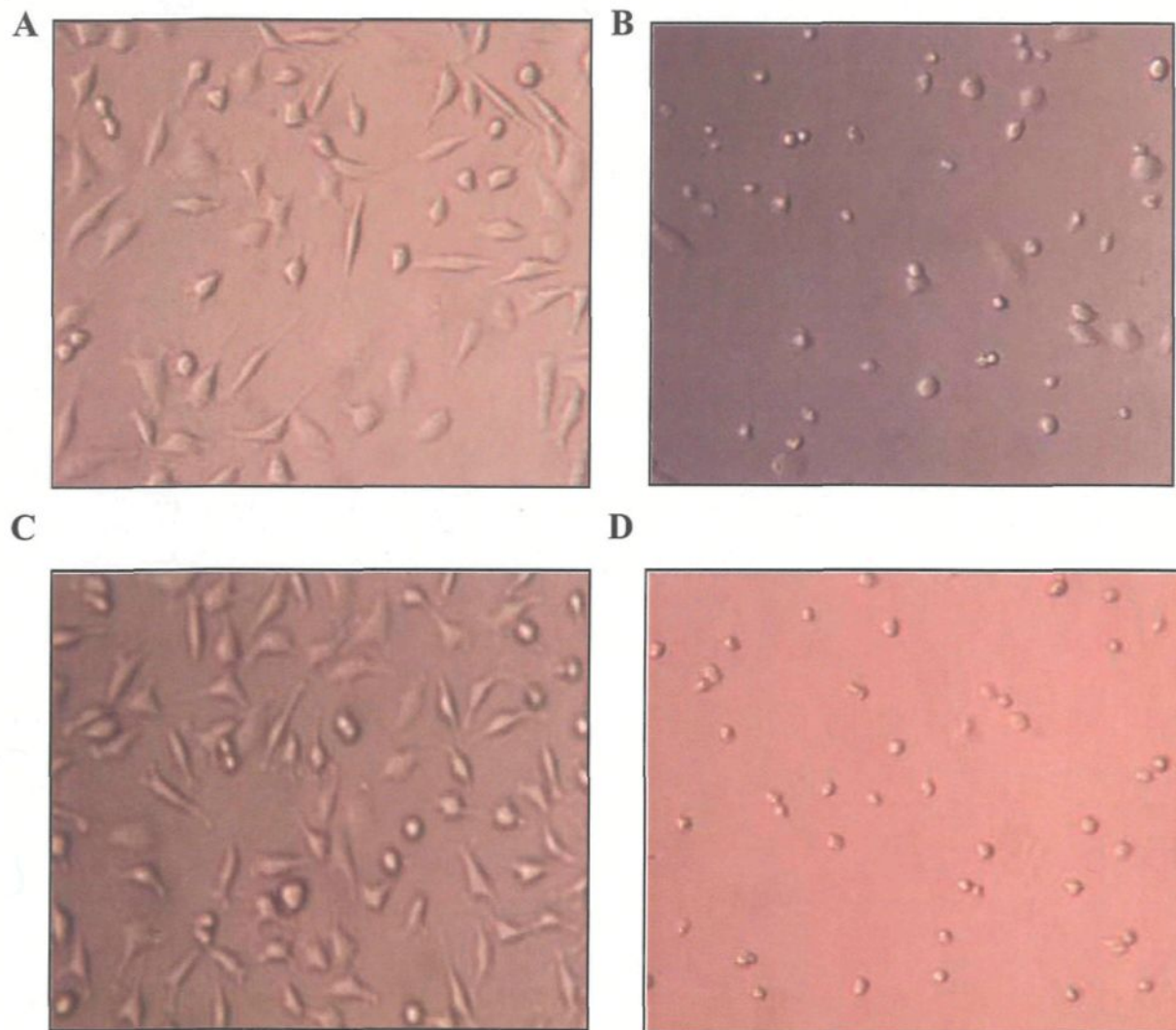


Figure 5. Cellules L-929 non-traitées (A). Cellules L-929 traitées avec l'isocaryophyllène (200 μM). (B) Cellules L-929 traitées avec l'isocaryophyllène (200 μM) et l' α -tocopherol (200 μM) (C). Cellules L-929 traitées avec l'isocaryophyllène (200 μM) et le trolox (100 μM) (D). Grossissement 200X.

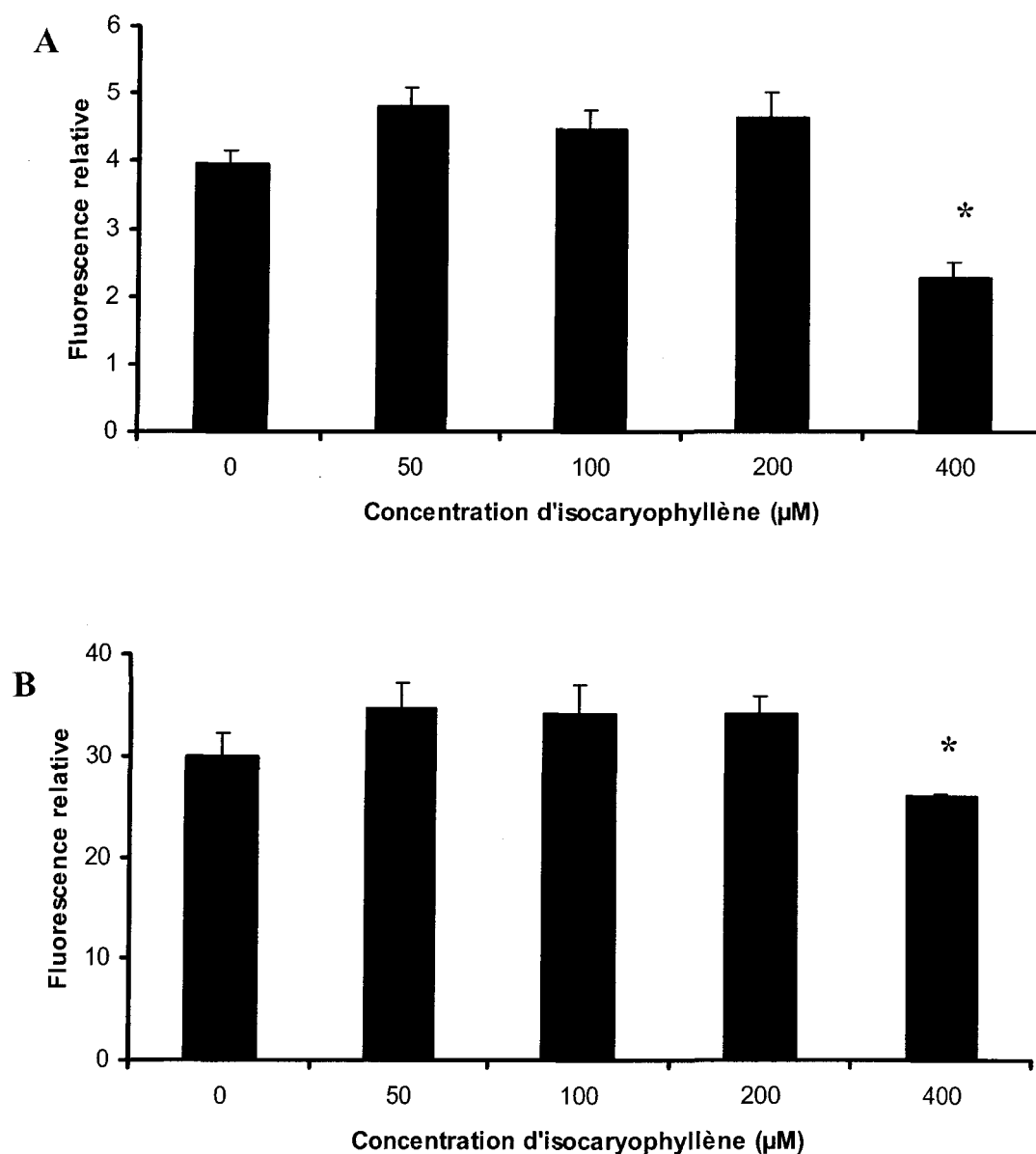


Figure 6. (A) Influence de l'isocaryophyllène sur le taux de GSH des cellules L-929 cells (test au MCB). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student. (B) Influence de l'isocaryophyllène sur la prolifération cellulaire au cours de la même expérience (test du Hoechst). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

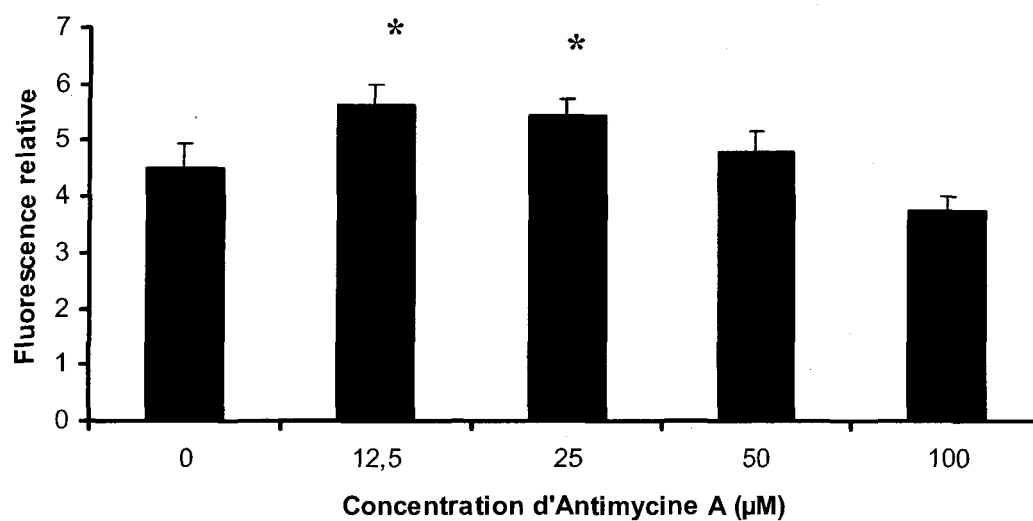


Figure 7. Effet de l'antimycine-A sur la production de ROS induite par l'isocaryophyllène (200 µM) sur les cellules L-929 (test à la DCFH-DA). Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois mesures. * Différence significative d'avec le contrôle; $P \leq 0,05$, test-t de Student.

CHAPITRE 4
CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le principal objectif du présent projet de recherche était de caractériser le mécanisme d'action expliquant la toxicité de l'isocaryophyllène envers les cellules cancéreuses. Dans un premier temps, nous avons pu déterminer, à l'aide de la DCFH-DA, qu'une production de ROS survenait en présence d'isocaryophyllène. Ensuite, au moyen du BODIPY C-11, nous avons pu observer une peroxydation lipidique, probablement associée à une perméabilisation de la membrane plasmique. Cette perméabilisation a pu être mise en évidence avec la calcéine-AM et l'iodure de propidium. Comme l'iodure de propidium est un fluorochrome souvent employé pour détecter la nécrose, il est possible qu'en présence d'isocaryophyllène les cellules-L929 meurent par nécrose plutôt que par apoptose. Cependant, cette supposition demanderait à être confirmée par d'autres expériences, par exemple par l'emploi d'autres fluorochromes susceptibles de détecter la nécrose. Également, nous pourrions effectuer une contre-vérification avec des tests permettant de détecter l'apoptose.

Les expériences avec les antioxydants ont permis de confirmer une implication, au moins partielle, des ROS dans la toxicité de la molécule. Le mécanisme de production des ROS demanderait à être caractérisé plus en détail avec de nouvelles expériences. Nous avons alors émis trois hypothèses. Premièrement, cette production pouvait résulter d'une altération de la chaîne de transport des électrons provoquée par l'isocaryophyllène. Deuxièmement, cette production pouvait être causée par l'induction d'une diminution de GSH intracellulaire, molécule importante pour le maintien d'un état redox compatible avec la vie chez la cellule cancéreuse. Troisièmement, il se pouvait que

l'isocaryophyllène elle-même soit oxydée et devienne un composé capable de réagir à la fois avec les lipides membranaires et la DCFH-DA. Nos expériences n'ont pas montré de résultats compatibles avec les deux premières hypothèses, car ni la mitochondrie et ni le GSH ne semblent impliqués dans la toxicité de la molécule. En revanche, plusieurs résultats préliminaires suggèrent que l'isocaryophyllène semble réagir avec l'anion superoxyde pour former un époxyde. Cette oxydation pourrait constituer une activation nécessaire de l'isocaryophyllène qui deviendrait ainsi toxique. De cette façon, l'isocaryophyllène pourrait former un composé capable d'oxyder les lipides membranaires, de perméabiliser les membranes plasmiques et ainsi endommager les cellules. Toutefois, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour tester cette hypothèse.

Comme perspectives pour ce travail, nous pouvons ajouter que, si l'hypothèse d'une activation par l'anion superoxyde dans des cellules soumises à un stress oxydatif élevé se confirme, nous pourrions supposer que l'isocaryophyllène semble cibler l'une des caractéristiques intéressantes des cellules cancéreuses dont nous avons parlé dans la revue de littérature : leur stress oxydatif. Ceci ferait de l'isocaryophyllène une molécule intéressante pour un traitement anticancéreux. Il serait envisageable que les cellules cancéreuses oxyderont beaucoup plus facilement l'isocaryophyllène que les cellules normales. Comme cette molécule dépendrait de cette oxydation pour devenir toxique, l'isocaryophyllène pourrait surtout être active envers les cellules cancéreuses. Il serait possible en effet que les cellules saines oxydent beaucoup moins cette molécule, laquelle serait alors moins toxique. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions examiner la

relation entre l'état redox des cellules et la toxicité de l'isocaryophyllène. Également, des comparaisons supplémentaires concernant l'état redox des cellules saines et des cellules cancéreuses, ainsi que sur la toxicité de l'isocaryophyllène envers les cellules saines et les cellules cancéreuses, seraient à accomplir. Si l'état redox parvient à expliquer la sélectivité de l'isocaryophyllène observée précédemment, l'isocaryophyllène pourrait donc ne pas être un simple antiprolifératif, comme beaucoup d'agents chimiothérapeutiques, mais un véritable agent anticancéreux. Par conséquent, un traitement chimiothérapeutique intéressant pourrait être développé à partir de cette molécule.

Également, nous avons mentionné que plusieurs espèces de plantes, comme les lamiacées, contiennent un haut taux d'isocaryophyllène [Ricci *et al.*, 2005]. Or, notre flore locale contient beaucoup de lamiacées, essentiellement des espèces introduites qui se sont acclimatées à nos contrées. Nous pouvons citer en exemple le *Teucrium canadense*, le *Teucrium occidentale* et les scutellaires (*Scutellaria lateriflora*, *Scutellaria parvula*, etc.) [Marie-Victorin, 1995]. Il serait intéressant de vérifier si l'extraction de l'isocaryophyllène à partir de ces plantes est envisageable. Si le rendement de ces extractions se révélait intéressant, nous aurions peut-être une nouvelle ressource végétale à exploiter.

BIBLIOGRAPHIE

- Appels, N. M. G. M., J. H. Beijnen et J. H. M. Schellens, **2005**, Development of Farnesyl Transferase Inhibitors : a review, *The Oncologist*, 10, 565-578.
- Bailly, C., J.-M. Barret et A. Kruczynski; **2004**, Antitumor pharmacology – Quo vadis ? *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 4, 389-391.
- Bains, J. S. et C. A. Shaw; **1997**, Neurodegenerative disorders in humans : the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain Research Reviews*, 25, 335-358.
- Balendiran, G. K., R. Dabur et D. Fraser; **2004**, The role of glutathione in cancer, *Cell Biochemistry and Function*, 22, 343-352.
- Balunas, M. J. et A. D. Kinghorn; **2005**, Drug discovery from medicinal plants, *Life Science*, 78(5), 431-441.
- Barzilai, A. et K.-I. Yamamoto; **2004**, DNA damage response to oxidative stress, *DNA Repair*, 3(8-9), 1109-1115.
- Blagosklonny, M. V.; **2004**, Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells, *Oncogene*, 23, 2967-2975.
- Blagosklonny, M. V.; **2003**, A new science-business paradigm in anticancer drug development, *Trends in Biotechnology*, 21(3), 103-106.
- Bras, M., B. Queenan et S. A. Susin; **2005**, Programmed cell death via mitochondria : different modes of dying, *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 284-293.
- Brown, N. S. et R. Bicknell; **2001**, Hypoxia and oxidative stress in breast cancer oxidative stress : its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer, *Breast Cancer Research*, 3, 323-327.

- Cook, S. J. et M. Wakelam; **2005**, The search for new targets for cancer chemotherapeutics, *Current Opinion in Pharmacology*, 5, 341-342.
- Cristea, I. M. et M. D. Espoti; **2004**, Membrane lipids and cell death : an overview, *Chemistry and Physics of Lipids*, 129, 133-160.
- Cross, S. S.; **2005**, The molecular pathology of new anti-cancer agents, *Current Diagnostic Pathology*, 11, 329-339.
- Drummen, G. P., M. Makkinje, A.J. Verkley, J. A. Op den Kamp et J.A. Post; **2004**, Attenuation of lipid peroxidation by antioxidants in rat-1 fibroblasts comparison of the lipid peroxidation reporter molecules cis-parinaric acid and C-11 BODIPY (581/591) in a biological setting, *Biochimica Biophysica Acta*, 1636, 136-150.
- Enns, G. M.; **2003**, The contribution of mitochondria to common disorders, *Molecular Genetics and Metabolism*, 80, 11-26.
- Garret, R. H. et C. M. Grisham; **2000**, Biochimie, *De Boeck Université, Bruxelles*, 1254p.
- Griffiths, A. J. F., W. M. Gelbart, J. H. Miller et R. C. Lewontin; **2001**, Analyse génétique moderne, *De Boeck Université, Bruxelles*, 676 p.
- Guillemard, V. et H. U. Saragovi; **2004**, Novel approaches for targeted cancer therapy, *Current Cancer Drug Targets*, 4, 313-326.
- Hanahan, D. et R. A. Weinberg; **2000**, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100(1), 57-70.
- Heath, G. et W. A. Colburn, **2000**, An evolution of drug development and clinical pharmacology during the 20th century, *Journal of Clinical Pharmacology*, 40, 918-929.

- Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. M. Garcia, A. Martinez, J. Caballero, A. Romo de Vivar et R. Lira; **2005**, Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 551-554.
- Hong, S. J., T. M. Dawson et V. L. Dawson; **2004**, Nuclear and mitochondrial conversations in cell death : PARP-1 and AIF signaling, *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), 259-264.
- Hsu, S., B. Singh et G. Schuster; **2003**, Induction of apoptosis in oral cancer cells : agents and mechanisms for potential therapy and prevention, *Oral Oncology*, 40, 461-473.
- Huang, J. et M. A. Philbert ; **1996**, Cellular responses of cultures cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis, *Brain Research*, 711, 184-192.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport et M. J. Shlomchik; **2003**, Immunobiologie, 2^e éd. De Boeck Université. Bruxelles. 782 p.
- Jung, K. et R. Reszka; **2001**, Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 87-105.
- Karp, G. **2004**. Biologie cellulaire et moléculaire, De Boeck Université, Bruxelles, 850 p
- Kelland, L.R.; **2005**, Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics – current status and future prospects, *European Journal of Cancer*, 41, 971-979.

- Korsloot, A., C. A. M. van Gestel et N. M. van Straalen; **2004**, Environmental stress and cellular response in arthropods, *CRC Press, États-Unis*, 197 p.
- Kubo, I., S. K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sanchez, T. Ogura, T. Saito, H. ishikawa et H. Haraguchi ; **1996**, Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*, *Planta Medica*, 62, 427-420.
- Kunick, C.; **2004**, Novel molecular targets in cancer chemotherapy waiting for discovery, *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 4, 421-423.
- Kuo, Y. H., Y. J. Kuo, A. S. Yu, M. D. Wu, C. W. Ong, L. M. Yang Kuo, J. T. Huang, C. F. Chen et S. Y. Li; **2003**, Two novel sesquiterpenes lactone, cytotoxic vernolide –A and –B from *Vernonia cinerea*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51(4), 425-426.
- La Porta, C. A. M.; **2004**, Cellular targets for anticancer strategies, *Current Drug Targets*, 5, 347-355.
- Lee, K.-H.; **2004**, Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural products leads, *Journal of Natural Products*, 67, 273-283.
- Lefèvre, G., M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle, D. Bonnefont-Rousselot, J.-P. Cristol, P. Thérond et J. Toreilles; **1998**, Évaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique, *Annales de Biologie Clinique*, 56(3), 305-319.
- Legault, J., W. Dahl, E. Debiton, A. Pichette et J.-C. Madelmont; **2003**, Antitumor activity of balsam fir oil : production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action, *Planta medica*, 69(5), 402-407

- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore et J. Darnell; **2000**, Molecular cell biology, 4^e éd., *W. H. Freeman and Company, New York*, 1084p.
- Marchini, S., M. D'Incalci et M. Brogini; **2004**, New molecules and strategies in the field of anticancer agents, *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 4, 247-262.
- Marie-Victorin; **1995**, Flore Laurentienne, 3^e éd, *Les Presses de l'Université de Montréal*, Montréal, 1093 p.
- Miyajima, A., J. Nakashima, K. Yoshioka, M. Tachibana, H. tazaki et M. Murai; **1997**, Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells, *The British Journal of Cancer*, 76, 206-210.
- Modzelewska, A., S. Sur, S. K. Kumar et S. R. Khan; **2005**, Sesquiterpenes : natural products that decrease cancer growth, *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 5, 477-499.
- Morel, Y. et R. Barouki; **1998**, Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes, *Médecine/Science*, 14, 713-721.
- Nam, N.-H. et K. Parang; **2003**, Current targets for anticancer drug discovery, *Current Drug Targets*, 4, 159-179.
- Novotny, L. et T. Szekeres; **2003**, Cancer therapy : new targets for chemotherapy, *Hematology*, 8(3), 129-137.
- Palumbo, M.; **2004**, Anticancer agents : towards the future, *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 4, 425-427.

- Pelicano, H., D. Carney et P. Huang; **2004**, ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, *Drug Resistance Updates*, 7, 97-110.
- Phillipson, J. D.; **2001**, Phytochemistry and medicinal plants, *Phytochemistry*, 56, 237-243.
- Raven, P. H., R. F. Evert et S. E. Eichhorn; **2000**, Biologie végétale, 6^e éd. De Boeck Université, Bruxelles, 944 p.
- Rémita, S.; **2001**, De la peroxydation lipidique radioinduite : les facteurs déterminant l'oxydabilité des lipides, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 79, 144-153.
- Ricci, D., D. Fraternal, L. Giamperi, A. Bucchini, F. Epifano, G. Burini et M. Curini; **2005**, Chemical composition, antimicrobial and antioxydant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 195-200.
- Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA, Carmona P., Hernandez-Munoz L, Siles E, De la Torre P., Ruiz-Cabello J, Garcia I, Solis-Heruzo JA; **2000**, Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 13 353-13361.
- Schnelldorfer, T., S. Gansauge, F. Gansauge, S. Schlosser, H. G. Beger et A. K. Nussler; **2000**, Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells, *Cancer*, 89, 1440-1447.
- Schulz, J. B., J. Lindenau, J. Seyfried et J. Dichgans; **2000**, Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration, *European Journal of Biochemistry*, 276, 4904-4911.

Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada; **2006**, Statistiques sur le cancer 2006, Toronto, 125 p.

Suzuki, S., M. Higuchi, R. J. Proske, N. Oridate, W. K. Hong et R. Lotan; **1999**, Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells, *Oncogene*, 18, 6380-6387.

Szewczyk, A. et L. Wojtczak; **2002**, Mitochondria as a pharmacological target, *Pharmacological Reviews*, 54, 101-127.

Tirmenstein, M. A., F. A. Nicholls-Grzemeski, J. G. Zhang et M. W. Fariss ; **2000**, Gluthatione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions, *Chemico-Biological Interactions*, 127, 201-217.

Tubiana, M.; **2003**, Le cancer, Presses Universitaires de France, Paris, 126 p.

Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis et M. Scoullos; **2006**, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189.

Vergani, L., M. Floreani, A. Russell, M. Ceccon, E. Napoli, A. Cabrell, L. Valente, F. Bragantini, B. Leger et F. Dabbeni-Sala; **2004**, Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines, *European Journal of Biochemistry*, 271, 3646-3656.

Vila, R., M. Mundina, L. Muschietti, H. A. Priestap, A. L. Bandoni, T. Adzet et S. Canigual; **1997**, Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*, *Phytochemistry*, 46(6), 1127-1129.

Zheng, G.-Q., P. M. Kenney, et L. K. Lam ; **1992**, Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents, *Journal of Natural Products*, 55, 999-1003.