UQAC
Université du Québec
à Chicoutimi

Étude du mécanisme biologique du (E)-β-caryophyllène pour le traitement du cancer

par Alexandre Landry

Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.) en Sciences cliniques et biomédicales

Québec, Canada

© Landry Alexandre, 2026

RÉSUMÉ

Le β-caryophyllène, un sesquiterpène bicyclique naturel, est un agoniste du récepteur CB2 (cannabinoïde 2). Plusieurs études ont montré qu'il possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antiprolifératives et anti-métastatiques, suggérant un potentiel thérapeutique en oncologie. Toutefois, son mécanisme d'action demeure largement incompris, ce qui limite son application clinique.

Cette étude vise, dans une approche exploratoire, à caractériser la réponse transcriptomique associée au BCP afin de dégager des hypothèses mécanistiques sur les voies possiblement impliquées dans ses effets anticancéreux. Le BCP étant reconnu comme un agoniste du récepteur CB2, le modèle cellulaire a été choisi en tenant compte de l'expression de ce récepteur. Le criblage de l'expression a été réalisé par PCR quantitative, immunobuvardage de type western et immunofluorescence dans différentes lignées cellulaires. Sur la base de ces analyses, la lignée MG-63 a été retenue comme modèle candidat, malgré des divergences entre l'expression génique et protéique du CB2 selon les méthodes utilisées. Des tests de cytotoxicité (résazurine et Hoechst) ont permis de sélectionner des conditions d'exposition peu cytotoxiques pour l'analyse transcriptomique. L'analyse par séquençage d'ARN a mis en évidence 7 003 gènes dont l'expression varie en fonction des variables expérimentales, dont 528 gènes candidats pourraient être associés à la présence du BCP après prise en compte du temps d'exposition. Parmi ces candidats, on observe une tendance à la baisse de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, le métabolisme du carbone et la biosynthèse du cholestérol, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de gènes liés à la réponse au stress, à l'autophagie et à l'inflammation. En raison notamment de l'absence de réplicats biologiques et de l'incertitude entourant la présence fonctionnelle du CB2 dans MG-63, ces résultats doivent être interprétés comme des pistes mécanistiques préliminaires plutôt que comme une démonstration définitive du mode d'action du BCP. Malgré ces limites, l'étude demeure pertinente puisqu'elle établit un cadre expérimental, priorise des voies biologiques à valider et oriente les futurs travaux visant à mieux comprendre l'action du BCP en contexte oncologique.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ i
TABLE DES MATIÈRES ii
LISTE DES TABLEAUX iv
LISTE DES FIGURES v
LISTE DES ABRÉVIATIONS vii
REMERCIEMENTS viii
INTRODUCTION 1
CHAPITRE 1 5
REVUE DE LITTÉRATURE 5
1.1 Propriétés physico-chimiques 5
1.2 Cibles et propriétés thérapeutiques 6
1.3 Contrôle de la douleur 8
1.4 Stress oxydatif et inflammation 10
1.5 Application du BCP pour le traitement du cancer 17
1.6 Biodisponibilité 23
1.7 Toxicité du BCP 24
CHAPITRE 2 26
RÉSULTATS 26
2.1 Amarrage moléculaire 26
2.2 qPCR 28
2.3 Immunobuvardage de type western 29
2.4 Détection par immunofluorescence 31
2.5 Choix du modèle cellulaire 32
2.6 Cytotoxicité sur modèle cellulaire 33
2.7 Transcriptome 37
CHAPITRE 3 47
DISCUSSION 47
3.1 Amarrage moléculaire 47
3.2 qPCR 48
3.3 Immunobuvardage de type western 50
3.4 Immunofluorescence 50
3.5 Choix du modèle cellulaire 51
3.6 Cinétique 53
3.7 Transcriptome 54
CHAPITRE 4 62
MATÉRIELS ET MÉTHODES 62
4.1 Analyse d'amarrage moléculaire entre le BCP et le récepteur CB2 62
4.2 Culture cellulaire 62
4.3 Détection du récepteur CB2 par PCR quantitative 63
4.4 Détection de l'expression du récepteur CB2 par immunobuvardage de type western 65
4.5 Immunofluorescence 66

4.6 Cinétique du BCP sur le modèle cellulaire 67
4.7 Analyses statistiques 68
4.8 Détermination de l'effet du BCP sur l'expression des gènes par ILLUMINA RNA-seq 69
CONCLUSION 72
LISTE DE RÉFÉRENCES 73
ANNEXE 1 84
ANNEXE 2 85
ANNEXE 3 86
ANNEXE 4 87
ANNEXE 5 88
ANNEXE 6 89

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. ÉNERGIE DE LIAISON ENTRE LES LIGANDS ET LE RECEPTEUR CB2 5ZTY ET 6PT0 AYANT UNE RESOLUTION DE 2,8 Å ET 3,2 Å RESPECTIVEMENT. 26
TABLEAU 2. CONCENTRATIONS EN NG/µL AINSI QUE RAPPORTS DE PURETE 260/280 OBTENUS PAR NANODROP. 28
TABLEAU 3. CONCENTRATION EN µG/ML DE PROTEINES DE CHAQUE ECHANTILLON MESURE PAR DOSAGE BCA. 30
TABLEAU 4. VALEURS DES IC20, IC50 ET IC90 (MOYENNE ± ECART-TYPE) POUR CHAQUE TEMPS D'EXPOSITION AU BCP, CALCULEES A PARTIR DES DONNEES DE CYTOTOXICITE OBTENUES AVEC LE TEST DE RESAZURINE. 36
TABLEAU 5. VALEURS DES IC20, IC50 ET IC90, (MOYENNE ± ECART-TYPE) POUR CHAQUE TEMPS D'EXPOSITION AU BCP, CALCULEES A PARTIR DES DONNEES DE CYTOTOXICITE OBTENUES AVEC LE TEST DE HOECHST. 36
TABLEAU 6. CONCENTRATION EN NG/µL ET NUMERO D'INTEGRITE DE L'ARN EXTRAIT POUR CHAQUE CONDITION TESTEE. 37
TABLEAU 7. TAILLE ET CONCENTRATIONS DES FRAGMENTS ISSUS DE LA PREPARATION DES LIBRAIRIES A L'AIDE DES SEQUENCES ADAPTATRICES NEXTERA (ILLUMINA)... 38
TABLEAU 8. METRIQUES D'ALIGNEMENT ET D'ANNOTATIONS DES FRAGMENTS POUR LES 10 ECHANTILLONS. 39
TABLEAU 9. TABLES DE COMPTES DE TRANSCRITS GENIQUES PRESENTANT DES VARIATIONS D'EXPRESSION SELON LES COMPARAISONS REALISEES. 42
TABLEAU 10. LISTE DE CELLULES UTILISEES, INCLUANT LE TYPE CELLULAIRE, LEUR ADHERENCE, LEUR NUMERO D'IDENTIFICATION ATCC AINSI QUE LES CONCENTRATIONS DE SERUM DE VEAU FŒTAL REQUISES POUR LEUR CROISSANCE. 63
TABLEAU 11. LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR L'ANALYSE QPCR AINSI QUE LEUR PROVENANCE. 64
TABLEAU 12. INFORMATIONS RELATIVES AUX ANTICORPS UTILISES. 66

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. STRUCTURE DU B-CARYOPHYLLENE (1), DE SON ISOMERE, L'ISO-CARYOPHYLLENE (2), DE L'OXYDE DE B-CARYOPHYLLENE (3) ET D'UN HYDROPEROXYDE DU B-CARYOPHYLLENE (4)..... 5
FIGURE 2. SCHEMA DU MECANISME PLAUSIBLE DE L'ACTIVITE ANTINOCICEPTIVE DU BCP SUR DES KERATINOCYTES HACAT (GAO ET AL.) 10
FIGURE 3. SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME ANTIOXYDANT THEORIQUE DU BCP CHEZ DES CELLULES SAINES, BASE SUR LA LITTERATURE (CALLEJA *ET AL.* 2013; HASHIESH *ET AL.* 2024; RATHOD ET AGRAWAL 2025). 13
FIGURE 4. SCHEMA PROBABLE DU MODE D'ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE DU BCP (CABRAL ET GRIFFIN-THOMAS 2009; RAKOTOARIVELO *ET AL.* 2024)..... 17
FIGURE 5. SCHEMA DU MECANISME D'ACTION DU BCP POUR SON ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE ET ANTI-ANGIOGENIQUE (ELLERT-MIKLASZEWSKA ET AL. 2005; OKKENHAUG ET AL. 2016; SONG ET AL. 2023; RAKOTOARIVELO ET AL. 2024). 19
FIGURE 6. MECANISME PROBABLE MENANT A UNE ACTIVITE SYNERGIQUE ENTRE DES MEDICAMENTS ANTITUMORAUX ET LE BCP (CABRAL ET GRIFFIN-THOMAS 2009; ABDIN ET AL. 2021)..... 22
FIGURE 7. REPRESENTATION DES INTERACTIONS CLES ISSUES DE L'AMARRAGE MOLECULAIRE. A) 5ZTY-BCP, B) 5ZTY-AM630, C) 5ZTY-2-AG, D) 5ZTY-WIN55,212-2, E) 6PT0-BCP, F) 6PT0-AM630, G) 6PT0-2-AG, H) 6PT0-WIN55,212-2. 27
FIGURE 8. CONFORMATIONS TRIDIMENSIONNELLES LES PLUS STABLES DES COMPLEXES LIGAND-RECEPTEUR ISSUS DE L'AMARRAGE MOLECULAIRE. A) 5ZTY-BCP, B) 5ZTY-AM630, C) 5ZTY-2-AG, D) 5ZTY-WIN55,212-2, E) 6PT0-BCP, F) 6PT0-AM630, G) 6PT0-2-AG, H) 6PT0-WIN55,212-2. 27
FIGURE 9. BOITES A MOUSTACHES REPRESENTANT L'EXPRESSION RELATIVE DU GENE CNR2 PAR LA METHODE ΔΔ CT UTILISANT LE GENE DE REFERENCE TBP AINSI QUE LA LIGNEE CELLULAIRE MDA-MB-231 COMME CALIBREUR. LES COMPARAISONS SIGNIFICATIVES PAR TEST DE POST HOC DE TUKEY * P < 0,05 SONT INDIQUEES A L'AIDE D'UN ASTERISQUE..... 29
FIGURE 10. DETECTION DES BANDES PAR CHIMILUMINESCENCE A LA SUITE DE L'IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN..... 30
FIGURE 11. EXPRESSION RELATIVE MOYENNE DU RECEPTEUR CB2 AINSI QUE LA DEVIATION STANDARD CALCULEE EN UTILISANT LA LIGNEE CELLULAIRE HL-60 COMME CALIBREUR. LES COMPARAISONS SIGNIFICATIVES PAR TEST DE POST HOC DE TUKEY * P < 0,05 SONT INDIQUEES A L'AIDE D'UN ASTERISQUE. 31
FIGURE 12. DETECTION DU RECEPTEUR CB2 PAR IMMUNOFLUORESCENCE POUR LES LIGNEES HEPG2, HL-60, JURKAT, MCF7, MG-63 ET WS1. 32
FIGURE 13. COURBES DE REPONSE DOSE-DEPENDANTE AU BCP MESUREES PAR LE TEST DE RESAZURINE POUR DIFFERENTS TEMPS D'EXPOSITION. LES COURBES ONT ETE AJUSTEES SELON UN MODELE LOG-LOGISTIQUE A CINQ PARAMETRES, AVEC DES BORNES MINIMALE ET MAXIMALE FIXEES RESPECTIVEMENT A 0 ET 100. 34
FIGURE 14. COURBES DE REPONSE DOSE-DEPENDANTE AU BCP MESUREES PAR LE TEST DE HOECHST POUR DIFFERENTS TEMPS D'EXPOSITION. LES COURBES ONT ETE AJUSTEES SELON UN MODELE LOG-LOGISTIQUE A CINQ PARAMETRES, AVEC DES BORNES MINIMALE ET MAXIMALE FIXEES RESPECTIVEMENT A 0 ET 100. 35
FIGURE 15. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES REALISEE A PARTIR DES 500 COMPTES GENIQUES LES PLUS VARIABLES PARMI LES 10 ECHANTILLONS. LES LETTRES INDIQUENT LA CONCENTRATION EN BCP (A : 0 µM, B : 25 µM, C : 50 µM ET D : 100 µM), TANDIS QUE LES CHIFFRES CORRESPONDENT AU TEMPS D'EXPOSITION (1 : 1 H, 2 : 3 H ET 3 : 24 H). 40
FIGURE 16. REGROUPEMENT HIERARCHIQUE DES 50 GENES PRESENTANT LA PLUS GRANDE VARIABILITE D'EXPRESSION, REALISE A PARTIR DES COMPTES BRUTS DES ECHANTILLONS. LES LETTRES INDIQUENT LA CONCENTRATION EN BCP (A : 0 µM, B :

25 µM, C : 50 µM ET D : 100 µM), TANDIS QUE LES CHIFFRES CORRESPONDENT AU TEMPS D'EXPOSITION (1 : 1 H, 2 : 3 H ET 3 : 24 H). 41
FIGURE 19. GRAPHIQUES DE TENDANCE ILLUSTRANT LA RELATION DE MONOTONICITE POUR LES 12 GENES PRESENTANT UN COEFFICIENT DE CORRELATION DE SPEARMAN (P) SUPERIEUR A 0,9 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN BCP.... 45
FIGURE 20. EXPRESSION DU GENE CNR2 (VALEURS LOG2) POUR LES LIGNEES HL-60, JURKAT, MCF7, MDA-MB-231, HEPG2 ET MG-63, SELON LES DONNEES PUBLIQUES DEPMAP (25Q2). 49
FIGURE 21. RESEAU STRING DES GENES SOUS-EXPRIMES IDENTIFIES PAR L'ANALYSE DIFFERENTIELLE CORRIGEE POUR LE TEMPS. 58
FIGURE 22. RESEAU STRING DES GENES SUREXPRIMES IDENTIFIES PAR L'ANALYSE DIFFERENTIELLE CORRIGEE POUR LE TEMPS. 59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCP	(E)-β-caryophyllène
BCPO	Oxyde de β-caryophyllène
CB2	Récepteur cannabinoïde 2
CNR2	Gène codant pour le récepteur cannabinoïde 2
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxisomes
ECS	Système endocannabinoïde
CB1	Récepteur cannabinoïde 1
IC	Concentration inhibitrice

REMERCIEMENTS

Il m'est particulièrement important d'exprimer ma gratitude envers ceux et celles qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire. Ce travail est le fruit d'un accompagnement, de conseils, d'encouragements et de moments partagés qui m'ont permis de finir ce travail. Je souhaite donc remercier sincèrement toutes les personnes qui ont rendu cette aventure possible et enrichissante.

J'aimerais ainsi commencer par remercier mes directeurs Jean Legault, André Pichette et Marie-Claude Sincennes de m'avoir confié cette mission et d'avoir partagé leur savoir. Cette maîtrise m'a permis d'apprendre à mieux persévérer et d'innover surtout lorsque les résultats ne sont pas ceux espérés !

Également, je ne peux pas oublier mes collègues de laboratoire Catherine Dussault, Karl Girard-Lalancette, Laurie Girard et Paul Gormand qui ont su rendre l'expérience amusante en plus d'être enrichissante.

Je remercie mes amis avec lesquels j'ai passé du temps agréable les midis à partager nos problèmes et échanger nos idées.

Je voudrais également remercier ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes projets personnels.

Finalement, je ne peux pas oublier Marie-Lee Audet qui m'accompagne et me soutient dans chacune des épreuves auxquelles j'ai fait face depuis que l'on se connaît.

MERCI !

INTRODUCTION

Au Canada, les statistiques de 2021 prévoient qu'environ 40 % de la population recevra un diagnostic de cancer au cours de sa vie et parmi ces cas 25 % succomberont à la maladie (Canadian Cancer Society *et al.* 2021). Cette maladie engendre, par ailleurs, un fardeau économique important pour le système de santé canadien s'élevant à 26,2 milliards de dollars en 2021 dont 30 % sont pris en charge directement par les patients et leurs familles (Brenner *et al.* 2024). Ces enjeux découlent directement de la nature complexe de la maladie. En effet, le cancer n'est pas une seule maladie causant la prolifération anormale de cellules cancéreuses, mais plutôt un ensemble regroupant plusieurs types de cancers. L'hétérogénéité des cancers est une des raisons pour lesquelles cette maladie est si difficile à traiter. Cependant, l'hétérogénéité du cancer ne se limite pas seulement au niveau intertumoral, mais il existe des différences marquées au sein d'une même tumeur et qui évoluent dans le temps (Dagogo-Jack et Shaw 2018). Cette caractéristique de la maladie fait en sorte qu'une approche nuancée pour les traitements est nécessaire, puisque la réponse à un traitement peut varier grandement pour différents cancers (Stratton *et al.* 2009). Par exemple, les cancers du sein n'exprimant pas les récepteurs hormonaux et le récepteur HER2, appelés triple négatifs, sont associés à un pronostic défavorable puisqu'ils ne répondent pas aux traitements hormonaux ni aux thérapies visant le récepteur HER2 (Won et Spruck 2020). Ainsi, pour remédier à ce problème, il est important d'adopter une approche de médecine personnalisée en visant un traitement adapté au phénotype spécifique à chaque cancer.

Dans cette optique, la chimiothérapie ciblée est une approche particulièrement prometteuse, car elle permet d'attaquer des cibles qui sont spécifiques aux cellules tumorales (Lee *et al.* 2018). Pour constituer une bonne cible thérapeutique, celle-ci doit jouer un rôle dans la modulation d'au moins une des sept caractéristiques distinctives du cancer, soit la prolifération cellulaire, la reconnaissance au stress, la vascularisation, l'invasion et la métastase, le métabolisme, le microenvironnement tumoral et la modulation immunitaire (Fouad et Aanei 2017). La chimiothérapie ciblée est d'autant

plus pertinente, car les médicaments anticancéreux sont souvent non spécifiques et peuvent également affecter les cellules saines, entraînant des effets secondaires variés. L'atténuation des effets secondaires représente un enjeu pour les patients et les cliniciens puisqu'ils ont un effet direct sur les symptômes, la qualité de vie des patients. De plus, ils peuvent entraîner une réduction de l'intensité du traitement, voire son interruption, ce qui peut augmenter le risque de récidive (Lustberg *et al.* 2023). Par exemple, le paclitaxel, couramment utilisé pour le traitement de plusieurs cancers tels que le cancer du sein, des ovaires et du poumon, peut causer une myélosuppression ainsi qu'une neuropathie périphérique qui est corrélée avec un résultat clinique défavorable (Marupudi *et al.* 2007).

Le système endocannabinoïde (ECS) constitue une cible de choix dans le traitement du cancer, puisque des altérations de ce système sont observées dans de nombreuses tumeurs et que ces altérations semblent contribuer à la croissance tumorale (Fraguas-Sanchez *et al.* 2018; Laezza *et al.* 2020). Dans l'ECS, on trouve le récepteur cannabinoïde 2 (CB2), qui représente une cible prometteuse, car certains agonistes de ce récepteur ont démontré des activités antiprolifératives, anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et de modulation métabolique (Velasco *et al.* 2016). Par ailleurs, la surexpression de ce récepteur a été observée chez plusieurs types de cancers tels que les cancers du sein (Song *et al.* 2023), du poumon non à petites cellules (Xu *et al.* 2019), du côlon (Iden *et al.* 2023), les ostéosarcomes (Punzo *et al.* 2017) et les hépatocarcinomes (Xu *et al.* 2006). Dans certains cas la surexpression du récepteur est associée à des cancers plus agressifs (Martinez-Martinez *et al.* 2015; Sarsembayeva *et al.* 2022). Actuellement, nos connaissances sur le rôle du CB2 et de son implication dans la physiopathologie du cancer sont limitées.

Le (E)-β-caryophyllène (BCP) est un agoniste sélectif du récepteur CB2, suscitant un intérêt particulier pour ses propriétés biologiques variées observées dans de multiples études *in vivo* et *in vitro*. Notamment, des études indiquent que ce composé participe au contrôle de la douleur, de la prolifération cellulaire, à la gestion de la dépendance aux substances, à la modulation de l'inflammation et du stress oxydatif et du métabolisme (Hashiesh *et al.* 2021). Plusieurs études ont montré un effet de potentialisation de l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques anticancéreux ainsi

que l'inhibition de pompes à efflux impliquées dans la résistance au traitement telles que la P-gp (Legault et Pichette 2007; S *et al.* 2017; Di Sotto *et al.* 2020b). Dans une optique de traitements anticancéreux, son application comme adjuvant serait particulièrement attrayante puisqu'elle pourrait potentiellement réduire des effets secondaires par modulation de l'inflammation et du stress oxydatif, qui sont caractéristiques du microenvironnement des tumeurs (Reuter *et al.* 2010), par le contrôle de la douleur ainsi que par son activité potentialisatrice.

En dépit des nombreuses études réalisées sur le BCP, le mécanisme d'action reste inconnu. En effet, les connaissances sur le mode d'action du BCP sont limitées à son rôle d'agoniste du CB2, aux possibles cascades de signalisation activées telles que PI3K/AKT, MAPK/ERK et aux possibles cibles telles que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) (Hashiesh et al. 2021). Or, le mécanisme d'action est un aspect important à élucider, car il peut fournir des pistes sur les effets secondaires possibles, permettre d'optimiser les doses, faciliter le développement d'études cliniques par la sélection de patients susceptibles de répondre au médicament et mener à une meilleure compréhension des pathologies (Davis 2020). Ces informations sont d'autant plus importantes lorsque des études phénotypiques ont été réalisées et que des propriétés thérapeutiques ont été associées aux molécules à l'aide d'études *in vitro* et *in vivo* (Wagner et Schreiber 2016).

À la lumière de ces connaissances, le BCP semble être un composé prometteur à développer pour la chimiothérapie combinée en tant que chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante pour améliorer l'efficacité des traitements, réduire leurs effets secondaires, et inhiber la résistance des cellules cancéreuses. Or, l'insuffisance des données sur son mode d'action limite son utilisation.

Ainsi, cette recherche vise à caractériser de manière exploratoire la réponse cellulaire au BCP dans un modèle humain de cancer, afin de générer des hypothèses mécanistiques. Pour atteindre ce but, trois sous-objectifs ont été définis. Premièrement, le choix d'un modèle cellulaire approprié est nécessaire. Ce modèle devait idéalement être cancéreux, de nature humaine et présenter une expression compatible avec la présence du récepteur CB2. Deuxièmement, une caractérisation de

la cytotoxicité du composé sur le modèle a permis d'établir les temps d'exposition et les concentrations de BCP pour le dernier sous-objectif. Cette étape était cruciale afin de réduire le risque de confondre une réponse spécifique au composé avec une réponse secondaire à la mort cellulaire. Finalement, l'effet global du BCP sur le transcriptome a été évalué par RNA-seq afin d'identifier des gènes et des voies biologiques candidats. Cette approche permet de prioriser des pistes rationnelles pour des validations ultérieures et d'élargir les connaissances sur l'application potentielle du BCP en oncologie.

CHAPITRE 1
REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Propriétés physico-chimiques

Le BCP, un sesquiterpène bicyclique comprenant un cyclobutane et un cycle à 9 carbones a la formule $C_{15}H_{24}$. Il s'agit d'un liquide huileux transparent qui tend vers le jaune (O'Neil et al. 2013). Étant donné sa nature terpénique, le BCP est susceptible de réagir avec des agents oxydants pour former des terpénoïdes. En effet, le BCP s'oxyde rapidement lorsqu'il est exposé à l'air pour former l'oxyde de β-caryophyllène (BCPO) et peut même former des hydroperoxydes par photo-oxydation (Skold et al. 2006) (Figure 1). Cette propriété chimique du BCP nécessite donc de prendre des mesures afin d'éviter son oxydation et sa dégradation.

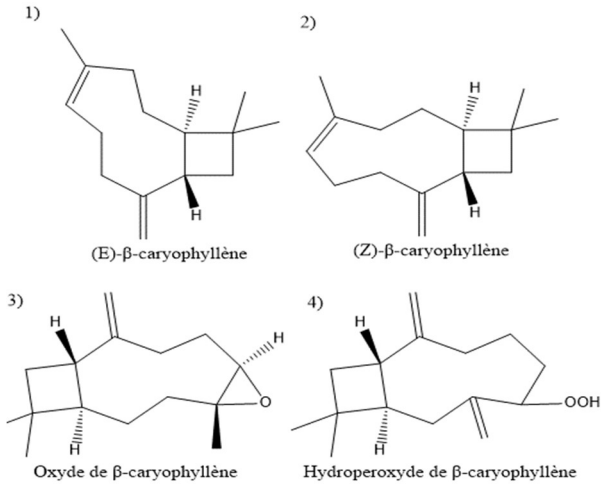

Figure 1. Structure du β-caryophyllène (1), de son isomère, l'iso-caryophyllène (2), de l'oxyde de β-caryophyllène (3) et d'un hydroperoxyde du β-caryophyllène (4).

Le BCP a un point d'ébullition se situant entre 256 et 259 °C et un point de fusion inférieur à 25 °C. Cette molécule est très peu soluble dans l'eau avec une solubilité de 0,05011 mg/mL à 25 °C (O'Neil

et al. 2013). Cette caractéristique du BCP pourrait influencer sa biodisponibilité puisque l'absorption par voie orale est plus efficace pour les composés miscibles dans l'eau (Savjani et al. 2012).

1.2 Cibles et propriétés thérapeutiques

Dans la littérature, on décrit que le BCP possède une multitude de propriétés thérapeutiques qui ont été découvertes par des études *in vitro* et *in vivo*. Entre autres, on lui associe des effets bénéfiques dans le traitement de dépendance aux drogues, des propriétés antibactériennes, des propriétés métaboliques, une activité antioxydante et anti-inflammatoire ainsi que de multiples applications en oncologie (Di Sotto *et al.* 2020a; Hashiesh *et al.* 2021; Baradaran Rahimi et Askari 2022). Or, les propriétés thérapeutiques sont causées par l'interaction entre une molécule et leurs cibles biologiques. Ainsi, la polyvalence pharmaceutique du BCP devrait s'expliquer par les cibles thérapeutiques touchées par celle-ci. Parmi celles-ci, le BCP serait un agoniste sélectif du récepteur CB2. Cette association a été évaluée par simulation d'amarrage moléculaire, essai de dissociation moléculaire ainsi que par des tests sur des souris knock-out du gène CNR2 codant pour ce récepteur (Gertsch *et al.* 2008). Le récepteur CB2 fait partie des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). Il est normalement retrouvé en périphérie des cellules immunitaires, de la rate, les cellules dérivées des macrophages ainsi que dans le tronc cérébral et les neurones pyramidaux Ca2/3 de l'hippocampe (Bie *et al.* 2018). L'expression de ce récepteur a également été signalée dans plusieurs types de tumeurs (Fraguas-Sanchez *et al.* 2018). Le récepteur CB2 fait partie du système endocannabinoïde qui est impliqué dans une variété de processus physiologiques. Contrairement au récepteur CB1, le CB2 ne possède pas d'effet psychotrope ce qui est un avantage dans le traitement de maladies (Bie *et al.* 2018). L'activation du récepteur CB2 entraîne l'activation de diverses voies de signalisation ce qui en fait une cible pour plusieurs pathologies telles que le cancer, dépendance aux drogues, maladies inflammatoires, des maladies neurodégénératives et davantage (Bie *et al.* 2018; Mohamed *et al.* 2022).

Il existe un lien entre l'activité thérapeutique des cannabinoïdes,incluant le BCP, et et les PPARs (Iannotti et Vitale 2021; Lago-Fernandez et al. 2021). Les PPARs sont des facteurs de transcription nucléaires faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. À cet effet, ils se retrouvent dans le cytoplasme sous forme inactive et subissent une translocation nucléaire lorsqu'ils se lient à un ligand où ils vont réguler la transcription de certains gènes (Villapol 2018). On retrouve 3 sous-types de PPARs soit PPARα, PPARγ et PPAR β/δ qui sont impliqués dans le métabolisme énergétique, l'inflammation, la croissance et la différenciation cellulaire et l'apoptose (Lago-Fernandez et al. 2021). Chaque sous-type a un profil d'expression qui diffère selon le tissu. PPARα se retrouve principalement dans le foie, mais également dans les muscles, le cœur et les os en petite quantité. PPARβ/δ est omniprésent dans le corps alors que PPARγ a plusieurs isoformes qui sont exprimées différemment dans le corps. Son isoforme 1 est omniprésent dans le corps, l'isoforme 2 se retrouve dans les tissus adipeux, l'isoforme 3 est exprimé dans les macrophages et l'isoforme 4 est retrouvé dans les cellules endothéliales (Tyagi et al. 2011). Le BCP semble impliquer spécifiquement deux sous-types, soit PPARα et PPARγ (Lago-Fernandez et al. 2021). Dans une étude, il a été observé, à l'aide de simulations d'amarrage moléculaire et d'essai de liaison que le BCP serait capable de se lier au domaine de liaison de PPARα et qu'il serait un agoniste. (Wu et al. 2014). Au contraire, le BCP ne semble pas agir directement sur PPARγ, mais plutôt par la cascade de signalisation du récepteur CB2 (Hashiesh et al. 2021). Cependant, le lien entre le BCP et les PPARs n'est pas encore bien compris et d'autres théories existent quant à l'activation des PPARs. En effet, dans une autre étude, il a été observé que le BCP augmentait l'expression de gènes liés à l'oxydation d'acides gras tels que PPARα et PPARγ selon la voie SIRT1/PGC-1α par l'activation du CB2 (Zheng et al. 2013).

Plus récemment, une étude a révélé que le BCP réduisait l'expression d'ARNm des protéines, JAK2, STAT3 et BACE1. Ils ont également réalisé une simulation d'amarrage entre le BCP et ces protéines, montrant que JAK2 avait la plus grande stabilité d'interaction avec le BCP (Zhang *et al.* 2022). Ces résultats suggèrent que le BCP aurait un effet inhibiteur sur la voie de signalisation JAK2/STAT3/BACE1, or, davantage de recherches seraient nécessaires pour confirmer

ce lien. JAK2 est une tyrosine kinase dont l'expression est universelle et qui a pour rôle le contrôle de la prolifération et la croissance cellulaire. Elle joue également un rôle important dans l'inflammation puisqu'elle agit comme transmetteur de signal pour des récepteurs de cytokines (Gnanasambandan et Sayeski 2011; Perner et al. 2019).

1.3 Contrôle de la douleur

Le BCP aurait également un effet antinociceptif qui serait médié par le récepteur CB2. En effet, il a été rapporté que plusieurs agonistes de ce récepteur ont des propriétés qui peuvent contrer l'allodynie, la douleur chronique, la douleur neuropathique et semblent pouvoir agir comme anesthésiques (Huang et al. 2016; Vuckovic et al. 2018). Dans le cas du BCP, on retrouve toutes ces propriétés que l'on associait aux agonistes du CB2. En effet, une étude *in vivo* faite sur les rats Wistar et les lapins New Zealand a montré que le BCP possédait une activité anesthésique locale. Cependant, l'activité se dissipe rapidement limitant son application (Ghelardini et al. 2001). Dans cette étude, le mode d'action n'a pas été investigué ce qui ne permet pas d'associer de voie de signalisation à cet effet thérapeutique. Son activité a également été évaluée dans des modèles de douleur neuropathique (Kuwahata et al. 2012; Klauke et al. 2014). Les résultats de ces études suggèrent que l'effet analgésique du BCP est principalement médié par le récepteur CB2, puisque l'inhibition de cette voie supprime la diminution de la douleur. Cependant, le mécanisme d'action n'a pas été caractérisé en détail. Pour ce qui est de l'allodynie, deux études sur le sujet ont mis en évidence que le BCP a un effet thérapeutique qui est médié par le récepteur CB2 (Segat et al. 2017; Aly et al. 2019). Finalement dans le traitement de la douleur aiguë et chronique, deux études indiquent que le BCP a un effet bénéfique sur la douleur. Cependant, ces études révèlent également que le récepteur opioïde de type μ semble aussi être impliqué dans l'effet puisque des traitements avec des antagonistes de ce récepteur abolissent l'effet du BCP (Katsuyama et al. 2013; Paula-Freire et al. 2014). Ces données sont particulièrement intéressantes puisque plusieurs études ont montré que l'activation du CB2 chez les kératinocytes mène à la production de β-endorphine qui agit sur le

récepteur opioïde de type μ ce qui pourrait expliquer l'activité antinociceptive du BCP (Ibrahim et al. 2005; Su et al. 2011; Tao et al. 2021). Une étude faite par Gao et ses collègues a révélé que l'activation du CB2 par AM1241 chez les kératinocytes HaCaT cause une augmentation de la production de β-endorphine (Gao et al. 2016). Selon cette étude, l'activation du CB2 causerait l'activation de la voie de signalisation MAPK par l'intermédiaire du complexe Gβγ. Ils sont arrivés à cette conclusion à l'aide d'antagonistes de différentes voies connues pouvant mener à la sécrétion de l'opioïde endogène. Cependant, le lien entre le complexe Gβγ et MAPK n'a pas été déterminé. En revanche, il a été documenté que ces sous-unités peuvent être impliquées dans l'activation de certaines voies de signalisation, dont MAPK (van Biesen et al. 1995; Kankanamge et al. 2022). Ainsi, le modèle le plus probable consiste en ce que l'activation de la voie de signalisation MAPK par le récepteur CB2 entraînerait une augmentation du Ca2+ intracellulaire, une augmentation de proopiomélanocortine (POMC) une protéine précurseur de β-endorphines qui seront envoyées par exocytose au récepteur opioïde de type μ (Figure 2). Afin de produire des β-endorphines, POMC requiert une série de clivages par les enzymes PC1/3 et PC2 (Benjannet et al. 1991). Il serait donc envisageable d'observer une augmentation de leur expression ou de leur activité enzymatique. Ainsi, le BCP pourrait être utilisé comme adjuvant dans le traitement du cancer pour réduire la douleur. Notamment celle liée aux neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie.

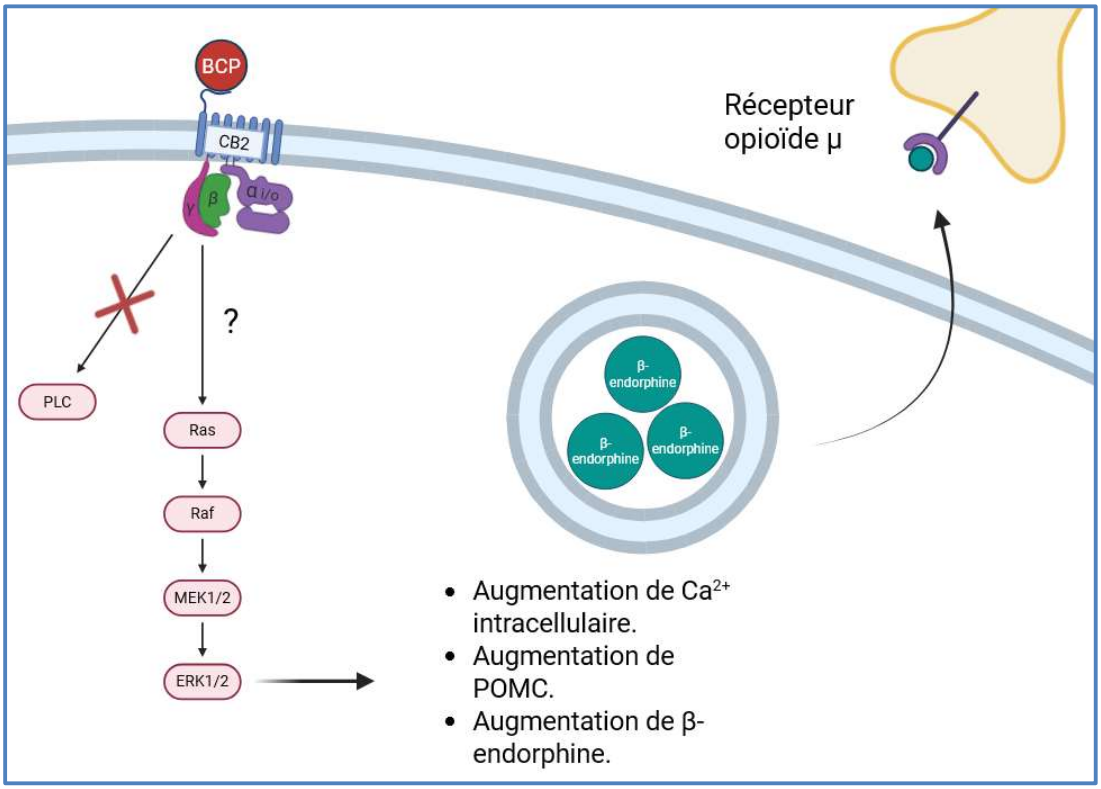

Figure 2. Schéma du mécanisme plausible de l'activité antinociceptive du BCP sur des kératinocytes HaCaT (Gao et al.)

1.4 Stress oxydatif et inflammation

Parmi les effets bénéfiques que l'on attribue au BCP, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire sont particulièrement attrayantes puisqu'il s'agit de processus présents dans plusieurs pathologies. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* menées dans différents contextes pathologiques indiquent que le BCP réduit le stress oxydatif et l'inflammation (Scandiffio et al. 2020). Le stress oxydatif et l'inflammation sont des phénomènes complexes qui sont étroitement liés, c'est-à-dire que l'un peut induire l'autre, ce qui implique qu'ils sont souvent présents simultanément (Biswas 2016). Cet aspect rend difficile la compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité antioxydante et anti-inflammatoire du BCP. Au niveau du stress oxydatif, le BCP serait un capteur de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et causerait une augmentation de la production d'enzymes antioxydantes (Baradaran Rahimi et Askari 2022). Une des premières études sur le stress oxydatif a été réalisée *in*

vivo et *in vitro* chez le rat, utilisant un modèle de fibrose hépatique induit par le tétrachlorométhane. Les auteurs rapportent que le BCP capte les radicaux libres, notamment les hydroxyles et les anions superoxydes. Ils ont ainsi observé une réduction de la peroxydation lipidique, une source majeure de dommages cellulaires causés par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Calleja et al. 2013). D'autre part, dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune, il a été observé que le traitement au BCP cause également une diminution de la production de peroxyde d'hydrogène et de monoxyde d'azote. (Fontes et al. 2017). De manière similaire, Hu et ses collègues ont observé que le BCP réduit la production d'oxyde nitrique, mais également de la prostaglandine E2 à l'aide d'un modèle de neuroinflammation sur les microglies BV-2 (Hu et al. 2017). Finalement, les résultats d'une étude sur l'effet du BCP sur les oligodendrocytes OLN-93 stimulés au LPS met en évidence que le BCP réduit la production de ROS et d'oxyde nitrique (Askari et Shafiee-Nick 2019).

D'autre part, Assis et ses collègues ont remarqué que le BCP rétablissait la concentration de glutathion (GSH) et de glutathion peroxydase (GPx) chez les gliomes C6 traités avec du glutamate. Le GSH et le GPx jouent un rôle important dans le contrôle du stress oxydatif en captant des radicaux libres (Assis et al. 2014). Une expérience utilisant un modèle de Parkinson induit par roténone chez le rat a mis en évidence que l'administration de BCP cause une augmentation de l'activité antioxydante de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase ainsi qu'une diminution de l'expression de Cox-2 et de iNOS (Ojha et al. 2016). De manière similaire, Arizuka et ses collègues ont observé une augmentation de l'expression d'ARNm pour les enzymes antioxydants SOD1, SOD2 et GPX1, mais également une réduction de l'expression de NOX2, TGF-β et Col1A1 (Arizuka et al. 2017). Ces résultats sont particulièrement intéressants parce que ces enzymes antioxydantes peuvent être modulées par le facteur de transcription NRF2, un effecteur majeur de la défense contre le stress oxydatif. (Raghunath et al. 2018). À cet effet, quelques études ont été réalisées dans le but d'évaluer le lien entre le BCP et ce facteur de transcription. Notamment, Assis et ses collègues ont remarqué que le BCP provoquait l'activation et la translocation nucléaire de NRF2. Ce mécanisme pourrait être médié par l'activation du récepteur CB2 puisque cet effet est inhibé en présence de l'antagoniste AM630 (Assis et al. 2014). Askari et Shafiee-Nick sont arrivés à des conclusions

similaires en montrant que l'effet antioxydant du BCP est médié par le CB2 et l'activation de NRF2. Cependant, ils ont observé que le blocage pharmacologique de PPARγ par GW9662 diminue l'effet antioxydant du BCP, suggérant que d'autres voies de signalisation pourraient également être impliquées (Askari et Shafiee-Nick 2019). Une autre étude *in vitro* réalisée sur des cellules mésangiales a aussi montré que le BCP augmentait l'activation de NRF2 (Li et al. 2020). Cependant, certaines études ont rapporté que l'activation du CB2 dans certaines lignées cancéreuses pouvait entraîner une augmentation de la production de ROS, menant ainsi à une activité cytotoxique. Par exemple, le traitement des cellules Jurkat avec le CP55,940 provoque une augmentation du stress oxydatif par la voie du CB2, effet qui n'est pas observé dans les lymphocytes du sang périphérique humain(Soto-Mercado et al. 2020). De plus, l'utilisation de l'agoniste du CB2 AM1241 a également été associée à une augmentation synergique de la production de ROS lorsqu'il est combiné au composé LBH589 (Sheng et al. 2023). Le mécanisme d'action sous-jacent n'a toutefois pas été étudié en profondeur dans cette étude. Ces cas de figure illustrent l'importance du contexte cellulaire, puisque dans certaines lignées cancéreuses, le BCP cause une augmentation de la production de ROS est observée. L'activité antioxydante semble être en partie due à sa structure moléculaire, qui lui permettrait de neutraliser les ROS (Calleja et al. 2013). Par ailleurs, l'action agoniste du BCP sur le récepteur CB2 contribuerait à ses effets antioxydants en activant NRF2 via la voie de signalisation PI3K/AKT (Hashiesh et al. 2024; Rathod et Agrawal 2025) Cette activation est possible, car le CB2, un récepteur couplé aux protéines G de la famille Gi/o, peut activer PI3Kγ par l'intermédiaire du dimère βγ (Brock et al. 2003). Une fois activé, PI3Kγ convertit PIP2 en PIP3, permettant ainsi le recrutement d'AKT et de PDK1, et l'activation subséquente d'AKT (Hemmings et Restuccia 2012). Concernant l'activation de NRF2 par AKT, il a été montré qu'AKT peut inhiber GSK-3β, qui participe à la dégradation de NRF2 (Salazar et al. 2006). Ainsi NRF2 peut se relocaliser dans le noyau pour se lier aux régions promotrices ARE impliquées dans la production d'enzymes antioxydantes telles que SOD1, SOD2, GPX1, CAT (Figure 3).

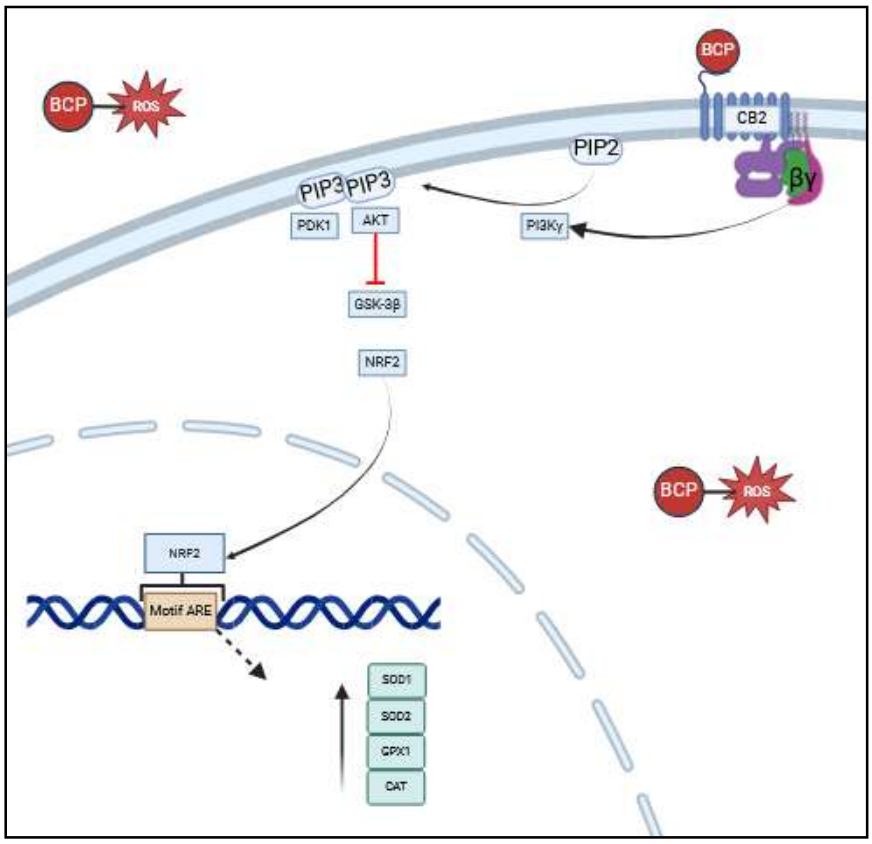

Figure 3. Schéma illustrant le mécanisme antioxydant théorique du BCP chez des cellules saines, basé sur la littérature (Calleja *et al.* 2013; Hashiesh *et al.* 2024; Rathod et Agrawal 2025).

Les recherches effectuées sur l'activité anti-inflammatoire du BCP semblent indiquer qu'il agit en modulant la production de molécules pro-inflammatoires et qu'il affecte également le recrutement et l'activation de cellules immunitaires. Une des premières études réalisées a montré l'effet inhibiteur du BCP sur la production de molécules inflammatoires à l'aide d'un modèle de colite chez la souris. Dans cette étude, le traitement avec le BCP réduisait l'expression de l'ARNm de l'IL-6 sans affecter l'expression de l'IL-1β et du TNFα (Cho et al. 2007). À l'aide du même modèle, Bento et ses collègues ont constaté, tant au niveau de l'ARNm et des protéines, une baisse des concentrations de TNFα, IL-1β ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-4, en réponse à un traitement au BCP. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour les niveaux de TGF et l'IL-10. Par ailleurs, *in vitro*, le traitement au BCP de macrophages murins stimulés par le LPS entraîne une réduction de l'expression protéique de cytokines telles que MIP-2 et TNFα (Bento et al. 2011). En contexte de neuroinflammation induite par l'hypoxie, un traitement au BCP sur les microglies BV2

induit une réduction de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1β, TNFα et l'IL-6 (Guo et al. 2014). Une étude sur l'efficacité du BCP dans le traitement de l'arthrose a révélé qu'il réduit l'expression de COX-2 et IRF1 chez des chondrocytes humains stimulés par le TNFα (Han et al. 2014). Au niveau du système nerveux central chez les rats Wistar, un traitement au BCP diminue également la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNFα à l'aide d'un traitement au BCP (Ojha et al. 2016). De même, une autre étude sur les microglies BV2 indique que le BCP cause une diminution de l'expression d'ARNm de TNFα, IL-6 et IL-1β, ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur TLR4 (Hu et al. 2017). À l'aide d'un modèle murin de sclérose en plaques, Alberti et ses collègues ont montré qu'un traitement au BCP induit une réduction significative du niveau d'IFNγ et une augmentation d'IL-10, sans effet notable sur l'IL-4 (Alberti et al. 2017). De même, Fontes et ses collègues ont démontré l'effet anti-inflammatoire du BCP dans un modèle d'encéphalomyélite chez la souris avec une diminution de la production des cytokines TNFα, IFNγ et IL-17 (Fontes et al. 2017). Dans un contexte de lésion de reperfusion chez les souris C57BL/6, le BCP réduit la production de TNFα, l'IL-1β ainsi que l'expression du récepteur TLR4 (Yang et al. 2017). Dans des études portant sur l'inflammation hépatique, notamment en cas d'hépatite fulminante, un traitement au BCP diminue les niveaux de TNFα et d'IL-6 causés par la D-galactosamine et le LPS dans un modèle murin (Cho et al. 2015). Par ailleurs, Arizuka et ses collègues ont observé, dans leur étude sur la stéatohépatite non alcoolique, une réduction de l'expression d'ARNm d'IL-1β et IL-6 après un traitement au BCP (Arizuka et al. 2017). Li et ses collègues ont également constaté une diminution de la production de TNFα, d'IL-1β et d'IL-6 par les cellules mésangiales (Li et al. 2020). Enfin, une étude menée sur des fibroblastes gingivaux et des cellules épithéliales de la muqueuse orale a révélé que le BCP réduit la production de TNFα, d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-17 et augmente la production d'IL-13 (Picciolo et al. 2020).

L'effet anti-inflammatoire du BCP se manifeste aussi par une modulation du recrutement des cellules immunitaires. Bento et collègues ont montré qu'un traitement au BCP réduit la production de N-acetylglucosaminidase et de myélopéroxydase, enzymes impliquées dans le recrutement des macrophages et des neutrophiles respectivement. De plus, ils ont également observé une diminution

de la production de la chimiokine CCL1/kc, qui favorise le recrutement de plusieurs cellules du système immunitaire ainsi qu'une augmentation de l'expression de FOXP3 un marqueur de lymphocytes T régulateurs (Bento et al. 2011). Dans un modèle de réponse inflammatoire induite par Mycobacterrium bovis BCG chez la souris, le BCP inhibe le recrutement de neutrophiles, mais ne semble pas avoir d'effet sur le recrutement des mononucléés. Aussi, cette étude a mis en évidence que le BCP réduit la chimiotaxie, l'adhésion cellulaire aux cellules endothéliales et la polymérisation d'actine dans les neutrophiles (Andrade-Silva et al. 2016). Dans un modèle de Parkinson chez le rat induit par la roténone, Ohja et ses collègues ont constaté que le BCP diminue l'expression de GFAP et Iba-1, marquant respectivement l'activation des astrocytes et les microglies, indiquant ainsi une activité inflammatoire dans le système nerveux central (Ojha et al. 2016). Des résultats similaires ont été obtenus par Alberti et ses collègues, qui ont observé une diminution de l'expression d'Iba-1 lié à l'activation des microglies et l'inhibition de lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Alberti et al. 2017). De plus, Fontes et ses collaborateurs ont rapporté une diminution du pouvoir d'infiltration de mononucléés et de neutrophiles dans un modèle d'encéphalomyélite (Fontes et al. 2017). Par ailleurs, dans modèle de stéatohépatite non alcoolique, le traitement au BCP a causé une réduction de l'expression d'ARNm de MCP-1, un chimioattractant des monocytes (Arizuka et al. 2017). En revanche, dans un modèle de stéatohépatite alcoolique, le traitement au BCP a provoqué une augmentation de l'expression de marqueurs de la présence de macrophage tels que F4/80, CD68 et Iba-1, tout en diminuant l'expression du marqueur de lymphocytes pro-inflammatoires CD11b. Cette étude a également montré que le BCP réduit la polarisation des macrophages vers le type M1 et diminue l'expression des protéines ICAM-1, ainsi que des sélectines E et P qui jouent un rôle dans l'infiltration des neutrophiles (Varga et al. 2018).

L'effet anti-inflammatoire du BCP sur les cellules normales est bien décrit dans la littérature. Cependant, son effet sur des cellules cancéreuses est beaucoup moins documenté. Une étude sur les ostéosarcomes MG-63 a montré une réduction de production de gènes pro-inflammatoires tels que TNFα, COX-2, NF-κB et IL-6 et suggère que cette réduction est engendrée suite à la stimulation de la voie de signalisation JAK1/STAT3 (Annamalai *et al.* 2020). Autrement, sur les

glioblastomes U87 et U373, un traitement au BCP réduit la phosphorylation de NF-κB et PPARγ ainsi qu'une réduction de la transcription de l'ARNm pour TNFα. De plus, cette action serait dépendante du récepteur CB2 puisque l'utilisation d'AM630 abolit l'effet (Irrera *et al.* 2020). Ainsi, l'effet anti-inflammatoire semble également toucher les cellules cancéreuses possiblement par le récepteur CB2.

Le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire du BCP est principalement associé à la voie de signalisation du récepteur CB2. Dans leurs recherches, Guo et ses collègues ont déterminé que le BCP active cette voie, ce qui réduit la phosphorylation de p65 et de NF-κB entraînant une baisse de production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNFα et IL-6 (Guo et al. 2014). De manière similaire, Picciolo et ses collègues ont montré que l'effet est également médié par le récepteur CB2. Ils ont observé une diminution de l'expression de NF-κB et de STAT3 accompagnée d'une augmentation de l'expression de PPARγ et de PGC-1α dépendante du CB2 (Picciolo et al. 2020). Toutefois, d'autres voies de signalisation semblent également impliquées. Notamment, Bento et ses collègues ont remarqué que la modulation de la production de cytokines dépend à la fois du récepteur CB2 et, en partie, de la voie de signalisation PPARγ (Bento et al. 2011). À l'inverse, Cho et ses collaborateurs suggèrent que l'activité anti-inflammatoire du BCP pourrait être due à une diminution de l'expression des récepteurs TLR4 et RAGE, lesquels sont régulés négativement en réponse au traitement au BCP (Cho et al. 2015). Par ailleurs, Li et ses collègues proposent que l'inhibition du facteur de transcription NRF2 puisse également contribuer à cet effet anti-inflammatoire (Li et al. 2020). Concernant la modulation du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires, les études indiquent que le récepteur CB2 joue un rôle dans ce processus, bien que les détails du mécanisme demeurent incertains (Andrade-Silva et al. 2016; Varga et al. 2018). Selon ces données, il est probable que le BCP exerce une activité anti-inflammatoire en inhibant NF-κB et CREB par l'activation du récepteur CB2 (Figure 4). En effet, lorsque le récepteur CB2 est activé, la sous-unité Gi/o interagit avec l'adénylate cyclase, entraînant son inhibition. Cette inhibition cause une diminution de la production d'AMPc et empêche ainsi l'activation de PKA (Rakotoarivelo et al. 2024). La réduction de l'activité de la PKA limiterait la translocation nucléaire de CREB ainsi que NF-κB, ce qui

réduirait la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-1β et TNFα ainsi que la production de la chimiokine MCP-1, impliquée dans le recrutement des monocytes (Cabral et Griffin-Thomas 2009).

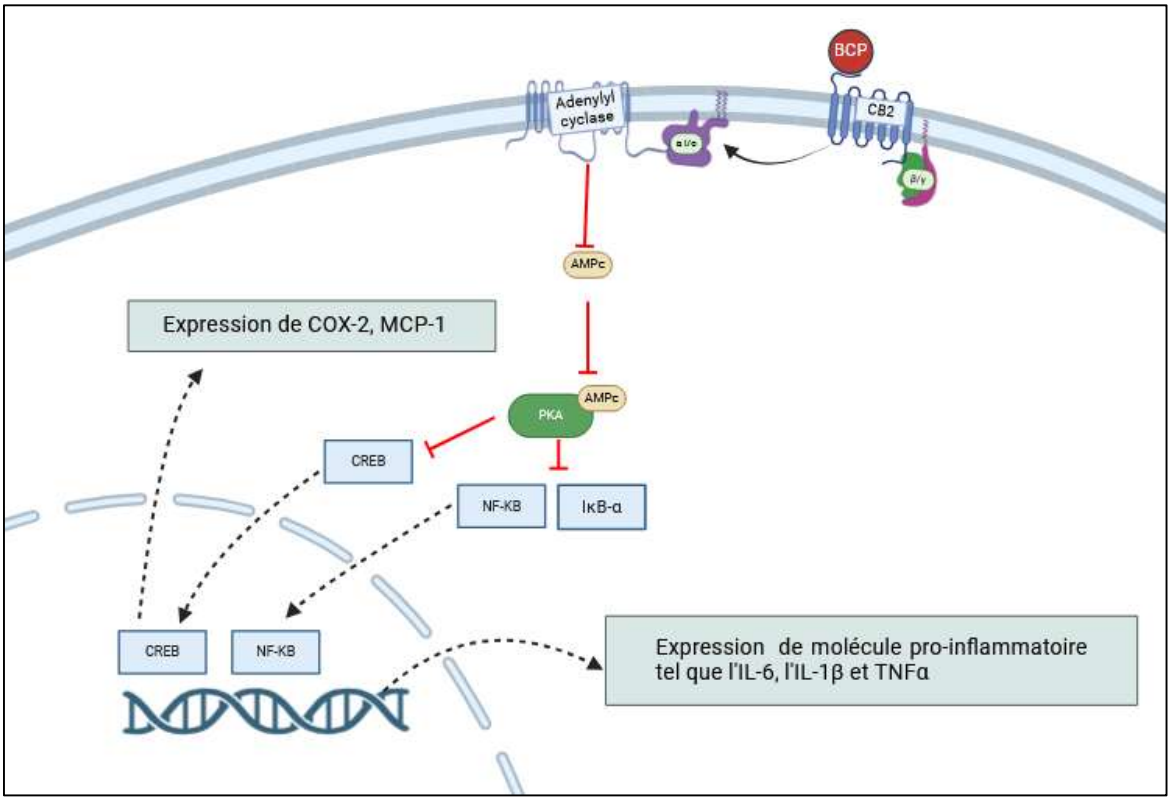

Figure 4. Schéma probable du mode d'action anti-inflammatoire du BCP (Cabral et Griffin-Thomas 2009; Rakotoarivelo *et al.* 2024).

Dans un contexte de traitement du cancer, le BCP pourrait être utilisé comme adjuvant dans le traitement du cancer pour moduler le microenvironnement des tumeurs par ses activités antioxydante et anti-inflammatoire qui jouent un rôle important dans la progression de la maladie.

1.5 Application du BCP pour le traitement du cancer

L'utilisation du BCP en oncologie apparaît prometteuse, notamment pour son utilisation comme agent anticancéreux, la potentialisation de certaines chimiothérapies et l'atténuation des effets secondaires

associés aux traitements. Au niveau de son action anticancer, le BCP présente un potentiel antiprolifératif sur plusieurs lignées cancéreuses. Par exemple, une étude menée sur des souris C57BL/6N greffées avec du mélanome B16F10 a montré qu'un traitement au BCP réduit la prolifération cellulaire ainsi que l'expression de marqueurs comme KI67, cycline A, CDK4 et cycline D1, impliqués dans la prolifération cellulaire (Jung et al. 2015). *In vitro*, des diminutions de prolifération ont été observées dans les lignées A549 et NCI-H358 traitées par le BCP, avec une modulation de l'expression de protéines régulant la phase G1 du cycle cellulaire, soit une réduction de CDK2, CDK4, CDK6, cycline D1 et cycline E et une augmentation des inhibiteurs p21 et p27 (Chung et al. 2019). Le BCP a également montré une cytotoxicité sélective envers les cellules d'ostéosarcome Mg-63 comparativement aux fibroblastes L929, qui semble être associée à une augmentation des ROS intracellulaires. L'analyse de l'expression d'ARNm a révélé une régulation positive de BAX et caspase 3, ainsi qu'une régulation négative de Bcl2 et cycline D1, une augmentation de l'expression de JAK1 et STAT3 a également été observée, une voie de signalisation liée à l'apoptose et à la régulation du cycle cellulaire (Annamalai et al. 2020). De façon similaire, Di Sotto et collègues ont souligné que la voie STAT3 pourrait également être impliquée dans le mode d'action du BCP (Di Sotto *et al.* 2020c). Une autre étude a montré un effet cytotoxique sur les lignées U373 et U87 avec une augmentation des protéines BAX, caspase 3, caspase 9, et une diminution de Bcl-2. Selon cette étude, l'activité cytotoxique du BCP serait causée par l'activation de PPARγ via la voie CB2. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation de PPARγ et la réduction de JNK, qui a été renversée par l'antagoniste AM630 (Irrera et al. 2020). De même, Ramachandhiran et collègues ont constaté un effet cytotoxique du BCP sur les cellules KB, caractérisé par une augmentation des ROS, une hausse des niveaux de BAX, caspase 3 et caspase 9, et une diminution de p53, Bcl2 et cycline D1. La baisse de l'expression de PI3K et Akt dans leurs résultats suggère l'implication de cette voie dans l'effet cytotoxique du BCP (Ramachandhiran et al. 2022). Les données expérimentales indiquent que le BCP joue un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose durant la phase G1 du cycle cellulaire. De plus, il est possible d'observer une augmentation de ROS intracellulaire et une dépolarisation membranaire mitochondriale. Malgré ces connaissances, le mécanisme d'action du BCP est largement inconnu. En effet, il y a peu de données

suggérant que l'activité antiproliférative du BCP découle de l'activation du CB2 (Irrera et al. 2020). Cependant, il est bien établi que les agonistes du CB2 ont une activité antiproliférative ce qui peut suggérer que la mort cellulaire des cellules cancéreuses est liée à son activation (Caffarel et al. 2008; Capozzi et al. 2018). Aussi, le lien entre l'activation du CB2 et les différentes cascades de signalisation est encore nébuleux. En revanche, plusieurs études montrent que les agonistes du CB2 inhibent la voie de signalisation PI3K/AKT dans les cancers et pourrait expliquer l'activité antiproliférative du BCP (Ellert-Miklaszewska et al. 2005; Ramachandhiran et al. 2022; Song et al. 2023). Également, d'autres expériences indiquent que l'activation d'ERK1/2 serait également impliquée dans l'activité antiproliférative du BCP pour les agonistes du CB2 (Sarfaraz *et al.* 2006; Rakotoarivelo *et al.* 2024). Ainsi, l'activité antiproliférative du BCP découle possiblement de l'activation du récepteur CB2. L'activation de ce récepteur entraînerait l'inhibition de la voie PI3K/AKT et l'activation d'ERK1/2 menant à l'apoptose. Ces voies expliqueraient l'observation de modulation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, de gènes impliqués dans l'apoptose, mais aussi l'augmentation de ROS intracellulaire et une dépolarisation membranaire mitochondriale (Figure 5).

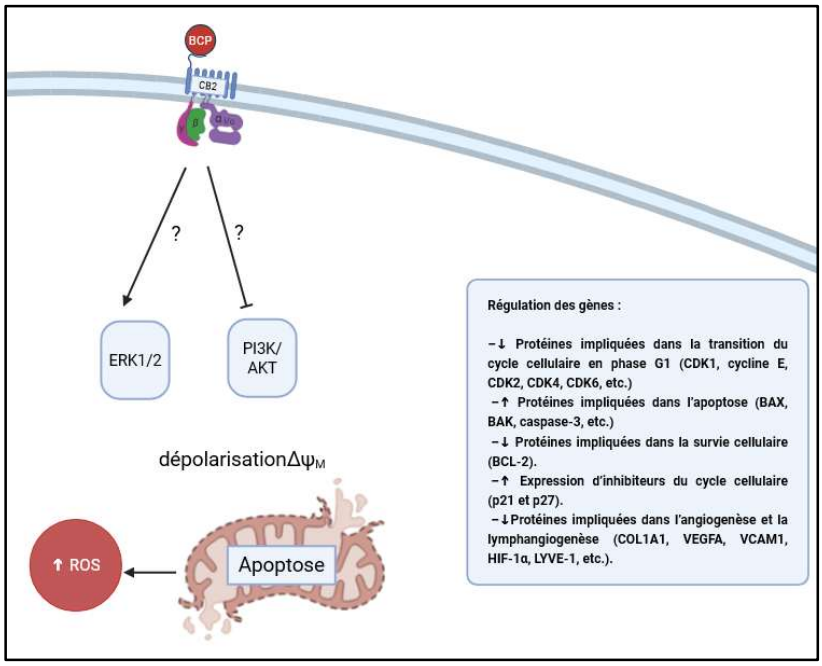

Figure 5. Schéma du mécanisme d'action du BCP pour son activité antiproliférative et anti-angiogénique (Ellert-Miklaszewska et al. 2005; Okkenhaug et al. 2016; Song et al. 2023; Rakotoarivelo et al. 2024).

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse jouent un rôle clé dans la pathologie du cancer, car le développement de ces vaisseaux favorise la croissance et la propagation métastatique des tissus tumoraux (Nishida *et al.* 2006). Par conséquent, les thérapies anti-angiogéniques peuvent constituer une stratégie efficace pour limiter la croissance et la propagation des tissus cancéreux. Des recherches ont révélé que le BCP réduisait l'expression de protéines impliquées dans les processus d'angiogenèse. Notamment, une étude menée sur un modèle murin C57BL/6N injecté avec les mélanomes B16F10 a noté que le traitement au BCP diminue considérablement l'expression d'ARNm des protéines HIF-1α, VEGF-A, CD31, VE-cadherin, VEGF-C, VEGF-R3 et lyve-1, surexprimées suite à un régime riche en matière grasse (Jung *et al.* 2015). Par ailleurs, une autre étude a observé que le BCP inhibe la prolifération et la migration des cellules HUVEC, connues pour leur rôle dans l'angiogenèse. Ils ont également observé, en culture 3D, que le BCP entraînait une altération de l'intégrité des structures tubulaires formées par ces cellules. Aussi, une diminution de la sécrétion de VEGF a été *observée in vitro*. Enfin, une analyse de liaison a mis en évidence un site de fixation du BCP sur le récepteur VEGFR2 (Dahham *et al.* 2021). Une étude menée par Ahmed et collègues a montré que le BCP, en combinaison avec le cisplatine, inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse en augmentant la concentration de la cadhérine E et en réduisant l'expression protéique de ZEB-2 (Ahmed *et al.* 2022). La modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse est également pertinente, car elle joue un rôle dans l'expansion métastatique et la croissance tumorale (Roche 2018). Le mécanisme d'action à l'origine de l'effet anti-angiogénique du BCP n'a pas encore été investigué, mais il pourrait résulter de la modulation du microenvironnement tumoral, notamment par une réduction des ROS et de l'inflammation, ce qui limiterait la production de protéines clés telles que VEGF et HIF-1α. Alternativement, cet effet pourrait découler de l'inhibition de la voie PI3K/AKT qui joue un rôle dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse chez plusieurs cancers (Okkenhaug *et al.* 2016). Cependant, la voie de signalisation menant à l'effet anti-angiogénique du BCP n'est pas encore élucidée et d'autres études devront être faites pour confirmer s'il existe un lien (Wittig *et al.* 2024). Ainsi, l'effet anti-angiogénique du BCP pourrait être relié à l'inhibition de la cascade de signalisation PI3K/AKT (Figure 5).

Plusieurs études ont remarqué que le BCP pouvait accroître, de manière synergique, l'effet cytotoxique de certaines molécules (Di Sotto et al. 2020a). Legault et Pichette ont publié les travaux initiaux montrant que le BCP augmente l'efficacité du paclitaxel sur les lignées MCF-7, caco-2 et DLD-1. Ils ont également observé une modulation de la perméabilité membranaire, susceptible d'expliquer l'effet potentialisateur du BCP (Legault et Pichette 2007). Par ailleurs, une étude faite par Pavithra et collaborateurs montre que le BCP augmente synergiquement l'activité cytotoxique de l'aromadendrène oxyde 2 et du phytol sur les lignées A431 et HaCat. Leurs résultats indiquent également une augmentation du ratio Bax/BCl-2, des ROS intracellulaires et du niveau de cytochrome C cytosolique, indiquant une activation de l'apoptose par le BCP (Pavithra et al. 2018). De même, Di Giacomo et collègues ont observé un effet synergique entre le BCP et la doxorubicine sur les lignées cancéreuses caco-2, CCRF/CEM et CEM/ADR5000. L'accumulation de rhodamine 123 dans un essai après un traitement au BCP suggère que les transporteurs ABC, tels que p-gp, MRP-1 et BCRP pourraient être inhibés, ce qui expliquerait l'effet synergique observé. (S et al. 2017). Di Sotto et collègues ont également mis en évidence une synergie entre le BCP et la doxorubicine chez la lignée HEPG2. Leur étude des mécanismes ainsi qu'une simulation d'amarrage moléculaire suggèrent que le BCP inhibe la pompe à efflux p-gp, expliquant l'augmentation de l'effet cytotoxique de la doxorubicine (Di Sotto *et al.* 2020b). Ainsi, ces observations suggèrent que l'activité potentialisatrice du BCP pourrait être due à une perméabilisation de la membrane via l'inhibition des pompes à efflux. Cependant, il reste possible que la cytotoxicité intrinsèque du BCP contribue également à l'effet synergique observé. Le mécanisme proposé pour l'effet synergique du BCP avec certains médicaments antitumoraux repose sur l'inhibition de la voie NF-κB par une suppression de l'adénylate cyclase, entraînant une diminution de l'expression du gène MDR1, qui code pour la pompe à efflux p-gp (Cabral et Griffin-Thomas 2009). Cette réduction de l'expression de p-gp favoriserait l'accumulation intracellulaire d'agents antitumoraux (Figure 6). Ce mécanisme se base sur le lien établi entre l'expression du gène MDR1, l'activation de NF-κB (Abdin et al. 2021).

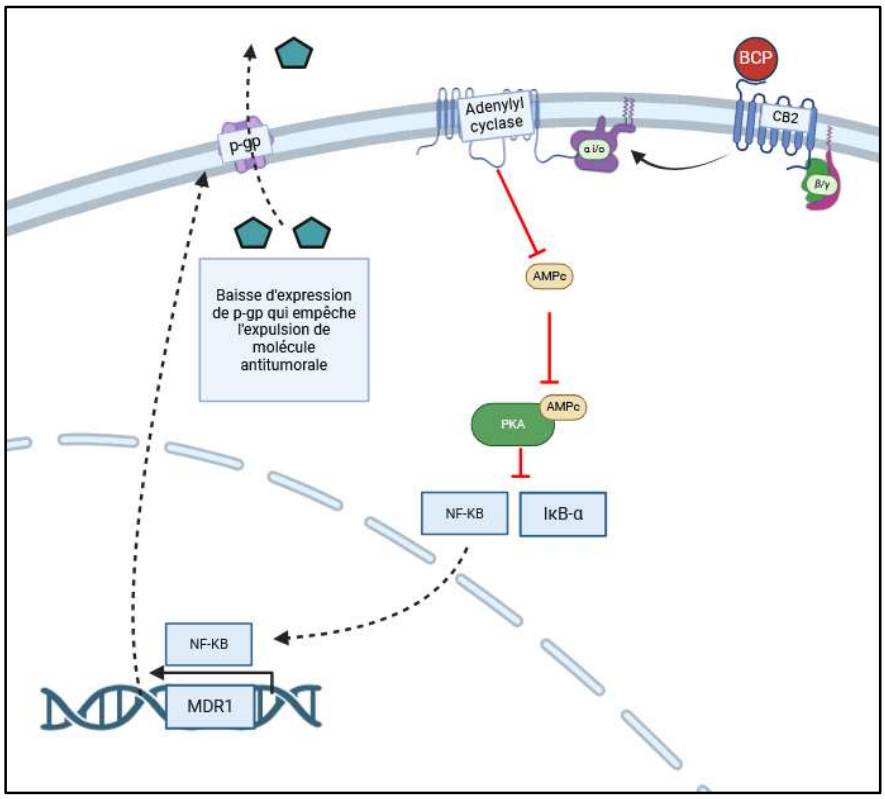

Figure 6. Mécanisme probable menant à une activité synergique entre des médicaments antitumoraux et le BCP (Cabral et Griffin-Thomas 2009; Abdin et al. 2021).

Finalement, différentes études ont également indiqué que le BCP pouvait être utilisé en combinaison avec des traitements anticancéreux pour réduire certains effets secondaires. Par exemple, une étude faite sur la combinaison de cisplatine et de BCP chez des souris C57BL/6J montre que le BCP réduit la toxicité rénale du cisplatine en contrôlant l'inflammation et le stress oxydatif via un mécanisme dépendant du CB2 (Horvath et al. 2012). De manière similaire, Al-Taee et collègues ont montré que le BCP diminue la cardiotoxicité de la doxorubicine chez le rat en réduisant le stress oxydatif et en modulant l'inflammation. Leurs résultats montrent une diminution du malondialdéhyde, une augmentation du taux des antioxydants superoxyde dismutase et glutathion. Concernant l'activité anti-inflammatoire, ils ont observé une diminution de la phosphorylation p65 de NF-κB, ce qui pourrait expliquer la diminution des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1β, ainsi que la réduction de l'expression protéique des médiateurs pro-inflammatoires iNOS et COX-2 (Al-Taee et al. 2019). Ainsi, la réduction des effets secondaires semble être liée aux contrôles du stress antioxydant (Figure 3) et anti-inflammatoire (Figure 4) qui serait contrôlé par les voies de signalisation PI3K/Akt et NF-κB respectivement.

1.6 Biodisponibilité

L'hydrosolubilité est souvent un enjeu en pharmaceutique puisqu'elle limite l'absorption des composés lorsqu'ils sont ingérés oralement. Afin d'augmenter la biodisponibilité des produits pharmaceutiques, il est possible d'apporter des modifications aux méthodes d'administration des médicaments. Ces modifications peuvent être physiques, chimiques ou consister à modifier le mode de transport du médicament (Savjani et al. 2012). Étant donné la structure lipophile du BCP, plusieurs études se sont intéressées à améliorer la biodisponibilité du médicament. Parmi les méthodes déjà explorées pour augmenter la biodisponibilité on retrouve l'utilisation de nanoparticules, de liposomes (Amalraj et al. 2020), de la nanoémulsion ainsi que l'utilisation des cyclodextrines (Santos et al. 2018). Une étude sur l'utilisation de nanoparticules a réussi à créer une formulation permettant d'augmenter la biodisponibilité du BCP. La formulation montre également une bonne stabilité permettant l'entreposage prolongé du produit (Alberti et al. 2021). Pour ce qui est de la nanoémulsification, il s'agit de la capacité à réaliser la dispersion homogène d'un liquide non miscible dans un autre en créant des gouttelettes de taille nanométrique. Une étude a démontré qu'il était possible d'augmenter la biodisponibilité à l'aide de cette technologie tout en conservant les propriétés de la molécule dans une étude clinique *in vivo* chez des rats. L'étude a également montré une bonne stabilité physique de la formulation même lorsque celle-ci est entreposée dans des conditions sous-optimales (Nogueira et al. 2023). Les liposomes sont également une façon d'augmenter la biodisponibilité. Les liposomes sont des vésicules à bicouches de lipides amphipathiques. Cette structure permet de contenir des médicaments aussi bien lipophiles qu'hydrophiles. Ils ont pour avantage de protéger contre la dégradation chimique ainsi que d'avoir une certaine spécificité pour les cibles (Gopi et al. 2018). Ce type de système d'administration a déjà été testé dans une étude clinique à double aveugle chez l'homme afin de traiter les douleurs musculaires à apparition retardée. Dans cette étude, ils ont montré que la formulation était stable sur de longues périodes et que la préparation de celle-ci était efficace (Amalraj et al. 2020). Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides cycliques qui ont une surface externe hydrophile et une cavité interne lipophile. Ainsi, leur structure permet de créer un complexe d'inclusion dans lequel une molécule lipophile peut être transportée. Cette méthode a

pour avantage d'augmenter la stabilité du produit lors de l'ingestion et de l'entreposage (Tiwari et al. 2010). Cette méthode a été utilisée dans une étude clinique chez le rat. Dans cette étude, ils ont montré l'effet antihyperalgésique du BCP ainsi que mis en évidence la possibilité d'utiliser la β-Cyclodextrine pour la formulation du BCP (Quintans-Junior et al. 2016).

1.7 Toxicité du BCP

Un des avantages du BCP comme agent thérapeutique est qu'il s'agit d'un composé peu toxique. En effet, la FDA a classifié ce produit, pour son utilisation comme additif alimentaire et adjuvant, dans la catégorie considérée comme sécuritaire (FDA 2024). Cependant, des études cliniques seraient nécessaires afin d'évaluer sa toxicité étant donné que cette classification s'applique seulement dans un contexte alimentaire. Parmi les études toxicologiques réalisées sur le BCP, certaines se sont intéressées aux doses létales, à la génotoxicité et à la toxicité chronique en utilisant différents modèles. Au niveau de la génotoxicité, une étude de 2008 a utilisé le test d'Ames afin de déterminer si le BCP avait un effet mutagène. L'étude a déterminé que le composé n'était pas mutagène, mais également qu'il possédait des propriétés antimutagènes (Di Sotto et al. 2008). Une autre étude sur la génotoxicité du BCP a été réalisée à l'aide du test du micronoyau chez des souris mâles et aucune génotoxicité n'a été observée (Molina-Jasso et al. 2009).

Pour ce qui est de la toxicité, Molina-Jasso et collègues ont également évalué la dose létale médiane à plus de 5000 mg/kg de masse corporelle chez la souris (Molina-Jasso et al. 2009). De manière similaire, une étude plus récente sur des souris SWISS, la toxicité a été évaluée à plus de 2000 mg/kg de masse corporelle (Oliveira et al. 2018). Une autre étude visant à évaluer la toxicité chronique du BCP sur des rats Wistar n'a pas montré de toxicité pour des concentrations s'élevant jusqu'à 700 mg/kg par jour avec le gavage oral (Schmitt et al. 2016). Bastaki et ses collaborateurs ont effectué une étude sur des rats Sprague Dawley afin de déterminer la concentration maximale sans effet néfaste pour les deux sexes. Leur résultat montre une différence entre les deux sexes, soit 222 mg/kg pour les mâles et 263 mg/kg chez les femelles (Bastaki et al. 2020).

Étant donné la tendance d'oxydation du BCP en BCPO, il est également important d'étudier la toxicité de ce produit d'oxydation (Molina-Jasso et al. 2009). Une étude sur le potentiel génotoxique du BCPO a été réalisée à l'aide d'un test d'Ames. Cette étude n'a pas observé de potentiel génotoxique (Di Sotto et al. 2013). Une étude sur la toxicité subaiguë du BCPO a été évaluée chez des rats Sprague Dawley. Chez les mâles, la concentration maximale sans effet néfaste est de à 109 mg/kg par jour alors que, chez les femelles, elle est de 137 mg/kg par jour (Bastaki et al. 2020).

Un aspect important qui a été soulevé au sujet de la toxicité du BCP et du BCPO est leur capacité à interagir avec l'enzyme CYP3A laquelle joue un rôle important dans la métabolisation de plusieurs médicaments. Cependant, puisque la constante d'inhibition entre le BCP et l'enzyme CYP3A4 est élevée, il faut une concentration de BCP très élevée pour causer une baisse significative de l'activité enzymatique de cette dernière (Nguyen et al. 2017; Spicakova et al. 2019). L'ensemble des résultats sur la toxicité indiquent que le BCP, ainsi que son époxyde, sont peu toxiques. Par conséquent, le BCP pourrait être un bon candidat pour une utilisation pharmaceutique. Cependant, des études cliniques supplémentaires devront être faites pour confirmer son innocuité et son efficacité chez l'humain.

CHAPITRE 2
RÉSULTATS

2.1 Amarrage moléculaire

Afin de reconfirmer l'affinité du BCP pour le CB2, une analyse d'amarrage moléculaire a été réalisée. L'analyse d'amarrage moléculaire indique que tous les ligands ont une énergie de liaison favorable au récepteur CB2 avec WIN 55,212-2 ayant la meilleure affinité (Tableau 1). À l'inverse, le ligand ayant la moins bonne affinité est le 2-AG, un ligand endogène pour ce récepteur. De plus, il est possible d'observer la même tendance sur le plan de l'énergie de liaison en comparant les liaisons formées avec les deux structures du récepteur. Finalement, l'analyse montre que le BCP a une bonne affinité pour le récepteur CB2.

Tableau 1. Énergie de liaison entre les ligands et le récepteur CB2 5ZTY et 6PT0 ayant une résolution de 2,8 Å et 3,2 Å respectivement.

Ligands	Énergie de liaison avec 5ZTY (kcal/mol)	Énergie de liaison avec 6PT0 (kcal/mol)
BCP	-8,8	-8,4
AM-630	-9,9	-9,5
2-AG	-7,7	-8
WIN 55,212-2	-11,3	-11,9

Les schémas d'interactions issus des amarrages moléculaires mettent en évidence les résidus d'acides aminés ainsi que les types de liaisons susceptibles de participer à l'ancrage des ligands au récepteur CB2. Parmi ces schémas, huit résidus — PHE94, PHE183, PHE281, SER285, ILE110, VAL 113, THR114 et PRO184 — sont retrouvés dans au moins six des complexes ligand-récepteur. Toutefois, des différences notables apparaissent lorsqu'on compare les interactions établies par un même ligand avec deux cristallographies distinctes du récepteur. Ces variations se traduisent par l'implication de résidus spécifiques ou de types de liaisons différents (Figure 7).

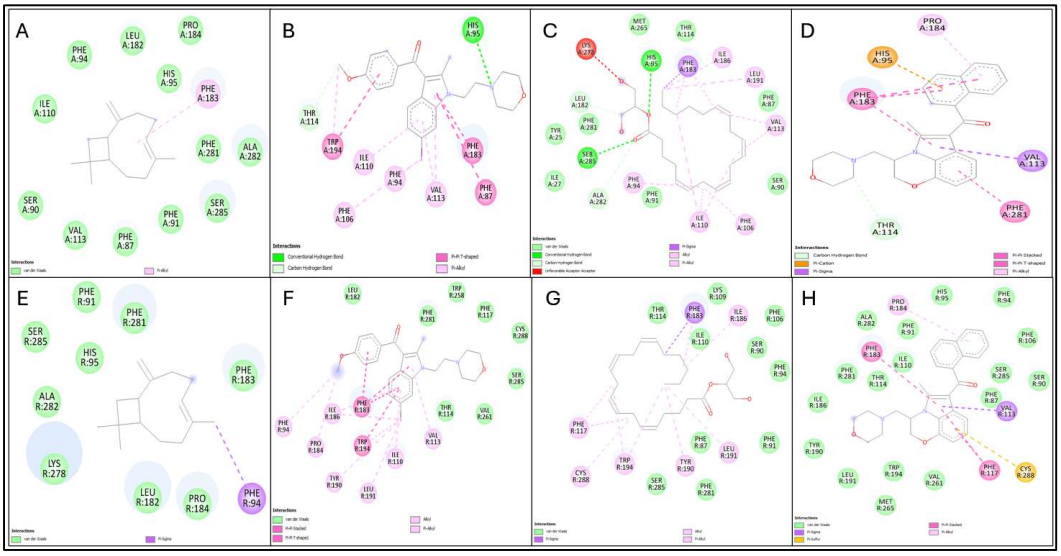

Figure 7. Représentation des interactions clés issues de l'amarrage moléculaire. A) 5ZTY-BCP, B) 5ZTY-AM630, C) 5ZTY-2-AG, D) 5ZTY-WIN55,212-2, E) 6PT0-BCP, F) 6PT0-AM630, G) 6PT0-2-AG, H) 6PT0-WIN55,212-2.

L'analyse d'amarrage a également permis de visualiser les conformations tridimensionnelles adoptées par les ligands au sein du site de liaison. Il en ressort que ces ligands interagissent majoritairement avec des régions hydrophobes ou faiblement hydrophiles du récepteur CB2 (Figure 8).

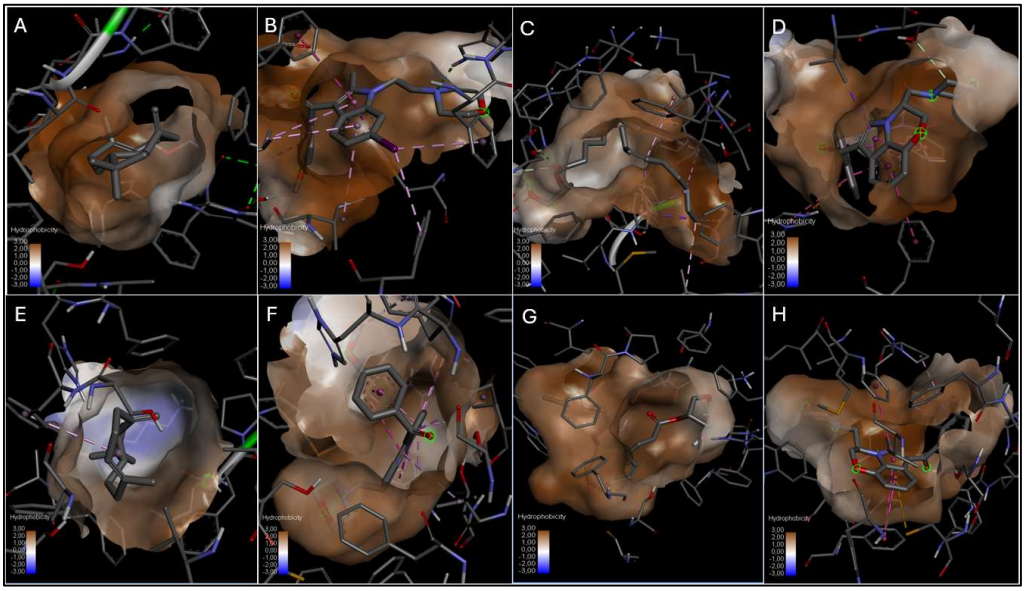

Figure 8. Conformations tridimensionnelles les plus stables des complexes ligand-récepteur issus de l'amarrage moléculaire. A) 5ZTY-BCP, B) 5ZTY-AM630, C) 5ZTY-2-AG, D) 5ZTY-WIN55,212-2, E) 6PT0-BCP, F) 6PT0-AM630, G) 6PT0-2-AG, H) 6PT0-WIN55,212-2.

2.2 qPCR

L'un des objectifs de ce travail visait à identifier un modèle exprimant le CB2. À cet effet, une analyse qPCR a été réalisée sur l'expression du gène CNR2 codant pour ce récepteur. La méthode d'extraction utilisée a permis d'obtenir une concentration suffisamment élevée d'ARNm et d'assez bonne pureté pour effectuer la transcription inverse de chaque échantillon (Tableau 2). Une fois la transcription inverse réalisée sur ces échantillons, les analyses de qPCR ont été réalisées.

Tableau 2. Concentrations en ng/µL ainsi que rapports de pureté 260/280 obtenus par NanoDrop.

Lignées	Extraction	Concentration ng/µL	260/280
HEPG2	1	42,6	2,00
	2	300,5	2,09
	3	220,2	2,12
HL-60	1	38,7	1,98
	2	172,8	2,07
	3	235,2	2,10
Jurkat	1	115,8	1,90
	2	378,7	2,04
	3	74,8	2,02
MCF7	1	28,7	1,99
	2	92,4	2,08
	3	69,4	2,06
MDA-MB-231	1	36,2	1,98
	2	134,2	2,10
	3	186,2	2,09
MG-63	1	161,9	2,09
	2	242,5	2,11
	3	175,7	2,09
WS1	1	38,0	2,09
	2	67,7	2,08
	3	102,0	2,10

L'analyse de l'expression d'ARNm du gène CNR2 a révélé qu'il y avait une expression de l'ARNm dans les lignées HL-60, Jurkat, MCF7 et MDA-MB-231. Au contraire, il semble y avoir une absence d'expression de l'ARNm du gène CNR2 chez les lignées HepG2, MG-63 ainsi que WS1. L'analyse statistique par ANOVA à simple facteur a mis en évidence une différence significative entre les lignées. Une comparaison des paires par post hoc de Tukey a également permis d'observer que l'expression du gène CNR2 est similaire entre HL-60 et Jurkat, Jurkat et MCF7 et que MDA-MB-231 est différentiellement exprimé des autres lignées. En effet, on remarque que l'expression du

gène CNR2 est significativement plus élevée chez les lignées HL-60 et Jurkat suivies par MCF7 et MDA-MB-231 qui expriment le moins le gène (Figure 9). En se basant seulement sur les résultats de qPCR, il serait possible d'utiliser ces 4 lignées comme modèle cellulaires. Cependant, les lignées cellulaires HL-60 et Jurkat semblent les meilleurs choix.

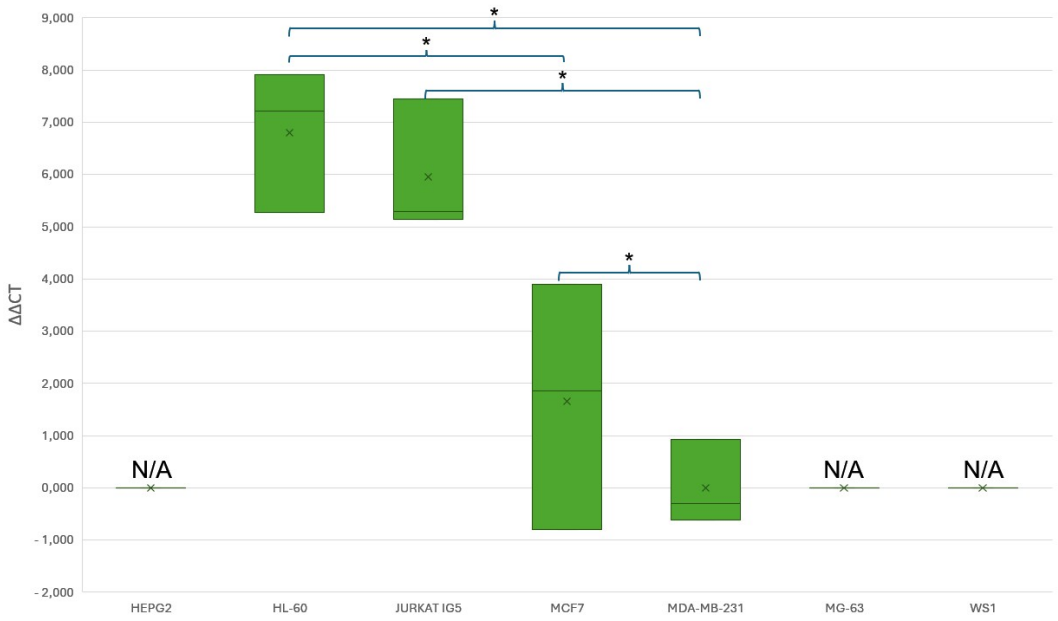

Figure 9. Boîtes à moustaches représentant l'expression relative du gène CNR2 par la méthode ΔΔ CT utilisant le gène de référence TBP ainsi que la lignée cellulaire MDA-MB-231 comme calibreur. Les comparaisons significatives par test de post hoc de Tukey * $p < 0,05$ sont indiquées à l'aide d'un astérisque.

2.3 Immunobuvardage de type western

Pour caractériser la présence du récepteur CB2 chez les différentes lignées, l'immunobuvardage de type western a été employé. La méthode d'extraction utilisée a permis d'obtenir une concentration suffisamment élevée de protéines afin de déposer suffisamment d'échantillons dans les puits pour la détection par immunobuvardage de type western (Tableau 3).

Tableau 3. Concentration en µg/ml de protéines de chaque échantillon mesuré par dosage BCA.

Lignées	Extraction	Concentration µg/ml
HepG2	1	288,85
	2	335,85
	3	427,24
HL-60	1	411,05
	2	665,76
	3	670,17
Jurkat	1	443,44
	2	441,97
	3	365,41
MCF7	1	104,23
	2	194,62
	3	154,87
MDA-MB-231	1	172,54
	2	165,18
	3	129,84
MG-63	1	302,10
	2	249,10
	3	296,21
WS1	1	355,10
	2	123,95
	3	131,31

Les résultats de l'immunobuvardage de type western montrent en premier lieu que la protéine CB2 est présente dans toutes les lignées cellulaires testées (

Figure 10). Ceci est mis en évidence par des bandes se trouvant à 55 kDa, telles qu'attendues pour ce récepteur. Autrement, il est également possible d'observer une bande à environ 30 kDa pour la lignée cellulaire WS1 qui apparaît lorsque l'anticorps reconnaissant le CB2 est présent. Au niveau de la détection de la protéine domestique GAPDH, elle est également exprimée dans toutes les lignées cellulaires testées et se retrouve à 35 kDa.

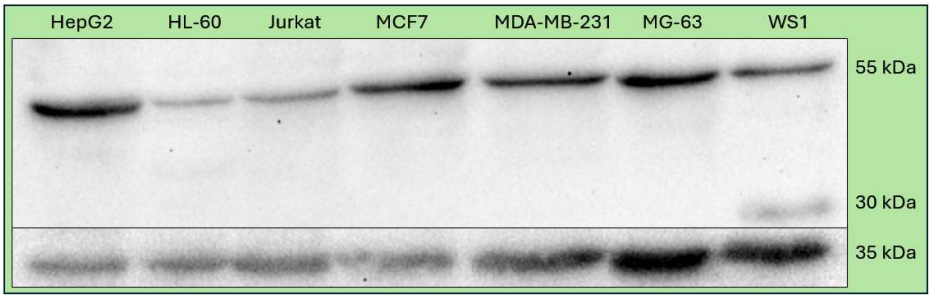

Figure 10. Détection des bandes par chimiluminescence à la suite de l'immunobuvardage de type western.

La quantification relative de l'expression du récepteur CB2 faite par immunobuvardage de type western révèle que bien que toutes les lignées expriment le CB2, l'expression varie selon les lignées. Parmi les lignées qui expriment le plus le récepteur, on retrouve les lignées HepG2, MCF7, MG-63 et WS1. Par exemple, MCF7 montre la plus grande variabilité de l'expression de la protéine pcomme l'indique un écart-type élevé. Bien qu'elles semblent exprimer le CB2, les lignées HL-60, Jurkat et MDA-MB-231 ont la plus faible expression. Pour ce qui est de l'analyse ANOVA à simple facteur seule la lignée HepG2 montre une différence significative entre certaines lignées telles que HL-60, Jurkat et MDA-MB-231. Ainsi, les lignées HepG2, MCF7 et MG-63 semblent être les meilleurs modèles exprimant fortement le récepteur CB2 (

Figure 11).

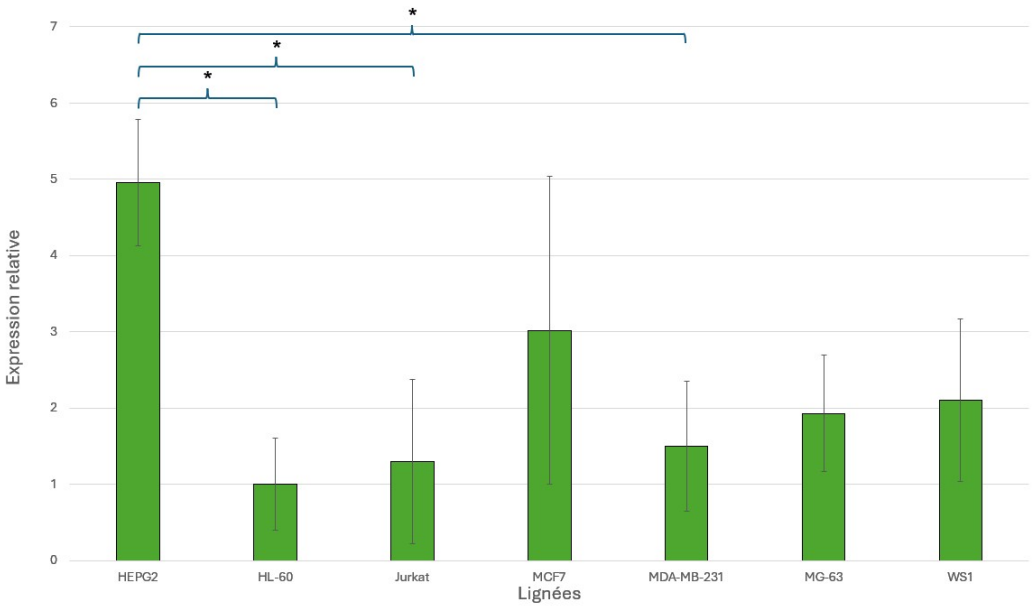

Figure 11. Expression relative moyenne du récepteur CB2 ainsi que la déviation standard calculée en utilisant la lignée cellulaire HL-60 comme calibreur. Les comparaisons significatives par test de post hoc de Tukey * $p < 0,05$ sont indiquées à l'aide d'un astérisque.

2.4 Détection par immunofluorescence

L'immunofluorescence a été utilisé comme méthode de détection complémentaire à l'immunobuvardage de type western. La détection du CB2 par immunofluorescence révèle que le récepteur CB2 est exprimé dans toutes les lignées cellulaires testées. Cependant, il semble que l'expression ne soit pas uniforme chez toutes les lignées. En effet, il est possible d'observer une plus grande fluorescence chez les lignées HepG2, MG-63 et WS1 que les lignées H-L60, Jurkat et MCF7 (

Figure 12).

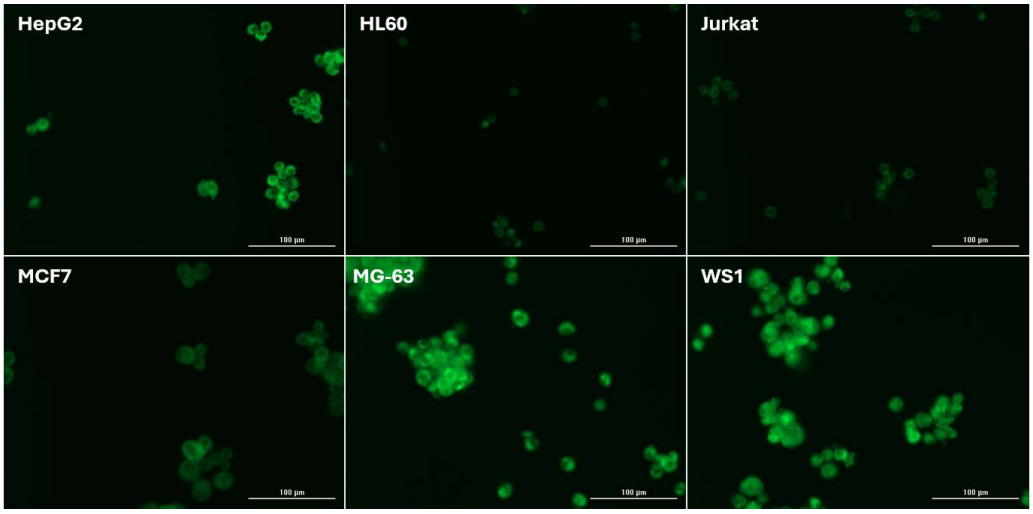

Figure 12. Détection du récepteur CB2 par immunofluorescence pour les lignées HepG2, HL-60, Jurkat, MCF7, MG-63 et WS1.

2.5 Choix du modèle cellulaire

En tenant compte des données d'expression du récepteur CB2 aux niveaux transcriptionnel et protéique, des divergences marquées ont été observées entre ces deux types d'expression. Notamment, l'expression du gène CNR2 est absente dans certaines lignées cellulaires, alors que la protéine CB2 y est détectée. Par exemple, l'analyse par qPCR révèle une absence d'expression du gène dans les lignées HepG2, MG-63 et WS1 malgré la présence apparente de la protéine. De plus, une tendance inverse semble se dessiner entre les niveaux d'ARNm et de protéine. En effet, les lignées présentant une expression élevée du gène CNR2 montrent des niveaux protéiques

relativement faibles et les lignées n'exprimant pas le gène ont la plus grande expression protéique. Ces divergences rendent le choix du modèle plus compliqué puisqu'elles remettent en doute les méthodes utilisées. Cependant, l'étude s'intéresse à l'expression protéique du récepteur donc le choix du modèle s'est basé sur les données d'expression protéique plutôt que sur l'expression génique. Étant donné que l'objectif était d'obtenir un modèle cancéreux exprimant le récepteur CB2, il est possible d'écarter la lignée WS1 qui est un fibroblaste de peau non cancéreux utilisé. Ainsi, les six lignées cellulaires cancéreuses peuvent être considérées comme modèle cellulaire. Cependant, les lignées HL-60, Jurkat et MDA-MB-231 ont été exclues en raison de faibles niveaux d'expression protéique, limitant ainsi leur pertinence expérimentale. La lignée MCF7 a également été écartée, en raison d'une forte variabilité interéchantillon dans l'expression de la protéine CB2. Ceci pourrait compromettre la fiabilité des analyses subséquentes. Quant à la lignée HepG2, bien qu'elle présente la meilleure expression protéique, son mode de croissance en amas cellulaires denses est susceptible de générer une hétérogénéité dans le comptage cellulaire et de restreindre l'accessibilité au BCP, rendant son utilisation moins optimale. Ainsi, la lignée MG-63 a été retenue comme modèle privilégié pour les analyses transcriptomiques, en raison de son profil d'expression stable et de sa morphologie favorable aux traitements expérimentaux. Afin d'appuyer ce choix, l'expression du récepteur CB2 a été observée dans d'autres études aux niveaux protéique et génique (Yang et al. 2015; Punzo et al. 2017).

2.6 Cytotoxicité sur modèle cellulaire

La cytoxicité du BCP sur MG-63 a été évalué afin de sélectionner des concentrations qui permettront d'observés des changements d'expression attribuables au mode d'action et non à une concentration cytotoxique du composé. L'analyse de la cytotoxicité du BCP réalisée sur les cellules MG-63 a permis d'observer la réponse de ces cellules pour des concentrations allant de 25 à 600 µM pour des temps d'exposition allant de 30 minutes à 24 heures. Les données provenant du test de résazurine (
Figure 13) et Hoechst (

Figure 14) montrent que la concentration et le temps d'exposition influencent notablement la survie cellulaire. En effet, ceci s'observe par des pentes de courbes qui deviennent plus inclinées ou qui commencent à des concentrations plus faibles en fonction de ces deux paramètres. En revanche, il est possible de remarquer que les temps d'exposition de 30 min et 1h ne sont généralement pas assez longs pour d'observer un effet sur la survie cellulaire aux concentrations testées. De manière similaire, les concentrations se situant sous 100 µM sont faiblement toxiques, même lorsque le temps d'exposition est élevé. En général, les deux tests cytotoxiques utilisés permettent d'observer des tendances similaires au niveau de la cytotoxicité du BCP.

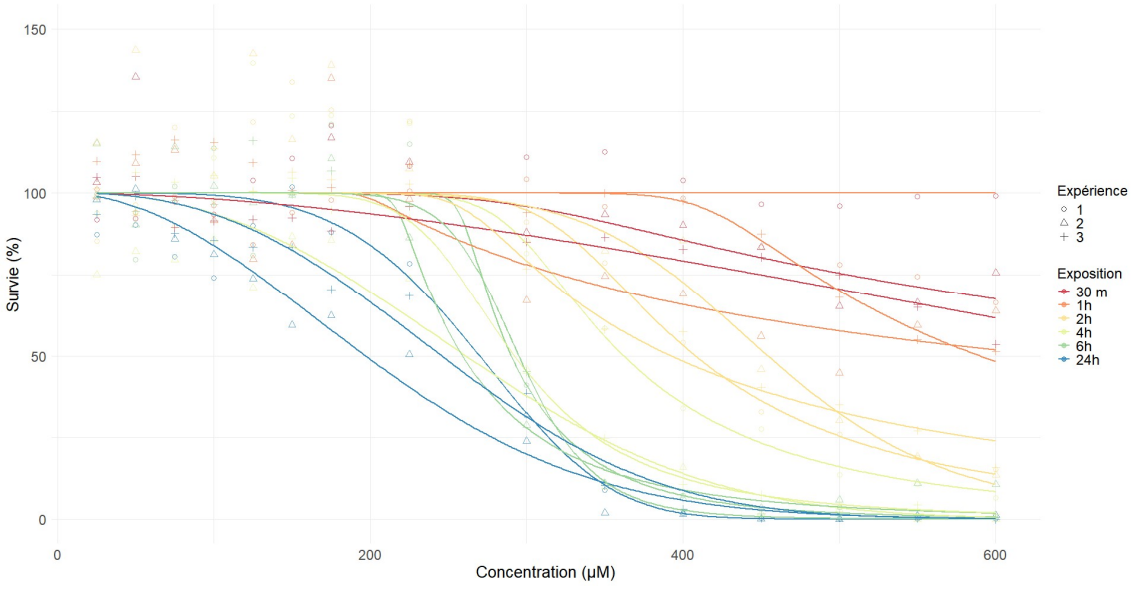

Figure 13. Courbes de réponse dose-dépendante au BCP mesurées par le test de résazurine pour différents temps d'exposition. Les courbes ont été ajustées selon un modèle log-logistique à cinq paramètres, avec des bornes minimale et maximale fixées respectivement à 0 et 100.

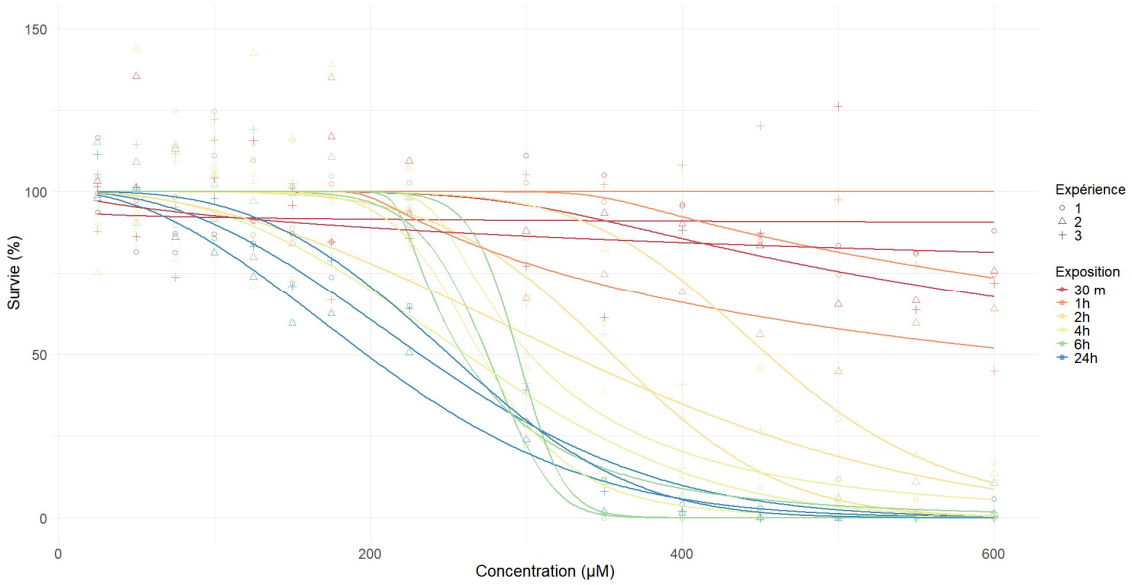

Figure 14. Courbes de réponse dose-dépendante au BCP mesurées par le test de Hoechst pour différents temps d'exposition. Les courbes ont été ajustées selon un modèle log-logistique à cinq paramètres, avec des bornes minimale et maximale fixées respectivement à 0 et 100.

La modélisation des courbes dose-réponse à partir des données de cytotoxicité issues des tests de résazurine et Hoechst a permis de déterminer les concentrations inhibitrices (IC). Dans le cadre de l'évaluation de la cytotoxicité du BCP sur MG-63, ces IC renseignent sur les concentrations requises pour induire un certain pourcentage de mortalité cellulaire. Ainsi, les moyennes des IC20, IC50 et IC90 ont été calculées pour chaque courbe modélisée (Tableau 4 et Tableau 5). Conformément aux tendances observées dans les réponses dose-dépendantes, on remarque que plus le temps d'exposition est court, plus la concentration nécessaire pour atteindre les seuils de mortalité souhaités est élevée. Il convient toutefois de noter que certaines valeurs d'IC n'ont pas pu être déterminées, en raison de la limite maximale de concentration testée (600 µM). Dans ce cas, les IC sont donc supérieurs à cette valeur (IC>600 µM). La fixation de cette limite repose sur le fait que les composés dont les concentrations actives excèdent 100 µM sont généralement moins prometteurs (Gleeson et al. 2011). De manière générale, les valeurs d'IC obtenues avec le test de résazurine sont plus élevées que celles issues du test de Hoechst. Néanmoins, en raison des incertitudes parfois importantes associées aux estimations, il est difficile de conclure qu'il s'agit d'une différence réelle ou d'un biais lié aux méthodes utilisées. L'IC20, souvent utilisé comme indicateur de concentrations non létales (Xia et al. 2016), s'élève à 161 µM pour le test de résazurine et 142 µM pour celui de

Hoechst. Cela suggère que des concentrations inférieures à 100 µM ont un effet limité sur la mortalité des cellules MG-63. Ces concentrations peu toxiques pourront ainsi être utilisées pour l'analyse transcriptomique. L'IC50, qui représente la concentration à laquelle une réduction de 50 % de la viabilité est observée, constitue un bon indicateur de la toxicité d'un composé. Dans cette étude, les plus faibles IC50 atteignent 237 µM (résazurine) et 226 µM (Hoechst). Enfin, l'IC90, qui correspond à la concentration nécessaire pour approcher la réponse maximale, est estimée à 367 µM pour la résazurine et à 343 µM pour le test de Hoechst.

Tableau 4. Valeurs des IC20, IC50 et IC90 (moyenne ± écart-type) pour chaque temps d'exposition au BCP, calculées à partir des données de cytotoxicité obtenues avec le test de résazurine.

Temps d'exposition	IC20 moyenne (µM)	IC50 moyenne (µM)	IC90 moyenne (µM)
30 m	>600	>600	>600
1 h	>600	>600	>600
2 h	340±41	418±32	>600
4 h	241±72	305±52	473±85
6 h	254±21	281±20	374±17
24 h	161±49	237±37	367±21

Tableau 5. Valeurs des IC20, IC50 et IC90, (moyenne ± écart-type) pour chaque temps d'exposition au BCP, calculées à partir des données de cytotoxicité obtenues avec le test de Hoechst.

Temps d'exposition	IC20 moyenne (µM)	IC50 moyenne (µM)	IC90 moyenne (µM)
30 m	>600	>600	>600
1 h	>600	>600	>600
2 h	284±95	378,6±67	527±81
4 h	219±39	278,1±21	425±74
6 h	249±23	276,1±18	343±39
24 h	142±31	226,3±27	376±21

2.7 Transcriptome

Le RNA-seq a été employé afin d'étudier les changements d'expression génique causés par le BCP dans les cellules MG-63. Ces données permettront de fournir des pistes mécanistiques sur son mode d'action. L'extraction de l'ARN effectuée par Génome Québec sur les échantillons envoyés montre une concentration et une qualité d'ARN idéales pour l'étude du transcriptome. En effet, les concentrations obtenues sont bien supérieures à la concentration recommandée de 100 ng/µL, ce qui suggère qu'il ne devrait pas y avoir de problème quant aux quantités utilisées. De plus, le RIN de 10 chez tous les échantillons indique qu'il n'y a pas de dégradation détectable (Tableau 6).

Tableau 6. Concentration en ng/µL et numéro d'intégrité de l'ARN extrait pour chaque condition testée.

Code	Concentration de BCP (µM)	Temps d'exposition (h)	Concentration d'ARN (ng/µL)	RIN
A1	0	1	4 342,5	10
A2	0	3	4 996,5	10
A3	0	24	2 130,0	10
B1	25	1	1 818,0	10
B2	25	3	2 301,0	10
B3	25	24	2 364,0	10
C1	50	1	1 785,0	10
C2	50	3	2 358,0	10
C3	50	24	2 019,0	10
D1	100	1	1 888,5	10
D2	100	3	2 617,5	10
D3	100	24	2 359,5	10

La préparation des librairies à l'aide des séquences adaptatrices Nextera a été réalisée sur tous les échantillons. Cependant, les échantillons B2 et C3 n'ont pas atteint une concentration suffisante pour leur séquençage. À cet effet, ces deux échantillons ont été abandonnés pour l'analyse transcriptomique. Malgré tout, les autres échantillons ont des fragments dont la taille se situe entre

282 et 300 paires de base, ce qui a permis un chevauchement suffisant pour réaliser l'assemblage des fragments pour faire leur identification. Finalement, la concentration des librairies est suffisante pour effectuer le séquençage par NovaSeq X (Tableau 7).

Tableau 7. Taille et concentrations des fragments issus de la préparation des librairies à l'aide des séquences adaptatrices Nextera (ILLUMINA).

Code	Taille (pb)	Concentration par bioanalyse (ng/µL)	Concentration CQ (nM)
A1	290	6,54	259,25
A2	286	3,77	144,79
A3	285	2,1	80,01
B1	288	1,56	53,24
B2	**292**	**0,04**	**1,04**
B3	287	2,46	105,11
C1	282	3,4	148,78
C2	287	2,94	127,55
C3	**317**	**0,08**	**0,91**
D1	300	1,9	84,55
D2	300	3,03	103,38
D3	286	2,09	74,06

L'alignement et l'annotation des librairies ont été réalisés sur les 10 échantillons. Les métriques d'alignement et d'annotations indiquent des valeurs attendues avec des taux élevés d'alignement (99,01 — 99,84 %) et d'annotation (92,24 — 93,66 %) et un faible taux de mauvaises annotations (1,01 – 1,51 %) et de fragments non annotés (4,83 — 6,75 %). De plus, aucun des échantillons ne diverge des autres échantillons selon ces métriques (Tableau 8). Ainsi, aucun échantillon ne peut être reconnu comme aberrant à la suite des étapes d'alignement et d'annotation, ce qui signifie que ces échantillons peuvent être utilisés pour les analyses suivantes.

Tableau 8. Métriques d'alignement et d'annotations des fragments pour les 10 échantillons.

Code	Lectures brutes	Alignement (%)	Lectures annotées (%)	Lectures mal annotées (%)	Lectures non annotées (%)	Gènes uniques détectés	Transcrits uniques estimés
A1	48029547	99,15	93,08	1,20	5,72	23911	95043
A2	35048308	99,10	93,24	1,40	5,36	23215	89078
A3	47193455	99,16	93,17	1,18	5,65	23426	91165
B1	47352170	99,01	92,27	1,32	6,41	24335	93933
B3	47574558	99,84	93,21	1,38	5,41	23845	92014
C1	53833464	99,09	93,66	1,51	4,83	24708	98013
C2	48882492	99,07	92,57	1,36	6,07	24019	95155
D1	46328478	99,23	93,01	1,01	5,98	23822	94213
D2	48541872	99,17	92,24	1,01	6,75	23929	95096
D3	58006647	99,32	93,79	1,18	5,03	24625	97259

Afin de mieux visualiser les effets du BCP sur l'expression génique, une analyse en composantes principales a été effectuée sur les 500 gènes les plus variables au sein de nos échantillons (Figure 15). Cette analyse permet de regrouper les échantillons semblables selon les paramètres évalués. Les deux composantes principales expliquent 52 % et 28 % de la variance des échantillons. Cependant, cette analyse révèle que le temps d'exposition est le principal modulateur d'expression génique puisque chaque point se regroupe selon cette variable. Cependant, la variable concentration affecte également la variabilité, mais beaucoup moins que le temps d'exposition. Ensemble, ces variables expliquent significativement 80 % de la variance observée.

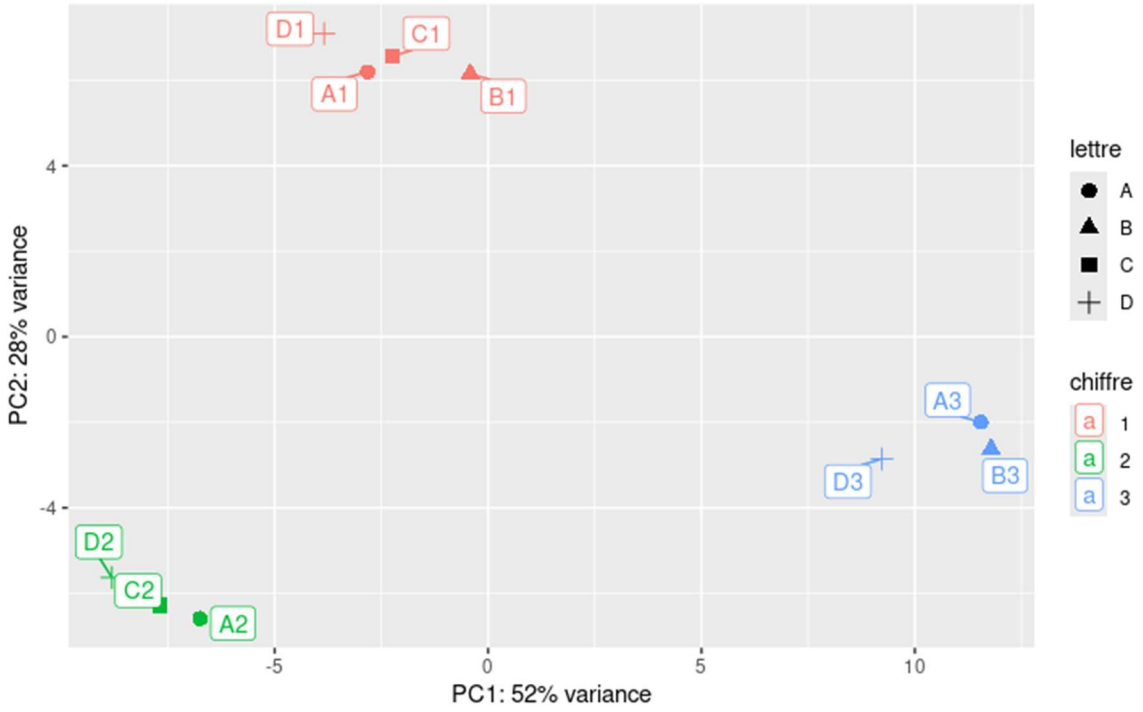

Figure 15. Analyse en composantes principales réalisée à partir des 500 comptes géniques les plus variables parmi les 10 échantillons. Les lettres indiquent la concentration en BCP (A : 0 µM, B : 25 µM, C : 50 µM et D : 100 µM), tandis que les chiffres correspondent au temps d'exposition (1 : 1 h, 2 : 3 h et 3 : 24 h).

À partir de l'analyse à l'aveugle, les 50 gènes présentant la plus grande variabilité d'expression ont été identifiés (Figure 16). L'analyse révèle ainsi des variations d'expression dépendantes de ces deux variables. Toutefois, le temps d'exposition apparaît comme le facteur principal influençant la variabilité de l'expression génique au sein des échantillons. Cet aspect est d'autant plus important qu'aucun des gènes identifiés ne varie exclusivement en fonction de la concentration. En effet, chaque condition contrôle présente un niveau d'expression distinct, dépendant du temps d'exposition. Ainsi, il est probable que les gènes identifiés soient davantage associés à la pathologie qu'à un effet direct de la concentration. Néanmoins, certains gènes, tels que NR4A2, NFKBIZ, PTGER4 et ATF3, présentent également une réponse dépendante de la dose.

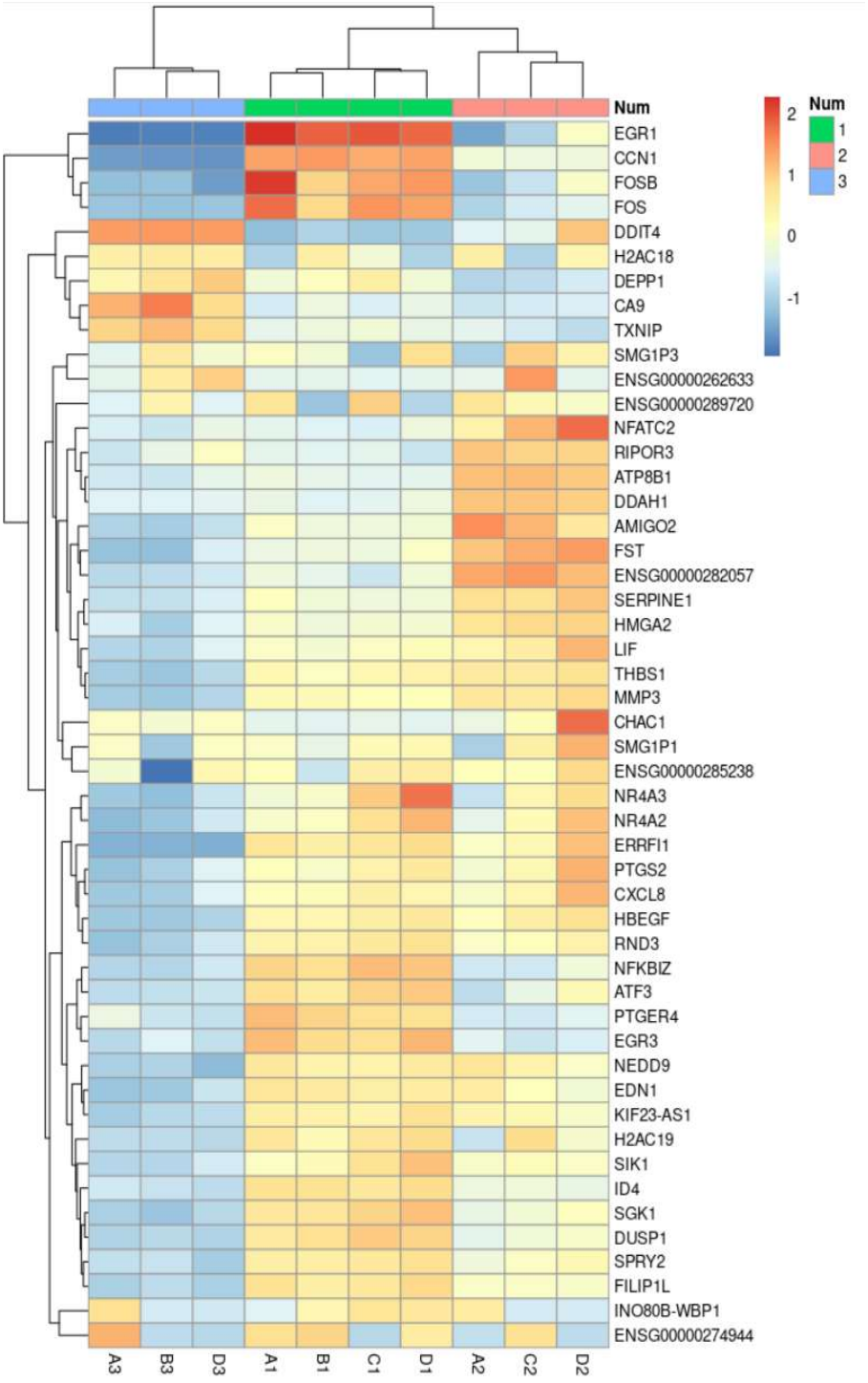

Figure 16. Regroupement hiérarchique des 50 gènes présentant la plus grande variabilité d'expression, réalisé à partir des comptes bruts des échantillons. Les lettres indiquent la concentration en BCP (A : 0 µM, B : 25 µM, C : 50 µM et D : 100 µM), tandis que les chiffres correspondent au temps d'exposition (1 : 1 h, 2 : 3 h et 3 : 24 h).

L'analyse d'expression différentielle a été réalisée sur un total de 62 700 gènes et transcrits identifiés au sein des échantillons. Au total, 7 003 gènes ont présenté des variations d'expression selon les comparaisons réalisées. Un nombre généralement plus élevé de gènes surexprimés par rapport aux gènes sous-exprimés a été observé, avec respectivement 4 261 et 2 742 gènes. Les analyses d'expression différentielle par paires n'ont toutefois pas permis d'identifier une signature robuste et clairement attribuable au traitement au BCP. Premièrement, les gènes et transcrits identifiés ne surviennent pas systématiquement dans chaque comparaison. Deuxièmement, plusieurs transcrits mis en évidence correspondent à des ARN non codants, des pseudogènes ou à des gènes exprimés de manière constitutive, tels que les histones. Ces résultats indiquent donc que cette première analyse est fortement influencée par le bruit expérimental, le temps d'exposition et les limites du design, plutôt qu'elle ne démontre un effet spécifique du BCP (Tableau 9).

Tableau 9. Tables de comptes de transcrits géniques présentant des variations d'expression selon les comparaisons réalisées.

	A1-B1	A1-C1	A1-D1	A2-C2	A2-D2	A3-B3	A3-D3
Log2 FC > 1	3 696	4 394	3 263	4 495	4 574	3 471	5 934
Log2 FC < -1	3 181	2 641	3 304	2 385	2 537	2 821	2 327
Log2 FC > 15	8	15	5	15	22	16	22
Log2 FC < -15	18	17	16	10	8	14	18

L'analyse d'expression différentielle corrigée pour le temps a pris en compte 13 143 gènes possibles. Parmi ceux-ci, un total de 2 766 gènes a présenté une association nominale avec le traitement. Après correction des valeurs p afin de réduire les faux positifs, 546 gènes candidats ont été retenus, dont 312 sont positivement régulés et 235 sont négativement régulés (Figure 17). Il faut toutefois souligner que la variance d'expression en log2 demeure très faible, se situant entre -0,02 et 0,03 pour l'ensemble des gènes. Cette faible amplitude impose une interprétation prudente, puisque la portée biologique de ces variations devra être validée par des approches indépendantes tels que la qPCR ou une analyse multiplexe via le système nCounter, qui permettent une quantification plus précise des variations d'expression.

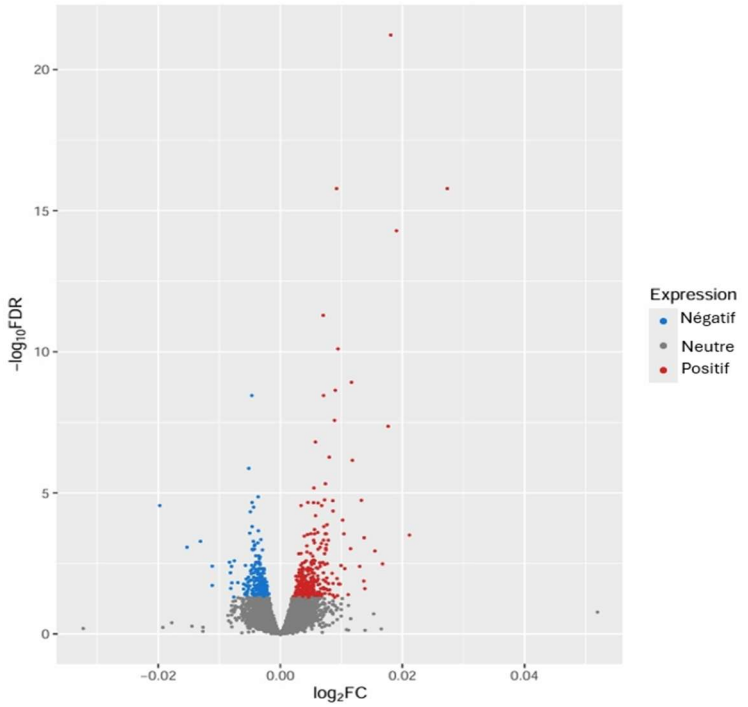

Figure 17. Diagramme en volcan des 13 143 gènes évalués dans l'analyse corrigée pour le temps en fonction de la concentration en BCP.

À partir de ces données, un regroupement hiérarchique des 50 gènes candidats présentant les plus fortes variations associées à la concentration a été réalisé (Figure 18). Dans un premier temps, un regroupement partiel des échantillons selon la concentration en BCP est observable, bien que certains échantillons contrôles se regroupent avec des échantillons traités avec de faibles concentrations de BCP. Néanmoins, un regroupement plus clair des échantillons exposés à la concentration la plus élevée de BCP est observé. Concernant le regroupement des gènes, ceux-ci sont principalement organisés en fonction de leur niveau de régulation. En effet, les dix premiers gènes correspondent à des gènes négativement régulés, tandis que les autres présentent une régulation positive. Bien que cette analyse corrige pour la variable du temps, l'influence de cette dernière sur l'expression génique demeure perceptible. Parmi les gènes retenus, certains avaient déjà été mis en évidence lors de l'analyse à l'aveugle, notamment RND3, LIF, HBEGF et SGK1, suggérant que ces gènes pourraient être à la fois exprimés de manière basale dans le modèle cellulaire et associés au traitement au BCP. Les gènes candidats remplissent diverses fonctions biologiques, incluant des facteurs de croissance, des facteurs de transcription, des modulateurs du

métabolisme et des régulateurs du cycle cellulaire. Ces observations suggèrent une tendance dépendante de la dose, mais ne permettent pas de conclure à une modulation robuste sans validation supplémentaire. Finalement, on remarque aussi que l'effet apparent du BCP sur l'expression est plus marqué pour de courtes durées et diminue pour une exposition de 24 heures.

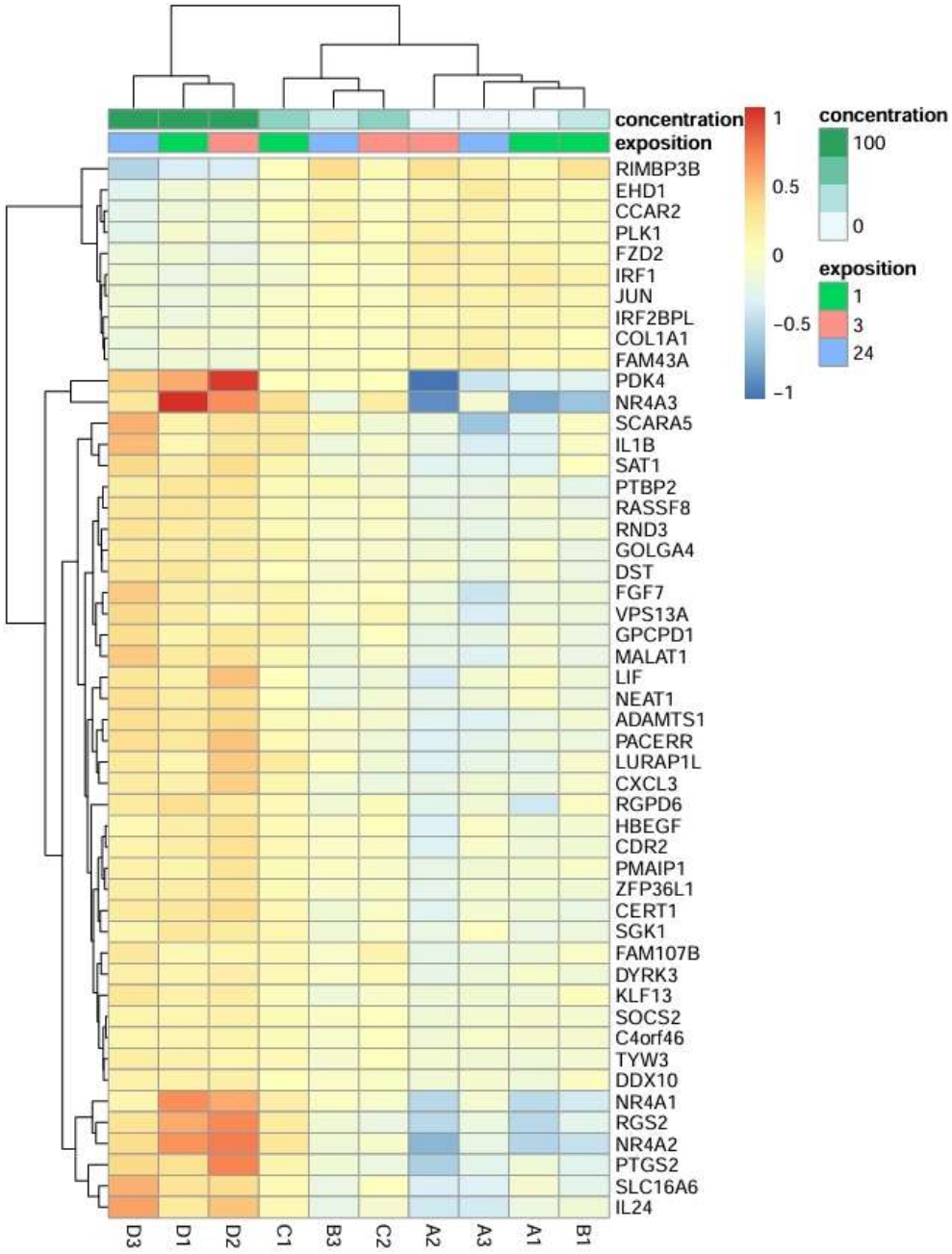

Figure 18. Regroupement hiérarchique des 50 gènes candidats présentant les plus fortes variations associées à la concentration en BCP.

Finalement, en ce qui concerne l'analyse de la monotonicité, 31 982 gènes ont été inclus dans l'analyse. Parmi ceux-ci, 1 675 gènes présentaient une valeur p nominale inférieure à 0,05. Toutefois, l'application de la correction de Benjamini-Hochberg a conduit à l'exclusion de l'ensemble de ces gènes. Malgré cela, 12 gènes présentaient une association monotone forte avec la concentration en BCP, caractérisée par un coefficient de corrélation (ρ) supérieur à 0,90. Parmi ces gènes, cinq sont régulés positivement en fonction de la concentration, tandis que les sept autres sont régulés négativement. Ces gènes doivent donc être considérés comme des candidats exploratoires présentant une tendance dose-réponse potentielle, et non comme des gènes significativement modulés de manière confirmée (Figure 19).

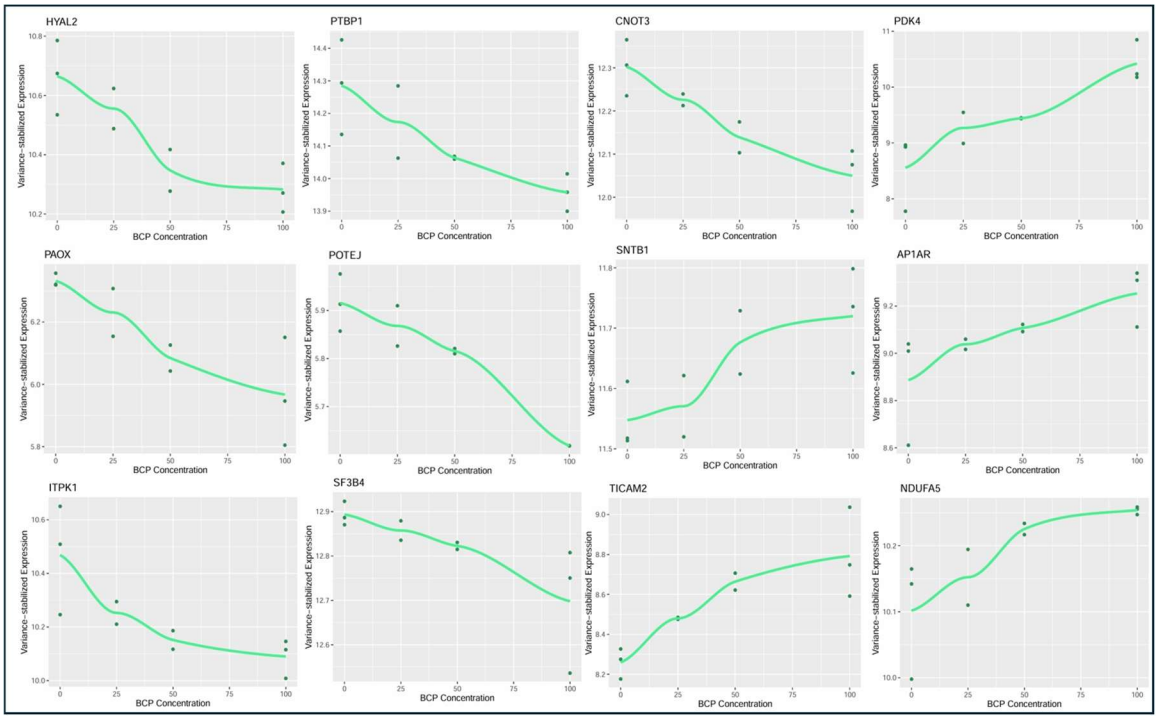

Figure 17. Graphiques de tendance illustrant la relation de monotonicité pour les 12 gènes présentant un coefficient de corrélation de Spearman (ρ) supérieur à 0,9 en fonction de la concentration en BCP.

Les résultats de cette étude ont permis d'établir un modèle cellulaire adéquat avec la lignée MG-63 à l'aide des données de criblage par qPCR, immunobuvardage de type Western et

immunofluorescence, et ce, malgré des différences significatives d'expression entre les méthodes. Aussi, sur ce modèle, une caractérisation du profil cytotoxique du BCP a été réalisée à l'aide des tests de résazurine et Hoechst afin d'établir les conditions expérimentales pour la caractérisation transcriptomique. Finalement, l'effet du BCP sur le transcriptome a été observé à l'aide des analyses à l'aveugle, des comparaisons par paires, des comparaisons corrigées par le temps ainsi que de l'analyse de la relation de monotonie.

CHAPITRE 3
DISCUSSION

3.1 Amarrage moléculaire

L'analyse d'amarrage moléculaire indique que l'ensemble des ligands testés présente une affinité pour le récepteur CB2, ce qui était attendu puisqu'il s'agit de ligands connus pour ce récepteur. Le BCP possède ainsi la structure chimique nécessaire à l'interaction avec le CB2. Des études *in silico* antérieures ont rapporté des résultats similaires, avec des énergies de liaison avoisinant les -9 kcal/mol. L'analyse a permis d'identifier plusieurs résidus impliqués dans la liaison du BCP au CB2. La majorité d'entre eux sont hydrophobes, notamment PHE91, PHE94, PHE183, PHE281, PRO184 et LEU182. Une interaction polaire a également été observée avec SER285. Deux études *in silico* ont mis en évidence des profils similaires. Par exemple, Valdivia-Padilla et collègues ont identifié une région d'interaction localisée entre les résidus 87 et 288(Valdivia-Padilla *et al.* 2025). Rava et collègues ont quant à eux observé des liaisons hydrophobes avec PHE87, PHE91, PHE94, PHE106, PHE183, ainsi qu'avec ASN90, LYS109 et VAL113 (Rava *et al.* 2025). De plus, l'une des premières études sur le BCP (Gertsch *et al.* 2008) avait prédit que le site de liaison des ligands du CB2 se situe à proximité des hélices transmembranaires III, V, VI et VII du côté extracellulaire. Les résultats obtenus ici appuient ceci en prédisant que la poche de liaison se retrouve à la jonction des régions extracellulaires et des domaines transmembranaires II, III et VII, zones essentiellement hydrophobes accessibles à la surface des cellules. Un autre élément notable de cette analyse est que le BCP semble présenter une affinité plus élevée que le ligand endogène 2-AG, comme en témoigne une énergie de liaison plus faible. Bien qu'aucune autre étude n'ait rapporté ce phénomène, Gertsch et collègues avaient observé que le BCP pouvait, de manière dose-dépendante, déplacer le CP 55,940 du récepteur CB2. Ceci est intéressant puisqu'il s'agit d'un dérivé du THC qui a une forte affinité pour le CB2. Ainsi, il n'est pas exclu que le BCP puisse présenter une meilleure affinité pour le CB2 que le 2-AG ou un autre ligand endogène. Il convient néanmoins de souligner certaines limites de cette

analyse. L'utilisation de plusieurs approches d'amarrage aurait permis de mieux caractériser les interactions clés entre le CB2 et le BCP. De plus, restreindre la recherche au site de liaison du WIN 55,212-2 a pu introduire un biais. Enfin, les structures cristallographiques disponibles dans les bases de données présentent des résolutions limitées susceptibles d'affecter la précision des résultats. Il faudrait donc des études *in vitro* pour confirmer ces résultats. Néanmoins, l'analyse d'amarrage moléculaire indique que le BCP a une affinité de liaison pour le récepteur CB2, en accord avec les attentes.

3.2 qPCR

Les résultats de qPCR révèlent que, parmi les sept lignées criblées, quatre semblent présenter une expression détectable du gène CNR2 qui code pour le récepteur CB2. Ces lignées sont HL-60, Jurkat, MCF7 et MDA-MB-231. Cette observation est cohérente avec le fait que CNR2 est principalement et fortement exprimé dans les lignées d'origine immunitaire (Rayman *et al.* 2004; Bie *et al.* 2018). Pour ce qui est des deux lignées de cancer du sein, une transcription significativement moins élevée a été observée. Or, selon les données récentes issues du portail DepMap (Arafeh *et al.* 2025; Broad 2025), l'expression de ce gène devrait se limiter aux lignées HL-60 et Jurkat et être absente dans les autres lignées cellulaires cancéreuses (Figure 18). Malgré cela, l'expression de ce gène a déjà été documentée pour ces lignées dans une autre étude (Akimov *et al.* 2024). Concernant les lignées HepG2 et MG-63, celles-ci apparaissent dépourvues d'expression du gène CNR2 tel qu'inscrit sur le portail DepMap. Cependant, deux études ont rapporté une transcription mesurable dans ces lignées (Punzo *et al.* 2017; Scandiffio *et al.* 2023). Ces divergences pourraient être attribuées à la nécessité d'un stimulus inducteur ou à des mécanismes de régulation épigénétique. Enfin, la lignée WS1 ne semble pas exprimer le gène.

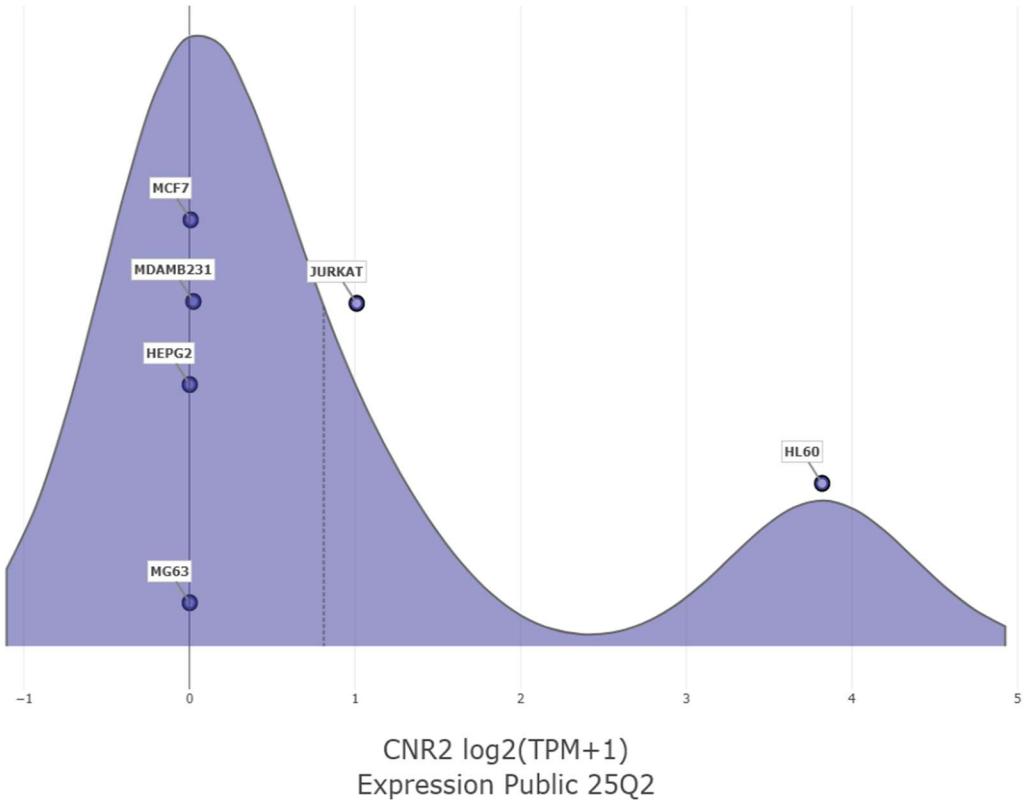

Figure 18. Expression du gène CNR2 (valeurs log2) pour les lignées HL-60, Jurkat, MCF7, MDA-MB-231, HepG2 et MG-63, selon les données publiques DepMap (25Q2).

Il convient néanmoins de souligner certaines limites méthodologiques. Premièrement, l'approche repose sur une quantification relative, impliquant l'hypothèse d'une expression stable des gènes de référence entre les lignées. Deuxièmement, elle suppose une efficacité d'amplification optimale, avec un doublement de la quantité d'ARNm à chaque cycle, ce qui peut faire varier les niveaux d'expression et changer les interprétations. Également, l'amorce utilisée amplifie seulement la partie codante du gène étant donné la structure particulière du gène CNR2. Ceci peut causer une amplification de l'ADN génomique dans le cas où celle-ci n'a pas été complètement digérée pendant le protocole. Afin d'améliorer le criblage de l'expression génique du CB2, il serait possible d'envisager l'utilisation de l'hybridation *in situ* qui est une méthode complémentaire permettant d'observer l'expression réelle et d'informer sur la localisation du gène. Néanmoins, la stratégie employée est une méthode standard pour identifier et comparer, de manière relative, les lignées exprimant un gène.

3.3 Immunobuvardage de type western

L'immunobuvardage de type western semble indiquer que l'expression du récepteur est répandue dans les sept lignées cellulaires étudiées. Malgré la détection, il est possible d'observer une variation d'expression entre les lignées cellulaires, ce qui pourrait altérer la signalisation cellulaire. Cet aspect est particulièrement intéressant, étant donné le manque d'informations sur l'expression protéique du CB2 dans les banques de données publiques, telles que le Human Protein Atlas (Ponten *et al.* 2008). En revanche, il n'est pas exclu que l'observation d'expression protéique chez tous les modèles soit causée par une reconnaissance non spécifique de l'anticorps. En effet, la production d'anticorps spécifiques pour les GPCR tels que le récepteur CB2 est difficile en raison des similarités de séquence et de structure entre ceux-ci (Webb *et al.* 2013). Aussi, la technique utilisée ne permet pas de distinguer entre l'expression cytoplasmique et l'expression membranaire du récepteur. Cependant, aucune interaction croisée n'a été caractérisée à ce jour avec l'anticorps utilisé. Ensuite, la quantification réalisée est relative et repose sur la normalisation par rapport à une protéine de référence, dont l'expression peut varier entre les lignées cellulaires, malgré l'hypothèse d'une stabilité relative. Pour renforcer la robustesse des conclusions, il serait pertinent de combiner un essai de protection à la protéase avec une quantification absolue par ELISA. Cette approche permettrait à la fois de déterminer précisément l'abondance du CB2 et de localiser son expression. Néanmoins, les résultats indiquent qu'il a été possible de quantifier relativement l'expression du récepteur CB2 chez les sept lignées cellulaires étudiées.

3.4 Immunofluorescence

La détection du CB2 par immunofluorescence a été réalisée sur six des sept lignées cellulaires, soit HepG2, HL-60, Jurkat, MCF7, MG-63 et WS1. Conformément aux résultats obtenus par immunobuvardage de type western, un signal compatible avec la présence de la protéine a été observé dans l'ensemble de ces lignées, apportant un appui supplémentaire, mais non définitif, à son

expression. Sur le plan qualitatif, des variations d'intensité de fluorescence ont pu être observées. Les lignées HepG2, MG-63 et WS1 présentent une fluorescence marquée, alors que HL-60, Jurkat et MCF7 montrent un signal plus faible. Ces observations concordent également avec les résultats d'immunobuvardage. Toutefois, l'immunofluorescence demeure une approche essentiellement qualitative et ne permet pas de conclure quant à la localisation du récepteur, d'autant plus qu'une perméabilisation des membranes cellulaires a été réalisée à l'aide d'un détergent. Il convient également de noter que la lignée MDA-MB-231 n'a pas été incluse dans ces analyses, ce qui limite la portée des conclusions tirées de l'immunofluorescence. Par ailleurs, la mise en parallèle de cellules perméabilisées et non perméabilisées aurait constitué une approche pertinente pour préciser la localisation du CB2.Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent la présence d'une expression du récepteur chez les six lignées étudiées, tout en nécessitant une confirmation par des contrôles additionnels de spécificité et de localisation membranaire.

3.5 Choix du modèle cellulaire

Le choix du modèle cellulaire pour cette étude reposait initialement sur le criblage du récepteur CB2 au niveau génique et protéique. Toutefois, les divergences d'expression obtenues par les techniques complexifient la décision puisque dans la majorité des cas les deux types d'expression corrèlent. Afin de confirmer qu'il ne s'agit pas d'un problème méthodologique lié au choix des amorces et des anticorps, les mêmes approches de criblage ont été répétés à l'aide d'une autre amorce ciblant le gène CNR2 (Vara et al. 2011) ainsi qu'un autre anticorps ciblant le CB2 (sc-293188). La réplication de ces tests indique des résultats similaires semblant écarter cette hypothèse. Au niveau biologique, ces observations pourraient être expliquées par la persistance des récepteurs malgré une forte régulation transcriptionnelle. En effet, il est bien documenté que de nombreux GPCR présentent une expression génique relativement faible alors qu'ils sont exprimés abondamment. C'est notamment le cas du récepteur du glucagon GLP-1R, dont la faible expression dans les cellules β peut entraîner des événements de non-détection « dropout events » en séquençage unicellulaire (Gray et al. 2020).

Un autre résultat notable est la relation inversement proportionnelle observée entre l'expression du gène et celle de la protéine, qui pourrait être expliquée par une régulation cyclique. Dans ce contexte, il apparaît essentiel que toute étude portant sur le CB2 valide sa présence au niveau protéique, plutôt qu'uniquement au niveau génique. Ainsi, pour le choix du modèle cellulaire la présence protéique a été privilégiée. Parmi les choix, les lignées HepG2, MG-63 et MCF7 se distinguent par un niveau d'expression plus élevé. Toutefois, la lignée MG-63 a été choisie comme modèle, car l'expression du CB2 y apparaît plus stable que dans la lignée MCF7, caractérisée par une forte variabilité, et parce que les cellules HepG2 forment des amas denses susceptibles de biaiser les analyses cinétiques. Ainsi, la lignée MG-63 a été retenue pour les analyses cinétiques et transcriptomiques. Ce choix s'avère d'autant plus pertinent qu'il est appuyé par plusieurs travaux antérieurs sur le rôle du récepteur CB2 dans les cellules osseuses et les modèles d'ostéosarcome. En premier lieu, des études ont mis en évidence l'implication du CB2 dans la physiologie osseuse et son potentiel en tant que cible thérapeutique pour l'ostéoporose (Ofek et al. 2006; Hu et al. 2024). D'autres recherches se sont intéressées aux effets du BCP sur des cellules osseuses saines, fournissant ainsi des données comparatives pertinentes (Yamaguchi et Levy 2016; Shan et al. 2017). En second lieu, Punzo et collègues ont rapporté une expression du CB2 dans plusieurs lignées d'ostéosarcomes, dont MG-63, et ont démontré que son activation par l'agoniste JWH-133 induit une activité antiproliférative, proapoptotique et anti-invasive (Punzo et al. 2017). Les ostéosarcomes touchent principalement les adolescents et les jeunes adultes. Ces cancers, particulièrement agressifs, présentent une forte propension à la dissémination métastatique, ce qui compromet considérablement le pronostic des patients (Brar et al. 2025). Dans cette perspective, l'étude du BCP est particulièrement intéressante, car plusieurs travaux lui attribuent des propriétés antiprolifératives et un effet inhibiteur sur la propagation métastatique (Jung et al. 2015; Dahham et al. 2021; Ahmed et al. 2022). Ces observations rejoignent celles obtenues dans d'autres cancers exprimant le CB2, notamment dans le cancer du poumon non à petites cellules, ou son activation réduit la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Preet et al. 2011). Tel que mentionné, la lignée cellulaire MG-63 a été choisie à parce qu'elle semble exprimer abondamment le CB2. Or, la présence du CB2 sur le modèle choisi est toujours en question. Cependant, l'incertitude entourant la présence fonctionnelle de ce

récepteur doit être clairement reconnue. Si le récepteur est absent ou peu fonctionnel dans ce modèle, les résultats transcriptomiques demeurent utiles pour caractériser la réponse au BCP, mais ils ne pourront pas être interprétés comme la preuve d'un mécanisme dépendant de CB2 sans validation supplémentaire.

3.6 Cinétique

Il a été possible d'évaluer la cytotoxicité du BCP sur le modèle MG-63 pour des concentrations comprises entre 0 à 600 µM et des temps d'exposition variant de 30 min à 24 heures, à l'aide des tests de résazurine et Hoechst. Ces analyses ont permis de construire des courbes de survie à partir desquelles les IC20, IC50 et IC90 ont été déterminées pour chaque durée d'exposition. Comme attendu, la viabilité cellulaire a diminué de manière progressive en fonction de la concentration et du temps d'exposition, les valeurs d'IC les plus élevées étant observées après 24 heures. Dans la littérature, plusieurs études ont rapporté des valeurs d'IC50 du BCP sur différentes lignées cellulaires cancéreuses et normales. Par exemple, Dahham et collègues ont observé des IC50 variant de 29 à 285 µM pour sept lignées cancéreuses, et de 156 à 162 µM pour trois lignées cellulaires normales (Dahham *et al.* 2015). Par ailleurs, une étude menée sur les glioblastomes U373 et U87 a rapporté des IC50 respectifs de 150 et 175 µM, tout en notant un arrêt de prolifération dès 50 µM (Irrera *et al.* 2020). Ces résultats mettent en évidence une certaine variabilité de la toxicité du BCP selon la lignée cellulaire étudiée, ce qui est attendu. Toutefois, Annamalai et collègues ont mesuré un IC50 avoisinant 20 µM chez la lignée MG-63, soit environ dix fois inférieur à notre estimation (Annamalai *et al.* 2020). Cette divergence est intrigante puisque les tests de résazurine et Hoechst, utilisés dans notre étude, reposent sur des principes distincts, mais conduisent à des valeurs d'IC similaires. Une différence méthodologique pourrait expliquer cet écart, notamment en lien avec la formulation du BCP ou avec l'utilisation du test MTT. Le fait que les deux tests employés donnent des résultats concordants suggère que le BCP n'agit pas comme un composé purement cytostatique. La baisse de viabilité observée résulterait davantage d'un effet antiprolifératif ou cytotoxique. Or, puisque l'effet

augmente avec le temps d'exposition, il est plus probable qu'il s'agisse d'une action de nature antiproliférative. En effet, Ramachandhiran et collègues ont proposé que le BCP induit l'apoptose dans la phase G1 du cycle cellulaire (Ramachandhiran *et al.* 2022). Des résultats similaires ont également été rapportés pour d'autres agonistes du CB2 (Capozzi *et al.* 2018). La méthodologie utilisée présente toutefois plusieurs limites qui restreignent la portée des conclusions. Premièrement, elle ne permet pas de déterminer si le BCP exerce une sélectivité particulière envers les cellules exprimant le récepteur CB2. Deuxièmement, elle ne couvre pas de durées d'exposition supérieures à 24 h et explore une plage de concentrations relativement restreinte. Troisièmement, elle ne fournit pas d'informations précises sur le mode d'action cytotoxique du composé. Enfin, elle ne permet pas de rendre compte de l'hétérogénéité des réponses cellulaires face au BCP. Pour répondre à ces limites, il serait pertinent d'élargir l'étude à des lignées n'exprimant pas le CB2, d'éliminer l'expression par knock-out ou de combiner d'agonistes et antagonistes spécifiques pour le CB2. L'évaluation du mode d'action pourrait être approfondie à l'aide de tests complémentaires visant à identifier le type de mort cellulaire induit. Cependant, l'analyse transcriptomique devrait également fournir des hypothèses éclairées sur les mécanismes impliqués. Aussi, bien que l'étude n'ait pas exploré de très larges plages de concentration et de temps d'exposition, il faut rappeler qu'en contexte *in vivo*, des conditions extrêmes entraînent souvent des effets indésirables ou une absence d'activité pharmacologique. Ainsi, l'élargissement de ces paramètres pourrait donc présenter un intérêt limité. Malgré ces contraintes, les résultats obtenus ont permis d'atteindre le deuxième objectif fixé, en identifiant des concentrations de BCP associées à une cytotoxicité négligeable, utilisables pour les analyses transcriptomiques. À cet effet, les conditions retenues sont 25, 50 et 100 µM pour des temps d'exposition de 1 h, 3 h et 24 h.

3.7 Transcriptome

L'avantage d'une analyse transcriptomique dans la détermination du mode d'action d'un composé pharmaceutique est qu'il s'agit d'une approche non biaisée (Mashima et al. 2015). En effet, elle permet de réaliser un criblage des gènes susceptibles d'être modulés en fonction de la présence du

composé. Pour cette étude, deux échantillons n'ont pas atteint les standards de qualité requis pour les analyses suivantes. Ces pertes ne sont pas idéales, puisqu'elles réduisent considérablement la taille de l'échantillon et rendent les analyses différentielles beaucoup moins robustes. Cela a pour conséquence d'augmenter la probabilité d'identifier des faux positifs parmi les gènes candidats. Cependant, il s'agit d'échantillons intermédiaires, et leur perte n'empêche pas de visualiser les tendances d'expression. Une autre limite de notre méthodologie est le manque de réplicats biologiques, ce qui empêche de confirmer la significativité des analyses différentielles par paires. Ainsi, il convient de considérer que tous les résultats obtenus sont préliminaires puisque la variabilité d'expression génique au sein des échantillons n'a pas été évaluée. Ceux-ci devront être validés par des méthodes indépendantes telles que la PCR quantitative. L'analyse à l'aveugle a d'abord révélé de nombreux gènes différentiellement exprimés au sein des échantillons. Toutefois, la variance d'expression semble majoritairement associée au facteur du temps d'exposition plutôt qu'à la concentration du BCP. Ceci est illustré par l'absence de cohérence d'expression au sein des contrôles sans traitement, ainsi que par le fait qu'aucun des gènes identifiés ne varie exclusivement en fonction de la concentration. Cette observation suggère que les gènes candidats identifiés par cette approche sont principalement associés à l'évolution temporelle normale des cellules MG-63. Cette hypothèse est appuyée par le fait que plusieurs gènes sont associés à des processus pathologiques. Par exemple, une modulation temporelle est observée pour des gènes impliqués dans le processus métastatique, notamment via l'angiogenèse et le détachement cellulaire, tels que CCN1, AMIGO2, THBS1 et NEDD9 (Habel et al. 2019; Jian et al. 2019; Zheng et al. 2021; Yasin et al. 2024). On observe également une variation d'expression dans la voie de signalisation des prostaglandines, avec les gènes PTGS2, PTGER4, CXCL8 et MMP3, dont l'expression augmente en fonction du temps de croissance cellulaire. La surexpression de ces gènes est associée à la carcinogenèse dans plusieurs types de cancers et peut favoriser l'angiogenèse dans les tumeurs solides, telles que les ostéosarcomes (Qu et Liu 2015). Ces résultats étaient attendus, étant donné que les études transcriptomiques sont couramment utilisées pour analyser les dynamiques d'expression génique associées à des processus oncologiques tels que la carcinogenèse, l'angiogenèse et la résistance aux traitements. (Fu *et al.* 2025). Cependant, cela soulève un problème, car il s'agit ici d'un modèle

cellulaire simple, et l'effet du BCP sur le transcriptome est nettement inférieur à celui des processus cellulaires basaux. Ainsi, cela met en évidence l'importance du design expérimental afin de bien isoler l'effet des variables étudiées. Par ailleurs, notre analyse en composantes principales suggère que les deux facteurs étudiés expliquent environ 80 % de la variance génique observée. Les 20 % restants peuvent être attribués à divers facteurs, tels que l'hétérogénéité cellulaire (état du cycle cellulaire, métabolisme, stress basal), la variabilité technique, ainsi que le caractère stochastique de la transcription. En effet, le processus de transcription génique est un processus dynamique, influencé par de multiples facteurs et susceptible de changements rapides ou plus lents (Rodrigues et al. 2019; Yamada et Akimitsu 2019). Ainsi, lors des validations d'expression, il est important de contrôler le facteur temporel en maintenant un temps d'exposition constant, puisqu'il s'agit de la variable ayant le plus grand impact transcriptomique. Dans le cadre d'une étude similaire réalisée sur un modèle plus complexe, tel qu'une tumeur, il est probable que l'hétérogénéité cellulaire masque complètement l'effet d'un composé sur le transcriptome. Une approche permettant de réduire ce bruit pourrait consister à faire un séquençage de l'ARN à cellule unique, comme cela a déjà été réalisé dans d'autres études (Zhang *et al.* 2021). Cette méthode permettrait de mieux évaluer les conditions nécessaires pour qu'une cellule cancéreuse réponde au traitement.

Les comparaisons différentielles par paires entre échantillons n'ont pas permis d'établir de façon robuste une liste de gènes spécifiquement associés à la présence du BCP. Cette limite découle principalement de l'absence de réplicats biologiques, qui empêche d'estimer correctement la variance expérimentale et de calculer des valeurs p fiables pour les gènes. Même pour les gènes les plus variables, la cohérence de l'expression génique entre comparaisons demeure limitée, ce qui rend difficile l'identification de tendances reproductibles. De plus, plusieurs transcrits détectés correspondent à des pseudogènes ou à des gènes exprimés de manière constitutive plutôt qu'à des gènes directement associés au traitement. Il est donc préférable d'interpréter ces comparaisons comme une analyse exploratoire mettant en évidence les limites du jeu de données, plutôt que comme une base suffisante pour tirer des conclusions mécanistiques.

À l'inverse, l'analyse d'expression différentielle corrigée pour le temps a permis de retenir 546 gènes candidats associés à la concentration de BCP après correction des valeurs p. Cette observation doit toutefois être interprétée avec prudence. En effet, la variation d'expression en log2 demeure très faible, comprise approximativement entre -0,02 et 0,03, ce qui limite la portée biologique immédiate des différences observées. Il est possible que cette faible amplitude reflète un effet modeste du BCP dans les conditions utilisées, un effet partiellement masqué par la correction pour le temps, ou encore les limites statistiques liées au design expérimental. Le regroupement hiérarchique des 50 gènes candidats les plus fortement associés à la concentration suggère néanmoins que la correction a permis de faire ressortir une structure liée au traitement, surtout pour les échantillons exposés à 100 µM de BCP. Ces observations justifient l'intérêt de l'analyse, car elles permettent de prioriser des processus biologiques plausibles plutôt que de conclure directement à une modulation robuste. Parmi les gènes retenus, certains avaient déjà été mis en évidence lors de l'analyse à l'aveugle, notamment RND3, LIF, HBEGF et SGK1, suggérant que ces gènes pourraient être à la fois exprimés de manière basale dans le modèle cellulaire et associés au traitement. Les réseaux STRING construits à partir des gènes sous-exprimés et surexprimés constituent donc des outils d'interprétation exploratoire permettant de regrouper les candidats selon des fonctions biologiques potentielles (Szklarczyk et al. 2024). Le premier réseau, fondé sur les gènes sous-exprimés, suggère une diminution de l'expression de gènes liés au cycle cellulaire, au métabolisme du carbone et à la biosynthèse du cholestérol (Figure 21). Cette tendance est compatible avec une réduction de la croissance, un ralentissement du cycle cellulaire ou une reprogrammation métabolique du modèle MG-63. Elle rejoint partiellement les observations d'autres travaux ayant rapporté un arrêt du cycle, notamment en phase G1, dans différents modèles cellulaires traités par le BCP ou par des agonistes du CB2 (Sarfaraz et al. 2006; Irrera et al. 2020; Ramachandhiran et al. 2022). La baisse apparente de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol est également intéressante, mais elle demeure à confirmer et pourrait impliquer plusieurs voies de signalisation, notamment AMPK, FOXO1 ou SREBP-1c (Kamikubo et al. 2016).

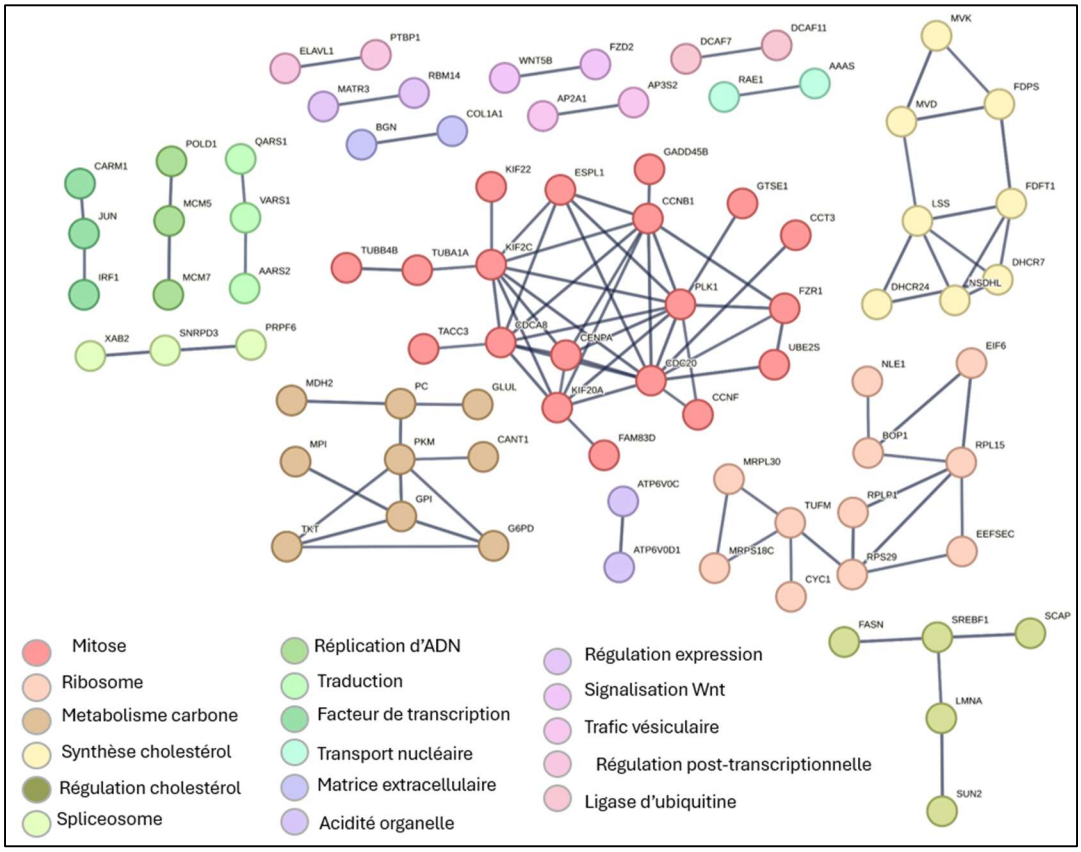

Figure 19. Réseau STRING des gènes sous-exprimés identifiés par l'analyse différentielle corrigée pour le temps.

Le deuxième réseau STRING, construit à partir des gènes surexprimés, suggère une augmentation de l'expression de gènes associés à l'inflammation, à la voie calcineurine/NFAT, à l'adaptation au stress, à l'autophagie et à d'autres fonctions diverses (Figure 22). Au niveau de l'activité pro-inflammatoire, une augmentation de l'expression de gènes liés aux prostaglandines et à NF-κB est observée, notamment PTGS2, PLA2G4A, IL6, CXCL2, CXCL3, IL1B et CXCL5, qui codent pour des médiateurs associés à la chimioattraction de neutrophiles et de macrophages (Mao et al. 2025). Bien qu'il s'agisse d'une signature compatible avec une réponse inflammatoire, il est impossible de déterminer, à partir de ces seules données, si cette réponse favorise ou nuit à la tumorigenèse du modèle. L'augmentation apparente de gènes associés à la voie calcineurine/NFAT est particulièrement intéressante, car aucun lien clair n'a encore été établi entre le BCP et cette voie. Au niveau du stress, l'augmentation de EIF2AK3 et NFE2L2, codant respectivement pour PERK et

NRF2, suggère une réponse au stress du réticulum endoplasmique et au stress oxydatif (Cullinan et al. 2003). Cette observation est cohérente avec des travaux associant le BCP à la modulation de NRF2, mais elle devra être confirmée au niveau protéique et fonctionnel (Assis et al. 2014; Mohamed et al. 2022; Rathod et Agrawal 2025). Enfin, l'expression de RB1CC1, GABARAPL1, TBC1D15 et TAX1BP1 suggère une activation possible de processus d'autophagie. En contexte oncologique, cette interprétation doit demeurer prudente, puisque l'autophagie peut autant contribuer à la suppression tumorale qu'à la survie cellulaire sous stress (Jalali et al. 2025).

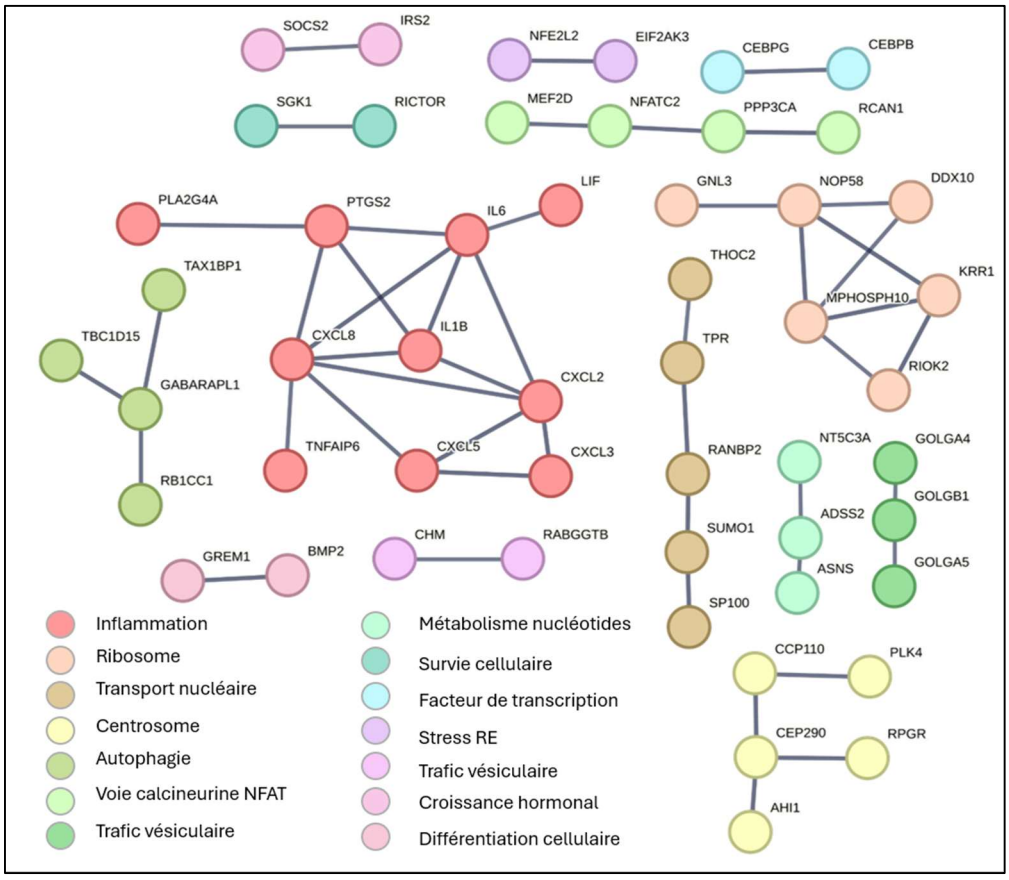

Figure 20. Réseau STRING des gènes surexprimés identifiés par l'analyse différentielle corrigée pour le temps.

L'analyse de monotonicité n'a pas permis d'identifier de gènes significatifs après correction pour comparaisons multiples. Cependant, certains gènes identifiés précédemment présentent une forte corrélation avec la concentration de BCP et peuvent être considérés comme des candidats d'intérêt.

Parmi eux, ITPK1 présente une expression réduite en fonction de la concentration. ITPK1 est à la fois une kinase et une phosphotransférase impliquée dans la formation de phosphates d'inositol, molécules pouvant moduler des canaux Cl- dépendants du calcium et participer à certains processus de mort cellulaire comme la nécroptose (Chamberlain et al. 2007; Shears 2009). Aucun lien direct n'a toutefois été établi entre le BCP et ITPK1, les canaux Cl- dépendants du calcium ou la nécroptose. Ces observations doivent donc être considérées comme des hypothèses à explorer. À l'inverse, PDK4 présente une expression augmentant avec la concentration de BCP. PDK4, en phosphorylant la pyruvate déshydrogénase, peut réduire l'entrée du pyruvate dans le cycle de l'acide citrique et favoriser une reprogrammation du métabolisme énergétique. Même si aucune donnée ne relie directement PDK4 au BCP, cette piste demeure pertinente puisque le système endocannabinoïde peut moduler le métabolisme des cellules cancéreuses, possiblement par la voie AMPK (Dando et al. 2013; Sun et al. 2023).

En résumé, cette étude repose sur l'hypothèse principale que le BCP emprunte, au moins en partie, la voie de signalisation du récepteur CB2. Or, la présence fonctionnelle de ce récepteur dans le modèle MG-63 demeure incertaine en raison des divergences observées lors du criblage. Cette incertitude constitue une limite importante, car elle empêche d'attribuer les variations transcriptomiques observées à une signalisation dépendante du CB2. Si le récepteur est absent, faiblement exprimé ou non fonctionnel dans ce modèle, la faible réponse biologique au traitement pourrait s'expliquer par une activité indépendante du CB2 ou par l'implication d'autres cibles du BCP. Cette limite ne diminue pas l'intérêt de l'étude, mais elle en précise la portée : les résultats obtenus doivent être considérés comme une cartographie exploratoire de la réponse au BCP dans MG-63 plutôt que comme une démonstration d'un mécanisme CB2-dépendant. Il est néanmoins intéressant de noter que certaines observations se rapprochent de celles obtenues par Annamalai et collègues, qui ont rapporté une activité antiproliférative du BCP sur MG-63 impliquant les ROS et la voie JAK1/STAT3 (Annamalai et al. 2020). Les différences entre les gènes identifiés dans cette étude et ceux rapportés dans la littérature pourraient être liées aux conditions expérimentales, aux concentrations utilisées, au temps d'exposition ou au design volontairement conservateur de

l’analyse. Les gènes candidats devront donc être validés par des méthodes indépendantes, comme la RT-qPCR, l’immunobuvardage ou des essais fonctionnels ciblant le cycle cellulaire, les ROS, l’autophagie et l’inflammation. De plus, l’implication du récepteur CB2 devra être vérifiée par l’utilisation d’antagonistes sélectifs, tels qu’AM630, ou par des approches de réduction ou d’abolition de l’expression de CNR2. Ces validations permettront de distinguer les effets réellement liés au BCP, les réponses propres au modèle MG-63 et les mécanismes potentiellement dépendants de CB2.

CHAPITRE 4
MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 Analyse d'amarrage moléculaire entre le BCP et le récepteur CB2

Étant donné que le BCP est supposé agir par le récepteur CB2, une vérification *in silico* de son affinité pour ce récepteur a été réalisée. Une analyse a été réalisée à l'aide du logiciel AutoDock VINA, en utilisant une méthode semi-flexible (Trott et Olson 2010). Cette méthode implique que la flexibilité est permise uniquement pour le ligand tandis que le récepteur est considéré comme rigide. Ceci permet une analyse plus rapide tout en conservant une certaine précision dans l'exploration des conformations du ligand. L'analyse a été menée sur le récepteur CB2 humain (PDB : 5ZTY et PDB 6PT0), dont la structure cristalline présente une résolution de 2,8 Å et 3,2 Å respectivement (Li et al. 2019; Xing et al. 2020). L'étude s'est concentrée sur le site de liaison du ligand WIN 55,212-2 et a porté sur quatre ligands. Premièrement, il y a le BCP qui est notre ligand d'intérêt, l'AM630 qui est un antagoniste du CB2, 2-arachidonylglycérol (2-AG), un ligand endogène du récepteur et le WIN 55,212-2 qui est un ligand synthétique utilisé comme contrôle positif.

4.2 Culture cellulaire

Pour obtenir un modèle d'étude adéquat, un criblage du récepteur CB2 a été fait sur sept lignées cellulaires. Les lignées ont été choisies de façon à avoir une grande diversité phénotypique et maximiser les chances d'observer le récepteur chez un modèle. Ces lignées ont été obtenues chez l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, É.-U.). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (ANNEXE 4) supplémenté avec 1 % v/v vitamines et 1 % v/v pénicilline et streptomycine ainsi que du sérum de veau fœtal tel que recommandé par ATCC (ANNEXE 4). La culture cellulaire s'est faite dans des boites T75 et a été incubée à 37 °C, dans une atmosphère humidifiée contenant

5 % de CO2. Les passages cellulaires ont été faits lorsque les lignées atteignaient une confluence dépassant 80 %. Pour les cellules adhérentes, de la trypsine (ANNEXE 4) a été utilisée pour le détachement, tandis que les passages cellulaires pour les cellules non adhérentes ont été faits sans trypsine (Tableau 100).

Tableau 10. Liste de cellules utilisées, incluant le type cellulaire, leur adhérence, leur numéro d'identification ATCC ainsi que les concentrations de sérum de veau fœtal requises pour leur croissance.

Lignées	Types	Adhérence	ATCC	Concentration de sérum de veau fœtal
WS1 (Contrôle)	Fibroblaste de peau	OUI	CRL-1502	10 %
HL-60	Leucémie aiguë promyélocytaire	NON	CCL-240	20 %
MDA-MB-231	Adénocarcinome mammaire	OUI	HTB-26	10 %
MCF7	Adénocarcinome mammaire	OUI	HTB-22	10 %
MG-63	Ostéosarcome	OUI	CRL-1427	10 %
HEPG2	Carcinome hépatocellulaire	OUI	HB-8065	10 %
Jurkat E6.1	Leucémie aiguë de lymphocyte T	NON	TIB-152	10 %

4.3 Détection du récepteur CB2 par PCR quantitative

Un criblage du récepteur CB2 a été fait par PCR quantitative. L'extraction de l'ARN a été réalisée en utilisant la trousse RNeasy® mini kit (ANNEXE 4) à partir de 1 × 10^7 cellules. À la suite de l'extraction, la pureté et la concentration en ARN ont été évaluées à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, Mass, É.-U.). Seuls les échantillons ayant un ratio d'absorbance à 260 nm/280 nm se situant entre 1,8 et 2,2 ont été conservés. Ensuite, une transcription inverse a été réalisée avec la trousse de transcription inverse QuantiTect® reverse transcription kit (ANNEXE 4). Pour chaque échantillon, 125 ng d'ARN a été utilisé pour former l'ADN complémentaire. Pour l'analyse qPCR, la lecture d'amplification a été réalisée à l'aide du QuantStudio5 (Thermo Fisher, Waltham, Mass, É.-U.). La méthode d'amplification consiste de 40 cycles d'amplification qui commence par la dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 15 secondes suivit de l'hybridation à 60 °C pendant 15 secondes et se termine par l'élongation des brins à 72 °C pendant 1 minute. Afin de s'assurer de la qualité de l'analyse, les courbes de fusion pour chaque

échantillon ont été vérifiées. Un volume de réaction total de 10 µL a été utilisé. Celui-ci contient les amorces sens et anti-sens à 0,5 µM, 2 µL de ADNc (dilué 1 :10), 5 µL de PowerSYBR® Green PCR Master Mix (ANNEXE 4) complété avec de l'eau exempte d'ARNase. Pour chaque expérience des contrôles ont été utilisés afin de garantir qu'il n'y ait pas eu de contamination. Ces contrôles incluent une amplification sans ADNc ainsi qu'une amplification sans milieu réactionnel pour chaque échantillon. Pour chaque lignée des triplicats techniques et biologiques ont été réalisés. L'ADNc du gène CNR2 a été amplifié en utilisant des amorces se liant au gène CB2 humain (Tableau 11). Une normalisation ΔΔ CT a été faite afin d'obtenir l'expression relative du gène CB2 entre nos lignées cellulaires telle que décrite par Sincennes et collègues(Sincennes et al. 2021). Les équations CT, ΔΔ CT et du facteur de changement ont été utilisées (Équation 1). Dans le cadre de cette expérience, la normalisation de l'expression a été réalisée à l'aide du gène domestique TBP (Tableau 11).

Équation 1. Différence entre le cycle seuil (CT) du gène d'intérêt et celui du gène de référence, permettant la normalisation de l'expression génique (ΔCT). Différence entre les ΔCT de l'échantillon et du tissu calibreur, permettant la comparaison relative entre les tissus (ΔΔCT). Calcul de la variation relative d'expression du gène d'intérêt (Facteur de changement).

$$\Delta CT_{échantillon} = CT_{CNR2} - CT_{TBP}$$

$$\Delta\Delta CT_{échantillon} = \Delta CT_{tissu\ calibreur} - \Delta CT_{échantillon}$$

$$Facteur\ de\ changement = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Tableau 11. Liste des amorces utilisées pour l'analyse qPCR ainsi que leur provenance.

Gène	Sens 5'-3'	Anti-sens 5'-3'	Source
CB2 humain	TTGGCAGCGTGACTATGACC	AGGAAGGCGATGAACAGGAG	Rossi *et al.* 2009
TBP humain	CACGAACCACGGCACTGATT	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC	Sincennes *et al.* 2021

4.4 Détection de l'expression du récepteur CB2 par immunobuvardage de type western

Afin de trouver un modèle cellulaire qui exprime le récepteur CB2 sous sa forme protéique, la technique d'immunobuvardage de type western a été utilisée. L'isolation des protéines a été réalisée à l'aide du tampon d'extraction et de lyse RIPA supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (ANNEXE 1). Afin d'éviter la dégradation des protéines membranaires, aucune exposition à la trypsine n'a été réalisée et la récupération des cellules s'est faite par raclement des cellules après un lavage au PBS pour éviter d'introduire des protéines provenant du milieu. Afin de normaliser la quantité de protéines ajoutée lors de la séparation sur gel d'électrophorèse, le dosage des protéines pour chaque échantillon a été effectué à l'aide du Pierce™ BCA Protein assay Kit (ANNEXE 4). L'essai au BCA a été réalisé à l'aide du Varioskan (Thermo Fisher, Waltham, Mass, É.-U.) à une longueur d'onde de 562 nm. Grâce au dosage des protéines, des échantillons contenant 40 µg de protéines ont été préparés en les solubilisant dans du tampon de chargement SDS-PAGE 4X (ANNEXE 1). Ces échantillons ont été dénaturés pendant 4 minutes à 95 °C afin de garantir une bonne séparation sur gel. Ainsi, 40 µg de protéines ont été déposés sur un mini gel SDS-PAGE. La concentration pour le gel de compression était de 4 % alors que pour le gel de séparation était de 10 % (ANNEXE 2). La migration des protéines a été faite dans un tampon de migration (ANNEXE 1) à un voltage constant de 60 V jusqu'à compression des protéines. Une fois les protéines concentrées, le voltage a été changé à 100 V pour la séparation. L'échelle de poids moléculaire P7710S allant de 10 à 230 kDa New England Biolabs, Ipswich, Mass, É.-U.) a été utilisée afin de différencier les bandes. Un transfert de type semi-sec a été fait sur une membrane de polyfluorure de vinylidène à 0,45 micron (Millipore, Bedford, MA 01730) en utilisant un tampon de transfert (ANNEXE 1). Le transfert a été fait à un voltage constant de 10 V pendant 60 minutes. Une vérification de transfert des protéines a été réalisée par la coloration au rouge ponceau (ANNEXE 1). Afin d'éviter les liaisons non spécifiques des anticorps à la membrane, un blocage avec du lait non gras 5 % solubilisé dans du TBS-T 0,1 % a été fait pendant une heure à température pièce (ANNEXE 1

Recettes de solutions utilisées pour l'immunobuvardage de type westernANNEXE 1). Une fois le blocage fait, la membrane a été exposée aux anticorps pendant une période de 1h à température pièce suivie d'un lavage avec la solution de blocage. Les anticorps primaires Anti-GAPDH (AB_2849138) à un facteur de dilution 1 : 5000 et Anti-CNR2 (AB_2895879) à un facteur de dilution 1 : 500 ont été utilisés. L'anticorps secondaire utilisé était un anticorps anti-lapin qui reconnait les isotypes IgG comprenant leurs chaînes légères et lourdes diluées 1 : 5000 (AB_2313567). Celui-ci est couplé à la peroxydase de raifort (HRP) qui permet d'observer les bandes de protéines par chimiluminescence (Tableau 12). Il est important de noter qu'aucun anticorps primaire n'ont été mélangés et chaque lecture a été réalisée successivement afin de garantir que les bandes observées correspondent aux bonnes protéines. La révélation par chimiluminescence a été réalisée en utilisant un substrat ECL (Revvity, Waltham, Mass, É.-U). La lecture des membranes a été réalisée à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc™ MP Universal Hood III (Bio-Rad, Hercules, CA, É.-U.). L'analyse

de l'intensité des bandes a été faite à l'aide du logiciel ImageLab 5.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, É.-U.). Les valeurs de densitométrie pour l'expression du récepteur CB2 ont été normalisées à l'aide du gène domestique GAPDH en supposant que son expression était semblable entre les lignées (Équation 2).

Tableau 12. Informations relatives aux anticorps utilisés.

Anticorps	Type	Hôte	Isotype	Reconnaissance	Concentration	Détection
AB_2849138	Monoclonal	Lapin	IgG	Anti-GAPDH	1 : 5000	Aucune
AB_2895879	Monoclonal	Lapin	IgG	Anti-CNR2	1 : 500	Aucune
AB_2313567	Polyclonal	Chèvre	IgG	Anti-lapin IgG (H+L)	1 : 5000	HRP

Équation 2. Calcul de l'expression normalisée

$$Intensité = Intensité\ de\ la\ bande - Bruit\ de\ fond$$

$$Expression\ normalisée = \frac{Intensité\ CB2}{Intensité\ GAPDH}$$

4.5 Immunofluorescence

La présence du récepteur CB2 a également été vérifiée par immunofluorescence. Pour ce faire, 5 x 10^3 cellules de chaque lignée ont été déposées dans les puits d'une plaque 96 puits à fond en verre. Afin de permettre l'adhésion des cellules non adhérentes HL-60 et Jurkat, les puits ont été prétraités avec du poly-L-lysine hydrobromide (0,1 mg/ml). Ensuite, les cellules ont été perméabilisées à l'aide du triton X-100 permettant l'accès des anticorps aux protéines intracellulaires. Deux anticorps ont été utilisés : un anticorps primaire monoclonal reconnaissant le récepteur CB2 (AB_2895879) ainsi qu'un

anticorps secondaire polyclonal anti-lapin conjugué à Alexa 488 (AB_2338046). Les images ont été capturées à l'aide du système d'imagerie Cytation 3 (BioTek, Winooski, VT, É.-U).

4.6 Cinétique du BCP sur le modèle cellulaire

Afin de s'assurer que les changements d'expression observés seront attribuables au mode d'action du BCP et non à une concentration cytotoxique du composé, la concentration maximale induisant seulement 20 % de mortalité (IC20) a été déterminée pour différents temps courts d'exposition. Pour mesurer ces concentrations, deux tests ont été utilisés. En premier lieu, le test par résazurine repose sur la conversion de la résazurine en résorufine par le NADH, une réaction produisant une fluorescence proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Ce test mesure donc la viabilité cellulaire en évaluant son métabolisme. L'autre test utilisé est la coloration au Hoechst, qui détecte la fluorescence du Hoechst 33342 qui se lie à l'ADN nucléaire des cellules vivantes afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Ces deux méthodes ont été choisies, car elles peuvent être réalisées en tandem et permettent de différencier les composés cytostatiques des composés cytotoxiques.

Dans une plaque 96 puits, 5 x 10^3 cellules ont été déposées dans chaque puits, suivi d'une incubation de 24 heures pour favoriser leur adhérence. Ensuite, les composés ont été ajoutés selon un gradient de concentration de BCP allant de 600 µM à 25 µM. Il est important de souligner que le BCP a été solubilisé dans du DMSO et que le tout a été soniqué pour augmenter la solubilité du BCP dans le milieu de croissance. La formulation a été soniquée pendant 2 min en utilisant l'appareil EpiShear™ Probe Sonicator (Active Motif, Carlsbad, CA, É.-U.) à 50 % d'intensité avant de faire l'ajout sur plaque. Pour chaque expérience, deux contrôles sont utilisés. Notamment, un contrôle sans traitement qui permet de voir la croissance naturelle, ainsi qu'un contrôle solvant permettant de voir si le solvant à sa concentration maximale de 0,25 % v/v de DMSO a un effet cytotoxique étant donné qu'il est utilisé pour solubiliser le BCP. Les temps d'exposition de 30 minutes, 1h, 2h, 4h, 6h et 24h ont été testés sur chaque concentration en triplicata technique par expérience. Après les temps

d'exposition, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X afin d'empêcher une réaction du milieu de culture avec la résazurine. Dans chaque puits, 150 µL de résazurine à 25 µg/ml ont été placés dans chaque puits et les plaques ont été incubées pendant une heure pour permettre la réduction de la résazurine. Ensuite, une lecture a été effectuée à l'aide du Cytation 3 Imaging Reader (BioTek, Winooski, VT, É.-U) en utilisant les longueurs d'onde de 530 nm et 590 nm pour l'excitation et l'émission respectivement. Ensuite, des lavages au PBS 1X ont été faits afin d'éliminer les composés résiduels. Pour la coloration de Hoechst, une lyse cellulaire a été réalisée en ajoutant 100 µL d'une solution SDS 0,01 % dans chaque puits suivie d'une incubation au congélateur pendant 24h. Ensuite, 100 µL de la solution de Hoechst 33342 à 30 µg/ml ont été ajoutés, suivis d'une incubation de 2 heures à l'abri de la lumière étant donné la sensibilité du composé à la lumière (ANNEXE 3). Suivant l'incubation, une mesure a été réalisée avec le Cytation 3 Imaging Reader (BioTek, Winooski, VT, É.-U) en utilisant les longueurs d'onde de 355 nm et 460 nm pour l'excitation et l'émission respectivement. Au niveau de l'analyse des données de cytotoxicité du BCP, celles-ci ont été modélisées à l'aide d'un modèle logistique à 5 paramètres dont les valeurs minimales et maximales ont été fixées à 0 et 100 respectivement. Ces analyses ont été réalisées sur R en utilisant le paquet DRC (Ritz *et al.* 2015). Ces modélisations ont été faites pour chaque temps d'exposition par expérience. Ceci a permis d'obtenir les valeurs moyennes d'IC20, IC50 et IC90 pour chaque condition testée. Les scripts R utilisés pour faire ces analyses peuvent être consultés dans les annexes (ANNEXE 5 et ANNEXE 6).

4.7 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur Excel à l'aide du complément RealStatistics 9.2.1. Ces tests statistiques ont été réalisés sur les données d'expression d'ARNm par qPCR et d'expression protéique par immunobuvardage de type western. Premièrement, les statistiques descriptives ont été obtenues afin de vérifier la qualité des données et leurs caractéristiques afin de vérifier quel type d'analyse statistique il sera possible de faire. Pour ces données, une ANOVA à un seul facteur a été envisagée plutôt qu'un test-t parce qu'elle est plus robuste lors de la comparaison

entre plus de deux groupes. Pour vérifier si ce type de test était possible, la normalité ainsi que l'homogénéité de la variance ont été évaluées à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et Levene respectivement. Ces tests ont été choisis parce qu'ils sont moins sensibles aux faibles tailles de population. Dans le cas de ces données, la normalité et l'homogénéité de la variance ont été confirmées ce qui a permis d'utiliser une ANOVA à un seul facteur avec un seuil de significativité (α) établi à 0,05. Dans le cas où une différence significative est observée, une analyse post hoc sera faite afin de voir quels sont les échantillons qui présentent une différence significative entre eux avec le même seuil de significativité.

4.8 Détermination de l'effet du BCP sur l'expression des gènes par ILLUMINA RNA-seq

Dans le but d'évaluer l'effet du composé sur le modèle cellulaire sélectionné, une analyse transcriptomique a été effectuée par séquençage à haut débit de l'ARN (RNA-seq). Pour ce faire, 5 × 10^6 cellules ont été ensemencées dans des boîtes de pétri de culture et incubées pendant 48 heures afin de permettre une adhérence optimale. Après adhésion, les cellules ont été lavées à l'aide de PBS, puis le milieu de culture a été remplacé par les milieux correspondant aux différentes conditions expérimentales. Douze conditions distinctes ont été définies, incluant trois concentrations de BCP (25, 50 et 100 µM) et trois temps d'exposition (1 h, 3 h et 24 h). Un contrôle négatif a également été inclus, correspondant à un traitement avec du DMSO utilisé comme véhicule pour solubiliser le BCP. À l'issue des temps d'exposition, le milieu a été retiré, les cellules ont été lavées au PBS, puis récoltées mécaniquement à l'aide d'un grattoir. Les cellules ont été transférées dans des tubes de 2 ml contenant 900 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, Waltham, Mass, É.-U.) pour stabilisation immédiate de l'ARN. Afin de prévenir toute dégradation, les échantillons ont été rapidement congelés et stockés à -80 °C jusqu'à leur envoi au centre Génome Québec (Montréal, QC, Canada) pour l'extraction de l'ARN total, la préparation des librairies, le séquençage par Illumina RNA-seq et les analyses des données. La préparation des bibliothèques a été réalisée à l'aide du kit Nextera d'Illumina, en utilisant les adaptateurs R1 :

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG et R2 : TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG. Les bibliothèques ont ensuite été séquencées sur plateforme NovaSeq X. Les données brutes ont été traitées à l'aide du pipeline DRAGEN RNA (version 4.3.16). Celui-ci effectue d'abord un prétraitement des lectures ainsi qu'un contrôle de qualité complet des bibliothèques. Le pipeline procède ensuite à l'alignement des lectures sur le génome de référence, soit l'assemblage Homo sapiens hg38. Une fois les lectures alignées, l'annotation fonctionnelle a été réalisée en utilisant l'annotation Ensembl hg38 (version 110) comme référence. Cette étape permet d'associer les lectures alignées aux gènes et transcrits annotés. La quantification des gènes et des transcrits a ensuite été effectuée directement par le pipeline DRAGEN RNA. Par ailleurs, le module de détection des fusions géniques du pipeline a permis d'identifier les événements de fusion potentiels. Les matrices de comptage ont ensuite été importées dans R (version 4.5.0) à l'aide de l'outil tximport (version 1.36.1). L'analyse des données de séquençage a été réalisée selon quatre approches analytiques : une analyse exploratoire à l'aveugle, une comparaison différentielle, une comparaison différentielle ajustée pour le temps d'exposition, et une analyse de variation monotone.

L'analyse à l'aveugle a consisté à évaluer l'ensemble des échantillons sans tenir compte des groupes expérimentaux. Cette approche a permis d'identifier d'éventuels échantillons aberrants et d'examiner l'influence des différentes variables sur la variance globale. Une analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée, suivie de l'identification des 50 gènes présentant la plus forte variabilité entre les échantillons. Ces analyses ont été réalisées sur les comptes bruts en utilisant les librairies DESeq2 (version 1.48.2) et pheatmap (version 1.0.13) dans l'environnement R.

Les comparaisons différentielles ont été réalisées en utilisant les valeurs de changement d'expression en log2. Pour les gènes ne présentant aucune expression, un pseudo-compte de 0,001 a été ajouté afin d'éviter les erreurs liées aux valeurs nulles. L'identification des variations d'expression a été effectuée avec la librairie DESeq2 sur R. Les comparaisons ont été menées entre les échantillons témoins non traités et les échantillons traités, pour un même temps d'exposition.

Cette approche visait à cibler spécifiquement l'effet potentiel du BCP sur le transcriptome du modèle, sans confondre cet effet avec une dynamique temporelle. Toutefois, en l'absence de réplicats biologiques, il est impossible de confirmer la significativité réelle des variations observées. Les résultats issus de ces comparaisons doivent donc être interprétés comme un repérage exploratoire de gènes candidats plutôt que comme une démonstration statistique formelle.

Pour l'analyse différentielle corrigée pour le temps, la préparation des données a suivi les mêmes étapes que précédemment. Cependant, la concentration du BCP a été considérée comme une variable continue, tandis que le temps d'exposition a été intégré comme covariable. L'objectif était d'isoler plus précisément l'effet de la concentration en contrôlant l'influence du temps. La correction pour cette covariable a été réalisée à l'aide de la librairie Limma (version 3.64.3) sur R, via la fonction RemoveBatchEffect. Les gènes candidats ont ensuite été priorisés à partir de valeurs p ajustées selon la procédure de Benjamini-Hochberg. Il convient néanmoins de souligner que l'absence de réplicats biologiques empêche une estimation fiable de la variance, ce qui limite cette analyse à un exercice exploratoire nécessitant une validation ultérieure.

Enfin, le test de monotonicité a été réalisé avec DESeq2, en incluant la concentration du BCP comme variable continue et en traitant les échantillons provenant de différents temps d'exposition comme des pseudo-réplicats au sein d'une même concentration. Les tendances monotones pour chaque gène ont été évaluées à l'aide de corrélations de Spearman entre les comptes géniques stabilisés et la concentration. Les valeurs p ont été ajustées selon Benjamini–Hochberg afin de contrôler le taux de faux positifs. Les graphiques de tendance monotones ont été générés pour les gènes présentant une corrélation absolue supérieure à 0,90. Comme pour les autres analyses, l'absence de réplicats empêche de conclure de manière définitive quant à l'influence du BCP sur ces gènes.

CONCLUSION

Cette étude avait pour objectif de générer des pistes mécanistiques sur l'effet du BCP dans une lignée cancéreuse humaine sélectionnée comme modèle candidat pour l'étude du récepteur CB2. À l'aide de la qPCR, de l'immunobuvardage de type western et de l'immunofluorescence, la lignée MG-63 a été retenue, malgré des divergences entre les niveaux d'expression génique et protéique du CB2. Cette divergence impose de considérer MG-63 comme un modèle pertinent, mais non définitivement validé pour une signalisation CB2 fonctionnelle. La concentration maximale tolérée de BCP sur MG-63 a été estimée autour de 150 µM pour une exposition de 24 heures à l'aide des tests de cytotoxicité par résazurine et Hoechst, ce qui a permis de retenir des conditions d'exposition de 25, 50 et 100 µM pour les analyses transcriptomiques. L'analyse RNA-seq a mis en évidence 7 003 gènes dont l'expression varie selon les variables expérimentales et a permis de prioriser 528 gènes candidats potentiellement associés au BCP après prise en compte du temps d'exposition. Les réseaux d'interactions STRING suggèrent une tendance à la diminution de gènes liés au cycle cellulaire, au métabolisme du carbone et à la biosynthèse du cholestérol, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de gènes associés à l'inflammation, à l'adaptation au stress, à l'autophagie et à la voie calcineurine/NFAT. Cependant, l'absence de réplicats biologiques, la faible amplitude des variations d'expression et l'incertitude sur la présence fonctionnelle de CB2 empêchent de conclure que ces gènes sont statistiquement, biologiquement et causalement reliés à l'exposition au BCP. Ces résultats doivent donc être interprétés comme des hypothèses mécanistiques à valider. Malgré ces limites, l'étude conserve un intérêt scientifique important, car elle établit une base expérimentale pour l'étude transcriptomique du BCP, met en évidence l'importance du contrôle du facteur temporel et priorise des voies biologiques cohérentes avec certaines propriétés rapportées du composé. Les prochaines étapes devraient inclure des réplicats biologiques, la validation de gènes clés par RT-qPCR, la confirmation protéique et fonctionnelle des voies proposées, ainsi que l'utilisation d'antagonistes ou de modèles CNR2 invalidés afin de déterminer la contribution réelle du récepteur CB2.

LISTE DE RÉFÉRENCES

Abdin SM, Tolba MF, Zaher DM et Omar HA. 2021. Nuclear factor-kappaB signaling inhibitors revert multidrug-resistance in breast cancer cells. Chem Biol Interact, 340 : 109450.

Ahmed EA, Abu Zahra H, Ammar RB, Mohamed ME et Ibrahim HM. 2022. Beta-Caryophyllene Enhances the Anti-Tumor Activity of Cisplatin in Lung Cancer Cell Lines through Regulating Cell Cycle and Apoptosis Signaling Molecules. Molecules, 27.

Akimov MG, Gretskaya NM, Gorbacheva EI, Khadour N, Chernavskaya VS, Sherstyanykh GD, Kovaleko TF, Fomina-Ageeva EV et Bezuglov VV. 2024. The Interaction of the Endocannabinoid Anandamide and Paracannabinoid Lysophosphatidylinositol during Cell Death Induction in Human Breast Cancer Cells. Int J Mol Sci, 25.

Alberti TB, Coelho DS et Maraschin M. 2021. beta-Caryophyllene nanoparticles design and development: Controlled drug delivery of cannabinoid CB2 agonist as a strategic tool towards neurodegeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 121 : 111824.

Alberti TB, Barbosa WL, Vieira JL, Raposo NR et Dutra RC. 2017. (-)-beta-Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. Int J Mol Sci, 18.

Aly E, Khajah MA et Masocha W. 2019. beta-Caryophyllene, a CB2-Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. Molecules, 25.

Amalraj A, Jacob J, Varma K et Gopi S. 2020. Preparation and Characterization of Liposomal beta-Caryophyllene (Rephyll) by Nanofiber Weaving Technology and Its Effects on Delayed Onset Muscle Soreness (DOMS) in Humans: A Randomized, Double-Blinded, Crossover-Designed, and Placebo-Controlled Study. ACS Omega, 5 : 24045–24056.

Andrade-Silva M, Correa LB, Candea AL, Cavalher-Machado SC, Barbosa HS, Rosas EC et Henriques MG. 2016. The cannabinoid 2 receptor agonist beta-caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by Mycobacterium bovis BCG by inhibiting neutrophil migration. Inflamm Res, 65 : 869–879.

Annamalai V, Kotakonda M et Periyannan V. 2020. JAK1/STAT3 regulatory effect of beta-caryophyllene on MG-63 osteosarcoma cells via ROS-induced apoptotic mitochondrial pathway by DNA fragmentation. J Biochem Mol Toxicol, 34 : e22514.

Arafeh R, Shibue T, Dempster JM, Hahn WC et Vazquez F. 2025. The present and future of the Cancer Dependency Map. Nat Rev Cancer, 25 : 59–73.

Arizuka N, Murakami T et Suzuki K. 2017. The effect of beta-caryophyllene on nonalcoholic steatohepatitis. J Toxicol Pathol, 30 : 263–273.

Askari VR et Shafiee-Nick R. 2019. Promising neuroprotective effects of beta-caryophyllene against LPS-induced oligodendrocyte toxicity: A mechanistic study. Biochem Pharmacol, 159 : 154–171.

Assis LC, Straliotto MR, Engel D, Hort MA, Dutra RC et de Bem AF. 2014. beta-Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. Neuroscience, 279 : 220–231.

Baradaran Rahimi V et Askari VR. 2022. A mechanistic review on immunomodulatory effects of selective type two cannabinoid receptor beta-caryophyllene. Biofactors, 48 : 857–882.

Bastaki M, Api AM, Aubanel M, Bauter M, Cachet T, Demyttenaere JCR, Diop MM, Harman CL, Hayashi SM, Krammer G, Lu V, Marone PA, Mendes O, Renskers KJ, Schnabel J, Tsang SY et Taylor SV. 2020. Dietary administration of beta-caryophyllene and its epoxide to Sprague-Dawley rats for 90 days. Food Chem Toxicol, 135 : 110876.

Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chretien M et Seidah NG. 1991. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. Proc Natl Acad Sci U S A, 88 : 3564–3568.

Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Leite DF et Calixto JB. 2011. beta-Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPARgamma pathway. Am J Pathol, 178 : 1153–1166.

Bie B, Wu J, Foss JF et Naguib M. 2018. An overview of the cannabinoid type 2 receptor system and its therapeutic potential. Curr Opin Anaesthesiol, 31 : 407–414.

Biswas SK. 2016. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? Oxid Med Cell Longev, 2016 : 5698931.

Brar GS, Schmidt AA, Willams LR, Wakefield MR et Fang Y. 2025. Osteosarcoma: current insights and advances. Explor Target Antitumor Ther, 6 : 1002324.

Brenner DR, Gillis J, Demers AA, Ellison LF, Billette J-M, Zhang SX, Liu JL, Woods RR, Finley C et Fitzgerald N. 2024. Projection du fardeau du cancer au Canada en 2024. CMAJ, 196 : E836–E845.

Broad I. 2025. DepMap Public 25Q2. DepMap.

Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G et Nurnberg B. 2003. Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. J Cell Biol, 160 : 89–99.

Cabral GA et Griffin-Thomas L. 2009. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. Expert Rev Mol Med, 11 : e3.

Caffarel MM, Moreno-Bueno G, Cerutti C, Palacios J, Guzman M, Mechta-Grigoriou F et Sanchez C. 2008. JunD is involved in the antiproliferative effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on human breast cancer cells. Oncogene, 27 : 5033–5044.

Calleja MA, Vieites JM, Montero-Melendez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A et Suarez A. 2013. The antioxidant effect of beta-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. Br J Nutr, 109 : 394–401.

Canadian Cancer Society, Statistics Canada et Canada PHAo. 2021. Canadian cancer statistics 2021. Canadian Cancer Society, HPCDP.

Capozzi A, Mattei V, Martellucci S, Manganelli V, Saccomanni G, Garofalo T, Sorice M, Manera C et Misasi R. 2018. Anti-Proliferative Properties and Proapoptotic Function of New CB2 Selective Cannabinoid Receptor Agonist in Jurkat Leukemia Cells. Int J Mol Sci, 19.

Cho HI, Hong JM, Choi JW, Choi HS, Hwan Kwak J, Lee DU, Kook Lee S et Lee SM. 2015. beta-Caryophyllene alleviates D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the TLR4 and RAGE signaling pathways. Eur J Pharmacol, 764 : 613–621.

Cho JY, Chang HJ, Lee SK, Kim HJ, Hwang JK et Chun HS. 2007. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. Life Sci, 80 : 932–939.

Chung KS, Hong JY, Lee JH, Lee HJ, Park JY, Choi JH, Park HJ, Hong J et Lee KT. 2019. beta-Caryophyllene in the Essential Oil from Chrysanthemum Boreale Induces G(1) Phase Cell Cycle Arrest in Human Lung Cancer Cells. Molecules, 24.

Dagogo-Jack I et Shaw AT. 2018. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol, 15 : 81–94.

Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MBK, Ezzat MO, Majid ASA et Majid AMSA. 2015. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β-Caryophyllene from the Essential Oil of Aquilaria crassna. Molecules, 20 : 11808–11829. doi : 10.3390/molecules200711808.

Dahham SS, Tabana Y, Asif M, Ahmed M, Babu D, Hassan LE, Ahamed MBK, Sandai D, Barakat K, Siraki A et Majid A. 2021. beta-Caryophyllene Induces Apoptosis and Inhibits Angiogenesis in Colorectal Cancer Models. Int J Mol Sci, 22.

Davis RL. 2020. Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. iScience, 23 : 101487.

Di Sotto A, Evandri MG et Mazzanti G. 2008. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. Mutat Res, 653 : 130–133.

Di Sotto A, Maffei F, Hrelia P, Castelli F, Sarpietro MG et Mazzanti G. 2013. Genotoxicity assessment of beta-caryophyllene oxide. Regul Toxicol Pharmacol, 66 : 264–268.

Di Sotto A, Mancinelli R, Gulli M, Eufemi M, Mammola CL, Mazzanti G et Di Giacomo S. 2020a. Chemopreventive Potential of Caryophyllane Sesquiterpenes: An Overview of Preliminary Evidence. Cancers (Basel), 12.

Di Sotto A, Irannejad H, Eufemi M, Mancinelli R, Abete L, Mammola CL, Altieri F, Mazzanti G et Di Giacomo S. 2020b. Potentiation of Low-Dose Doxorubicin Cytotoxicity by Affecting P-Glycoprotein through Caryophyllane Sesquiterpenes in HepG2 Cells: an in Vitro and in Silico Study. Int J Mol Sci, 21.

Di Sotto A, Di Giacomo S, Rubini E, Macone A, Gulli M, Mammola CL, Eufemi M, Mancinelli R et Mazzanti G. 2020c. Modulation of STAT3 Signaling, Cell Redox Defenses and Cell Cycle Checkpoints by beta-Caryophyllene in Cholangiocarcinoma Cells: Possible Mechanisms Accounting for Doxorubicin Chemosensitization and Chemoprevention. Cells, 9.

Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B et Konarska L. 2005. Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. Cell Signal, 17 : 25–37.

FDA. 2024. CFR title 21, Subchapter B, 172.515. National Archives and Records Administration, Services HaH.

Fontes LBA, Dias DDS, Aarestrup BJV, Aarestrup FM, Da Silva Filho AA et Correa J. 2017. beta-Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. Biomed Pharmacother, 91 : 257–264.

Fouad YA et Aanei C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res, 7 : 1016–1036.

Fraguas-Sanchez AI, Martin-Sabroso C et Torres-Suarez AI. 2018. Insights into the effects of the endocannabinoid system in cancer: a review. Br J Pharmacol, 175 : 2566–2580.

Fu F, Shang J, Yan Y, Jiang H, Han H, Yuan H, Gao Z, Yang J, Gao J, Wang J, Pan Y, Lin Y, Ye T, Zhang Y, Zhang Y, Xiang J, Hu H, Cao Z, Zheng Y, Li Y, Zhang Y, Jin L, Shi L et Chen H. 2025. Genomic and transcriptomic dynamics in the stepwise progression of lung adenocarcinoma. Cell Research, 35 : 1037–1055.

Gao F, Zhang LH, Su TF, Li L, Zhou R, Peng M, Wu CH, Yuan XC, Sun N, Meng XF, Tian B, Shi J, Pan HL et Li M. 2016. Signaling Mechanism of Cannabinoid Receptor-2 Activation-Induced beta-Endorphin Release. Mol Neurobiol, 53 : 3616–3625.

Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, Altmann KH, Karsak M et Zimmer A. 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. Proc Natl Acad Sci U S A, 105 : 9099–9104.

Ghelardini C, Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G et Bartolini A. 2001. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. Farmaco, 56 : 387–389.

Gleeson MP, Hersey A, Montanari D et Overington J. 2011. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. Nat Rev Drug Discov, 10 : 197–208.

Gnanasambandan K et Sayeski PP. 2011. A structure-function perspective of Jak2 mutations and implications for alternate drug design strategies: the road not taken. Curr Med Chem, 18 : 4659–4673.

Gopi S, Amalraj A, Jacob J, Kalarikkal N, Thomas S et Guo Q. 2018. Preparation, characterization and in vitro study of liposomal curcumin powder by cost effective nanofiber weaving technology. New Journal of Chemistry, 42 : 5117–5127.

Gray SM, Xin Y, Ross EC, Chazotte BM, Capozzi ME, El K, Svendsen B, Ravn P, Sloop KW, Tong J, Gromada J, Campbell JE et D'Alessio DA. 2020. Discordance between GLP-1R gene and protein expression in mouse pancreatic islet cells. J Biol Chem, 295 : 11529–11541.

Guo K, Mou X, Huang J, Xiong N et Li H. 2014. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-kappaB activation in microglia. J Mol Neurosci, 54 : 41–48.

Habel N, Stefanovska B, Carène D, Patiño-Garcia A, Lecanda F et Fromigué O. 2019. CYR61 triggers osteosarcoma metastatic spreading via an IGF1Rβ-dependent EMT-like process. BMC Cancer, 19 : 62.

Han L, Yang L, Liu B et Cheng X. 2014. Trans-caryophyllene suppresses tumor necrosis factor (TNFα)-induced inflammation in human chondrocytes. European Food Research and Technology, 239 : 1061–1066.

Hashiesh HM, Sharma C, Goyal SN, Sadek B, Jha NK, Kaabi JA et Ojha S. 2021. A focused review on CB2 receptor-selective pharmacological properties and therapeutic potential of beta-caryophyllene, a dietary cannabinoid. Biomed Pharmacother, 140 : 111639.

Hashiesh HM, Azimullah S, Nagoor Meeran MF, Saraswathiamma D, Arunachalam S, Jha NK, Sadek B, Adeghate E, Sethi G, Albawardi A, Al Marzooqi S et Ojha S. 2024. Cannabinoid 2 Receptor Activation Protects against Diabetic Cardiomyopathy through Inhibition of AGE/RAGE-Induced Oxidative Stress, Fibrosis, and Inflammasome Activation. J Pharmacol Exp Ther, 391 : 241–257.

Hemmings BA et Restuccia DF. 2012. PI3K-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4 : a011189.

Hu S-j, Cheng G, Chen G-c, Zhou H, Zhang Q, Zhao Q-m, Lian C-x, Zhao Z-h, Zhang Q-l, Han T, Zhang Q-y et Qin L-p. 2024. Cannabinoid receptors type 2: Function and development in agonist

discovery from synthetic and natural sources with applications for the therapy of osteoporosis. Arabian Journal of Chemistry, 17 : 105536.

Hu Y, Zeng Z, Wang B et Guo S. 2017. Trans-caryophyllene inhibits amyloid beta (Abeta) oligomer-induced neuroinflammation in BV-2 microglial cells. Int Immunopharmacol, 51 : 91–98.

Huang WJ, Chen WW et Zhang X. 2016. Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). Mol Med Rep, 14 : 2899–2903.

Iannotti FA et Vitale RM. 2021. The Endocannabinoid System and PPARs: Focus on Their Signalling Crosstalk, Action and Transcriptional Regulation. Cells, 10.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP et Malan TP, Jr. 2005. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. Proc Natl Acad Sci U S A, 102 : 3093–3098.

Iden JA, Raphael-Mizrahi B, Awida Z, Naim A, Zyc D, Liron T, Kasher M, Livshits G, Vered M et Gabet Y. 2023. The Anti-Tumorigenic Role of Cannabinoid Receptor 2 in Colon Cancer: A Study in Mice and Humans. Int J Mol Sci, 24.

Irrera N, D'Ascola A, Pallio G, Bitto A, Mannino F, Arcoraci V, Rottura M, Ieni A, Minutoli L et Metro D. 2020. β-caryophyllene inhibits cell proliferation through a direct modulation of CB2 receptors in glioblastoma cells. Cancers, 12 : 1038.

Jian YK, Zhu HY, Wu XL et Li B. 2019. Thrombospondin 1 Triggers Osteosarcoma Cell Metastasis and Tumor Angiogenesis. Oncol Res, 27 : 211–218.

Jung JI, Kim EJ, Kwon GT, Jung YJ, Park T, Kim Y, Yu R, Choi MS, Chun HS, Kwon SH, Her S, Lee KW et Park JH. 2015. beta-Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in high-fat diet-induced obese C57BL/6N mice. Carcinogenesis, 36 : 1028–1039.

Kankanamge D, Tennakoon M, Karunarathne A et Gautam N. 2022. G protein gamma subunit, a hidden master regulator of GPCR signaling. J Biol Chem, 298 : 102618.

Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K, Nakamura H, Bagetta G, Sakurada T et Sakurada S. 2013. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in beta-caryophyllene-induced antinociception. Eur J Pain, 17 : 664–675.

Klauke AL, Racz I, Pradier B, Markert A, Zimmer AM, Gertsch J et Zimmer A. 2014. The cannabinoid CB(2) receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. Eur Neuropsychopharmacol, 24 : 608–620.

Kuwahata H, Katsuyama S, Komatsu T, Nakamura H, Corasaniti MT, Bagetta G, Sakurada S, Sakurada T et Takahama K. 2012. Local peripheral effects of β-Caryophyllene through CB 2 receptors in neuropathic pain in mice. Pharmacology & Pharmacy, 3 : 397.

Laezza C, Pagano C, Navarra G, Pastorino O, Proto MC, Fiore D, Piscopo C, Gazzerro P et Bifulco M. 2020. The Endocannabinoid System: A Target for Cancer Treatment. Int J Mol Sci, 21.

Lago-Fernandez A, Zarzo-Arias S, Jagerovic N et Morales P. 2021. Relevance of Peroxisome Proliferator Activated Receptors in Multitarget Paradigm Associated with the Endocannabinoid System. Int J Mol Sci, 22.

Lee YT, Tan YJ et Oon CE. 2018. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. Eur J Pharmacol, 834 : 188–196.

Legault J et Pichette A. 2007. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. J Pharm Pharmacol, 59 : 1643–1647.

Li H, Wang D, Chen Y et Yang M. 2020. beta-Caryophyllene inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells. Int Immunopharmacol, 84 : 106556.

Li X, Hua T, Vemuri K, Ho JH, Wu Y, Wu L, Popov P, Benchama O, Zvonok N, Locke K, Qu L, Han GW, Iyer MR, Cinar R, Coffey NJ, Wang J, Wu M, Katritch V, Zhao S, Kunos G, Bohn LM, Makriyannis A, Stevens RC et Liu ZJ. 2019. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. Cell, 176 : 459–467 e413.

Lustberg MB, Kuderer NM, Desai A, Bergerot C et Lyman GH. 2023. Mitigating long-term and delayed adverse events associated with cancer treatment: implications for survivorship. Nat Rev Clin Oncol, 20 : 527–542.

Martinez-Martinez E, Gomez I, Martin P, Sanchez A, Roman L, Tejerina E, Bonilla F, Merino AG, de Herreros AG, Provencio M et Garcia JM. 2015. Cannabinoids receptor type 2, CB2, expression correlates with human colon cancer progression and predicts patient survival. Oncoscience, 2 : 131–141.

Marupudi NI, Han JE, Li KW, Renard VM, Tyler BM et Brem H. 2007. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. Expert Opin Drug Saf, 6 : 609–621.

Mashima T, Ushijima M, Matsuura M, Tsukahara S, Kunimasa K, Furuno A, Saito S, Kitamura M, Soma-Nagae T, Seimiya H, Dan S, Yamori T et Tomida A. 2015. Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. Cancer Sci, 106 : 909–920.

Mohamed ME, Abdelnaby RM et Younis NS. 2022. beta-caryophyllene ameliorates hepatic ischemia reperfusion-induced injury: the involvement of Keap1/Nrf2/HO 1/NQO 1 and TLR4/NF-kappaB/NLRP3 signaling pathways. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 26 : 8551–8566.

Molina-Jasso D, Alvarez-Gonzalez I et Madrigal-Bujaidar E. 2009. Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. Biol Pharm Bull, 32 : 520–522.

Nguyen LT, Mysliveckova Z, Szotakova B, Spicakova A, Lnenickova K, Ambroz M, Kubicek V, Krasulova K, Anzenbacher P et Skalova L. 2017. The inhibitory effects of beta-caryophyllene, beta-caryophyllene oxide and alpha-humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver in vitro. Chem Biol Interact, 278 : 123–128.

Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T et Kojiro M. 2006. Angiogenesis in cancer. Vasc Health Risk Manag, 2 : 213–219.

Nogueira C, Lemos-Senna E, da Silva Vieira E, Sampaio TB, Mallmann MP, Oliveira MS, Bernardi LS et Oliveira PR. 2023. β-caryophyllene cationic nanoemulsion for intranasal delivery and treatment of epilepsy: development and in vivo evaluation of anticonvulsant activity. Journal of Nanoparticle Research, 25 : 19.

O'Neil MJ, Heckelman PE, Dobbelaar PH et Royal Society of C. 2013. The Merck Index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A et Bab I. 2006. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. Proc Natl Acad Sci U S A, 103 : 696–701.

Ojha S, Javed H, Azimullah S et Haque ME. 2016. beta-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. Mol Cell Biochem, 418 : 59–70.

Okkenhaug K, Graupera M et Vanhaesebroeck B. 2016. Targeting PI3K in Cancer: Impact on Tumor Cells, Their Protective Stroma, Angiogenesis, and Immunotherapy. Cancer Discov, 6 : 1090–1105.

Oliveira G, Machado KC, Machado KC, da Silva A, Feitosa CM et de Castro Almeida FR. 2018. Non-clinical toxicity of beta-caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. Regul Toxicol Pharmacol, 92 : 338–346.

Paula-Freire LI, Andersen ML, Gama VS, Molska GR et Carlini EL. 2014. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. Phytomedicine, 21 : 356–362.

Pavithra PS, Mehta A et Verma RS. 2018. Synergistic interaction of beta-caryophyllene with aromadendrene oxide 2 and phytol induces apoptosis on skin epidermoid cancer cells. Phytomedicine, 47 : 121–134.

Perner F, Perner C, Ernst T et Heidel FH. 2019. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. Cells, 8.

Picciolo G, Pallio G, Altavilla D, Vaccaro M, Oteri G, Irrera N et Squadrito F. 2020. β-Caryophyllene Reduces the Inflammatory Phenotype of Periodontal Cells by Targeting CB2 Receptors. Biomedicines, 8. doi : 10.3390/biomedicines8060164.

Ponten F, Jirstrom K et Uhlen M. 2008. The Human Protein Atlas--a tool for pathology. J Pathol, 216 : 387–393.

Preet A, Qamri Z, Nasser MW, Prasad A, Shilo K, Zou X, Groopman JE et Ganju RK. 2011. Cannabinoid receptors, CB1 and CB2, as novel targets for inhibition of non-small cell lung cancer growth and metastasis. Cancer Prev Res (Phila), 4 : 65–75.

Punzo F, Tortora C, Di Pinto D, Manzo I, Bellini G, Casale F et Rossi F. 2017. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-invasive effect of EC/EV system in human osteosarcoma. Oncotarget, 8 : 54459–54471.

Qu L et Liu B. 2015. Cyclooxygeanse-2 promotes metastasis in osteosarcoma. Cancer Cell Int, 15 : 69.

Quintans-Junior LJ, Araujo AA, Brito RG, Santos PL, Quintans JS, Menezes PP, Serafini MR, Silva GF, Carvalho FM, Brogden NK et Sluka KA. 2016. beta-caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with beta-cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. Life Sci, 149 : 34–41.

Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar AP, Sethi G et Perumal E. 2018. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. Redox Biol, 17 : 297–314.

Rakotoarivelo V, Mayer TZ, Simard M, Flamand N et Di Marzo V. 2024. The Impact of the CB(2) Cannabinoid Receptor in Inflammatory Diseases: An Update. Molecules, 29.

Ramachandhiran D, Sankaranarayanan C, Murali R, Babukumar S et Vinothkumar V. 2022. beta-Caryophyllene promotes oxidative stress and apoptosis in KB cells through activation of mitochondrial-mediated pathway - An in-vitro and in-silico study. Arch Physiol Biochem, 128 : 148–162.

Rathod SS et Agrawal YO. 2025. beta-Caryophyllene (CB2 agonist) mitigates rotenone-induced neurotoxicity and apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells via modulation of GSK-3beta/NRF2/HO-1 axis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 398 : 15943–15963.

Rava A, Buzzelli V, Feo A, Ascone F, Di Trapano M, Schiavi S, Carbone E, Pasquadibisceglie A, Polticelli F, Manduca A et Trezza V. 2025. Role of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in mediating the beneficial effects of beta-caryophyllene in a rat model of fragile X syndrome. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 136 : 111234.

Rayman N, Lam KH, Laman JD, Simons PJ, Lowenberg B, Sonneveld P et Delwel R. 2004. Distinct expression profiles of the peripheral cannabinoid receptor in lymphoid tissues depending on receptor activation status. J Immunol, 172 : 2111–2117.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM et Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med, 49 : 1603–1616.

Ritz C, Baty F, Streibig JC et Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. PLoS One, 10 : e0146021.

Roche J. 2018. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. Cancers (Basel), 10.

Rodrigues DF, Costa VM, Silvestre R, Bastos ML et Carvalho F. 2019. Methods for the analysis of transcriptome dynamics. Toxicol Res (Camb), 8 : 597–612.

S DIG, A DIS, Mazzanti G et Wink M. 2017. Chemosensitizing Properties of beta-Caryophyllene and beta-Caryophyllene Oxide in Combination with Doxorubicin in Human Cancer Cells. Anticancer Res, 37 : 1191–1196.

Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM et Cuadrado A. 2006. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. J Biol Chem, 281 : 14841–14851.

Santos PS, Oliveira TC, LM RJ, Figueiras A et Nunes LCC. 2018. beta-caryophyllene Delivery Systems: Enhancing the Oral Pharmacokinetic and Stability. Curr Pharm Des, 24 : 3440–3453.

Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A et Mukhtar H. 2006. Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. J Biol Chem, 281 : 39480–39491.

Sarsembayeva A, Kienzl M, Gruden E, Ristic D, Maitz K, Valadez-Cosmes P, Santiso A, Hasenoehrl C, Brcic L, Lindenmann J, Kargl J et Schicho R. 2022. Cannabinoid receptor 2 plays a pro-tumorigenic role in non-small cell lung cancer by limiting anti-tumor activity of CD8(+) T and NK cells. Front Immunol, 13 : 997115.

Savjani KT, Gajjar AK et Savjani JK. 2012. Drug solubility: importance and enhancement techniques. ISRN Pharm, 2012 : 195727.

Scandiffio R, Geddo F, Cottone E, Querio G, Antoniotti S, Gallo MP, Maffei ME et Bovolin P. 2020. Protective Effects of (E)-beta-Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. Nutrients, 12 : 3273.

Scandiffio R, Bonzano S, Cottone E, Shrestha S, Bossi S, De Marchis S, Maffei ME et Bovolin P. 2023. Beta-Caryophyllene Modifies Intracellular Lipid Composition in a Cell Model of Hepatic Steatosis by Acting through CB2 and PPAR Receptors. Int J Mol Sci, 24.

Schmitt D, Levy R et Carroll B. 2016. Toxicological Evaluation of β-Caryophyllene Oil:Subchronic Toxicity in Rats. International Journal of Toxicology, 35 : 558–567.

Segat GC, Manjavachi MN, Matias DO, Passos GF, Freitas CS, Costa R et Calixto JB. 2017. Antiallodynic effect of beta-caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. Neuropharmacology, 125 : 207–219.

Shan J, Chen L et Lu K. 2017. Protective effects of trans-caryophyllene on maintaining osteoblast function. IUBMB Life, 69 : 22–29.

Sheng B, Wang W, Xia D et Qu X. 2023. Panobinostat (LBH589) combined with AM1241 induces cervical cancer cell apoptosis through autophagy pathway. BMC Pharmacol Toxicol, 24 : 45.

Sincennes MC, Brun CE, Lin AYT, Rosembert T, Datzkiw D, Saber J, Ming H, Kawabe YI et Rudnicki MA. 2021. Acetylation of PAX7 controls muscle stem cell self-renewal and differentiation potential in mice. Nat Commun, 12 : 3253.

Skold M, Karlberg AT, Matura M et Borje A. 2006. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. Food Chem Toxicol, 44 : 538–545.

Song Q, Zhang W, Shi D, Zhang Z, Zhao Q, Wang M, Huang M, Meng J, Cui W et Luo X. 2023. Overexpression of cannabinoid receptor 2 is associated with human breast cancer proliferation, apoptosis, chemosensitivity and prognosis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Cancer Med, 12 : 13538–13550.

Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Fox JE et Velez-Pardo C. 2020. Cannabinoid CP55940 selectively induces apoptosis in Jurkat cells and in ex vivo T-cell acute lymphoblastic leukemia through H(2)O(2) signaling mechanism. Leuk Res, 95 : 106389.

Spicakova A, Bazgier V, Skalova L, Otyepka M et Anzenbacher P. 2019. beta-caryophyllene oxide and trans-nerolidol affect enzyme activity of CYP3A4 - in vitro and in silico studies. Physiol Res, 68 : S51–S58.

Stratton MR, Campbell PJ et Futreal PA. 2009. The cancer genome. Nature, 458 : 719–724.

Su TF, Zhang LH, Peng M, Wu CH, Pan W, Tian B, Shi J, Pan HL et Li M. 2011. Cannabinoid CB2 receptors contribute to upregulation of beta-endorphin in inflamed skin tissues by electroacupuncture. Mol Pain, 7 : 98.

Tao K, Zhu J, Wei K, Meng X, Zhu M, Tao Y, Lu Z et Yu W. 2021. Cannabinoid Receptor-2 Activation in Keratinocytes Contributes to Elevated Peripheral beta-Endorphin Levels in Patients With Obstructive Jaundice. Anesth Analg, 133 : 251–262.

Tiwari G, Tiwari R et Rai AK. 2010. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. J Pharm Bioallied Sci, 2 : 72–79.

Trott O et Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem, 31 : 455–461.

Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C et Sharma S. 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. J Adv Pharm Technol Res, 2 : 236–240.

Valdivia-Padilla AV, Sharma A, Zegbe JA et Morales-Dominguez JF. 2025. Metabolomic Characterization and Bioinformatic Studies of Bioactive Compounds in Two Varieties of Psidium guajava L. Leaf by GC-MS Analysis. Int J Mol Sci, 26.

van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM et Lefkowitz RJ. 1995. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. Nature, 376 : 781–784.

Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzmán M, Velasco G et Díaz-Laviada I. 2011. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. Cell Death Differ, 18 : 1099–1111.

Varga ZV, Matyas C, Erdelyi K, Cinar R, Nieri D, Chicca A, Nemeth BT, Paloczi J, Lajtos T, Corey L, Hasko G, Gao B, Kunos G, Gertsch J et Pacher P. 2018. beta-Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. Br J Pharmacol, 175 : 320–334.

Velasco G, Hernandez-Tiedra S, Davila D et Lorente M. 2016. The use of cannabinoids as anticancer agents. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 64 : 259–266.

Villapol S. 2018. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. Cell Mol Neurobiol, 38 : 121–132.

Vuckovic S, Srebro D, Vujovic KS, Vucetic C et Prostran M. 2018. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. Front Pharmacol, 9 : 1259.

Wagner BK et Schreiber SL. 2016. The Power of Sophisticated Phenotypic Screening and Modern Mechanism-of-Action Methods. Cell Chem Biol, 23 : 3–9.

Webb DR, Handel TM, Kretz-Rommel A et Stevens RC. 2013. Opportunities for functional selectivity in GPCR antibodies. Biochem Pharmacol, 85 : 147–152.

Wittig F, Koch F, Pannenberg L, Bekeschus S, Ramer R et Hinz B. 2024. β-Caryophyllene Inhibits Endothelial Tube Formation by Modulating the Secretome of Hypoxic Lung Cancer Cells-Possible Role of VEGF Downregulation. Int J Mol Sci, 25.

Won KA et Spruck C. 2020. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). Int J Oncol, 57 : 1245–1261.

Wu C, Jia Y, Lee JH, Jun HJ, Lee HS, Hwang KY et Lee SJ. 2014. trans-Caryophyllene is a natural agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. Bioorg Med Chem Lett, 24 : 3168–3174.

Xia P, Zhang X, Xie Y, Guan M, Villeneuve DL et Yu H. 2016. Functional Toxicogenomic Assessment of Triclosan in Human HepG2 Cells Using Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening. Environmental Science & Technology, 50 : 10682–10692.

Xing C, Zhuang Y, Xu TH, Feng Z, Zhou XE, Chen M, Wang L, Meng X, Xue Y, Wang J, Liu H, McGuire TF, Zhao G, Melcher K, Zhang C, Xu HE et Xie XQ. 2020. Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2-G(i) Signaling Complex. Cell, 180 : 645–654 e613.

Xu S, Ma H, Bo Y et Shao M. 2019. The oncogenic role of CB2 in the progression of non-small-cell lung cancer. Biomed Pharmacother, 117 : 109080.

Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J, Fan W, Li Q, Wang Q, Zhong D et Miao X. 2006. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Genet Cytogenet, 171 : 31–38.

Yamada T et Akimitsu N. 2019. Contributions of regulated transcription and mRNA decay to the dynamics of gene expression. Wiley Interdiscip Rev RNA, 10 : e1508.

Yamaguchi M et Levy RM. 2016. beta-Caryophyllene promotes osteoblastic mineralization, and suppresses osteoclastogenesis and adipogenesis in mouse bone marrow cultures in vitro. Exp Ther Med, 12 : 3602–3606.

Yang L, Li FF, Han YC, Jia B et Ding Y. 2015. Cannabinoid receptor CB2 is involved in tetrahydrocannabinol-induced anti-inflammation against lipopolysaccharide in MG-63 cells. Mediators Inflamm, 2015 : 362126.

Yang M, Lv Y, Tian X, Lou J, An R, Zhang Q, Li M, Xu L et Dong Z. 2017. Neuroprotective Effect of beta-Caryophyllene on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of Necroptotic Neuronal Death and Inflammation: In Vivo and in Vitro. Front Neurosci, 11 : 583.

Yasin JA, Odat RM, Qtaishat FA, Tamimi M-AA, Alsufi MI, Younis OM, Alkuttob LA et Saeed A. 2024. The Prognostic Significance of NEDD9 Expression in Human Cancers: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Omics Exploration. Technology in Cancer Research & Treatment, 23 : 15330338241297597.

Zhang Y, Huang Q, Wang S, Liao Z, Jin H, Huang S, Hong X, Liu Y, Pang J, Shen Q, Wang Q, Li C et Ji L. 2022. The Food Additive beta-Caryophyllene Exerts Its Neuroprotective Effects Through the JAK2-STAT3-BACE1 Pathway. Front Aging Neurosci, 14 : 814432.

Zhang Y, Wang D, Peng M, Tang L, Ouyang J, Xiong F, Guo C, Tang Y, Zhou Y, Liao Q, Wu X, Wang H, Yu J, Li Y, Li X, Li G, Zeng Z, Tan Y et Xiong W. 2021. Single-cell RNA sequencing in cancer research. J Exp Clin Cancer Res, 40 : 81.

Zheng D, Xia K, Yu L, Gong C, Shi Y, Li W, Qiu Y, Yang J et Guo W. 2021. A Novel Six Metastasis-Related Prognostic Gene Signature for Patients With Osteosarcoma. Front Cell Dev Biol, 9 : 699212.

Zheng X, Sun T et Wang X. 2013. Activation of type 2 cannabinoid receptors (CB2R) promotes fatty acid oxidation through the SIRT1/PGC-1alpha pathway. Biochem Biophys Res Commun, 436 : 377–381.

ANNEXE 1

Recettes de solutions utilisées pour l'immunobuvardage de type western

Solutions	Produits	Quantités
Gel de séparation 4X pH 8,8	Tris-Base	90,85 g
	H_2O	500 ml
Gel de compression 4X ph 6,8	Tris-Base	30,3 g
	H_2O	500 ml
Acrylamide/Bis 30 %	Acrylsmide	300 g
	Bisacrylamide	8 g
	H_2O	1 L
APS 10 %	Persulfate d'ammonium	1 g
	H_2O	100 ml
Tampon de migration 10X	Tris-base	30,2 g
	Glycine	144 g
	SDS	10 g
	H_2O	1 L
Tampon de chargement SDS-Page 4X	Tris-HCl 1M	4 ml
	SDS 10 %	16 ml
	Glycérol	8 ml
	Bleu de bromophénol	80 mg
	H_2O	4 ml
	Dithiothréitol 1M	20 µL/100 µL
TBS 10X	Tris-base	24 g
	NaCl	88 g
	H_2O	1 L
TBS-T	H_2O	900 ml
	TBS 10X	100 ml
	Tween-20	1 ml
Tampon de transfert semi-dry	Tris-base	5,82 g
	Glycine	2,93 g
	Méthanol	800 ml
Tampon de lyse RIPA	PBS 1X	Complété à 100 ml
	Nonidet P-40	1 ml
	désoxycholate de sodium	0,5 g
	10% SDS	1 ml
	PIC 100X	10 µL/ml de RIPA
PIC 100X	PMSF 100 X	574,7 µL
	Aprotinine (5 mg/ml)	40 µL
	Leupeptine (5 mg/ml)	40 µL
	Chlorohydrate de benzamidine hydraté	31 mg
	Éthanol	1417 µL
Solution de blocage (LAIT)	Lait en poudre sans gras	5 g
	TBS-T	100 ml
Rouge Ponceau	Acide acétique	25 ml
	H_2O	475 ml
	Rouge Ponceau	0,5 g
PBS 1X pH 7,4	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Phosphate de sodium dibasique	1.44 g
	Phosphate de monopotasium	0.245 g
	H_2O	1 L

ANNEXE 2

Recettes pour gel polyacrylamide

GEL DE SÉPARATION

% GEL	H_2O dd (**ml**)	30 % ACRYLAMIDE/BIS (**ml**)	Tampon de séparation* (**ml**)	10 % m/v SDS (**ml**)	APS 10 % (**µL**)	TEMED (**µL**)
4 %	6.1	1.3	2.5	0.1	50	5
5 %	5.7	1.7	2.5	0.1	50	5
6 %	5.4	2.0	2.5	0.1	50	5
7 %	5.1	2.3	2.5	0.1	50	5
8 %	4.7	2.7	2.5	0.1	50	5
9 %	4.4	3.0	2.5	0.1	50	5
10 %	4.1	3.3	2.5	0.1	50	5
11 %	3.7	3.7	2.5	0.1	50	5
12 %	3.4	4.0	2.5	0.1	50	5
13 %	3.1	4.3	2.5	0.1	50	5
14 %	2.7	4.7	2.5	0.1	50	5
15 %	2.4	5.0	2.5	0.1	50	5
16 %	2.1	5.3	2.5	0.1	50	5

*Tampon de séparation – 1,5 M Tris-HCL pH 8.8

GEL DE COMPRESSION

% GEL	H_2O dd (**ml**)	30 % ACRYLAMIDE/BIS (**ml**)	Tampon de compression* (**ml**)	10 % w/v SDS (**ml**)	Persulfate d'ammonium 10 % (**µL**)	Tétraméthylènediamine (**µL**)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1	50	10
5%	5.7	1.7	2.5	0.1	50	10
6%	5.4	2.0	2.5	0.1	50	10

Tampon de compression – 0,5 M Tris-HCL pH 6.8

ANNEXE 3

Recettes de solutions utilisées pour la détermination de l'IC20

Solutions	Produits	Quantités
SDS 0,01 %	SDS 20 %	500 µL
	H_2O	1L
Résazurine 25 µg/ml	Résazurine	25 mg
	PBS	1 L
SDS 0,01 %	SDS 20 %	500 µL
	H_2O	1L
TNE 2X pH 7,2	Tris-hcl	1,21 g
	EDTA	0,3725 g
	NaCl	233,76 g
	H_2O	1 L
Solution Hoechst 1 mg/ml	Hoechst 33342	50 mg
	H_2O	50 ml
Solution Hoechst 30 µg/ml	Solution Hoechst 1 mg/ml	1500 µL
	TNE 2X	50 ml

ANNEXE 4

Listes des produits chimiques et trousses utilisés

Produits	Fournisseur	Numéro d'accession	Lot	Cas-no
DMEM	Wisent Bio Products	219-010-XK	219010034	
Sérum de veau fœtal	Thermo Fisher Scientific	35-077-CV	2202-3001	
MEM Vitamins 100 X solution	Thermo Fisher Scientific	25-020-CI	24223002	
Cytiva HyClone™ Penicillin Streptomycin 100X Solution	Thermo Fisher Scientific	SV30010	J230028	113-98-4/ 3810-74-0
Trypsin-EDTA (1X)	Thermo Fisher Scientific	25300-062	2756273	
PBS	Thermo Fisher Scientific	21600-069	280816	
EDTA	Sigma-Aldrich	E6758		60-00-4
RNeasy mini kit (50)	Quiagen	74104		
Quantitect reverse transcription kit (50)	Quiagen	205311		
Power SYBR green PCR master mix	Applied biosystems	4367659	2307640	
Western Lightning® Plus-ECL	Thermo Fisher Scientific	NEL104001EA	203-100401	
Tris-base	Thermo Fisher Scientific	BP152-1		77-86-1
Glycine	Sigma-Aldrich	G8790		56-40-6
SDS	Sigma-Aldrich	L-3771		151-21-3
Gycérol	Sigma-Aldrich	G6279		56-81-5
Bleu de bromophenol	Sigma-Aldrich	B5525		34725-61-6
Dithiothréitol	Sigma-Aldrich	D5545		3483-12-3
NaCl	Sigma-Aldrich	S9888		7647-14-5
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P2287		9005-64-5
Méthanol	Sigma-Aldrich	34860		67-54-1
KCl	Sigma-Aldrich	P3911		7447-40-7
Nonidet P 40	Sigma-Aldrich	74388		9016-450-9
Désoxycholate de sodium	Sigma-Aldrich	30970		302-95-4
Aprotinine	Sigma-Aldrich	4149		9087-80-1
leupeptine	Sigma-Aldrich	268690		7758-95-4
PMSF	Sigma-Aldrich	P7626		329-98-6
Chlorohydrate de benzamidine hydraté	Sigma-Aldrich	B6506		206752-36-5
Éthanol	Thermo Fisher Scientific	033361-K7		64-17-5
Lait en poudre sans gras	No name	3808		
Acide acétique glacial	Sigma-Aldrich	27221		64-19-7
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504		6226-79-5
Phosphate de sodium dibasique	Thermo Fisher Scientific	P-288	791594	7558-79-4
Phosphate de monopotasium	Thermo Fisher Scientific	02003815		7778-77-0
BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific	PI3227	KC139742	
Acrylamide	Thermo Fisher Scientific	17-1302-02	K3802703 910	79-06-1
Bisacrylamide	Sigma-Aldrich	2620	3297B019	110-26-9
Persulfate d'ammonium	Sigma-Aldrich	A3678	113K066	7727-54-0
tetraméthykéthylènediamine	Sigma-Aldrich	T928-1	103K1382	110-18-9
Résazurine	Sigma-Aldrich	R7017		62758-13-8
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	B2261		23491-45-4

ANNEXE 5

Script R pour le traitement des données et ajustement des courbes

```
#importation des données
resaz<-read.csv2("Resaz_CSV.csv")
Hoechst<-read.csv2("Hoechst_CSV.csv")
Resaz$survie<-as.numeric(gsub(",",".",Resaz$survie))
Hoechst$survie<-as.numeric(gsub(",",".",Hoechst$survie))
Resaz$exposition<-factor(Resaz$exposition,levels= c("30 m","1h","2h","4h","6h","24h"))
Hoechst$exposition<-factor(Hoechst$exposition,levels= c("30 m","1h","2h","4h","6h","24h"))
#Moyenne et STDV pour réplicat technique
Hoechst<-Hoechst%>%
group_by(experiment, exposition, concentration) %>%
summarise(moyenne_survie = mean(survie),sd_survie = sd(survie),n = n(),.groups = "drop")
resaz<-resaz%>%
group_by(experiment, exposition, concentration) %>%
summarise(moyenne_survie = mean(survie),sd_survie = sd(survie),n = n(),.groups = "drop")
#Enlever les valeurs de concentration qui sont de 0 et remplace les survies négative par 0
resaz <- resaz[resaz$concentration > 0, ]
Hoechst <- Hoechst[Hoechst$concentration > 0, ]
resaz$moyenne_survie <- ifelse(resaz$moyenne_survie < 0, 0, resaz$moyenne_survie)
Hoechst$moyenne_survie <- ifelse(Hoechst$moyenne_survie < 0, 0, Hoechst$moyenne_survie)
#nester les données selon les conditions
resaz <- resaz %>%
mutate(experiment = as.factor(experiment),exposition = factor(exposition, levels = c("30 m", "1h", "2h", "4h", "6h", "24h")))
resaz.nest <- resaz %>%
group_by(experiment, exposition) %>%
nest()
Hoechst <- Hoechst %>%
mutate(experiment = as.factor(experiment),exposition = factor(exposition, levels = c("30 m", "1h", "2h", "4h", "6h", "24h")))
Hoechst.nest <- Hoechst %>%
group_by(experiment, exposition) %>%
nest()
#faire une fonction pour calculer les paramètres optimaux LL.4
fit_model <- function(df) {drm(moyenne_survie ~ concentration,data = df,fct = LL.5(fixed = c(NA,0,100,NA,NA),names = c("b", "c", "d", "e","f")),logDose = "log")}
#utiliser la fonction sur nos données nester
resaz.nest <- resaz.nest %>%
mutate(model = purrr::map(data, fit_model)) %>%
mutate(params = purrr::map(model, coef))
Hoechst.nest<- Hoechst.nest %>%
mutate(model = purrr::map(data, fit_model)) %>%
mutate(params = purrr::map(model, coef))
#faire un objet incorporant les paramètres pour la courbe
resaz.params <- resaz.nest %>%
mutate(params = map(model, ~ {coefs <- as.list(coef(.))coefs[["d:(Intercept)"]] <- 100coefs[["c:(Intercept)"]] <- 0tibble::as_tibble_row(coefs)}))
%>%
unnest(params, names_repair = "unique")
Hoechst.params <- Hoechst.nest %>%
mutate(params = map(model, ~ {coefs <- as.list(coef(.))coefs[["d:(Intercept)"]] <- 100coefs[["c:(Intercept)"]] <- 0tibble::as_tibble_row(coefs)}))
%>%
  unnest(params, names_repair = "unique")
#créer des objets ayant les données brutes
raw_data_Hoechst <- Hoechst.params %>%
dplyr::select(experiment, exposition, data) %>%
unnest(data)
raw_data_resaz <- resaz.params %>%
dplyr::select(experiment, exposition, data) %>%
unnest(data)
#faire une fonctions pour déssiner les courbes
predict_LL5 <- function(conc, b, c, d, e, f) {c + (d - c) / (1 + exp(b * (log(conc) - log(e))))^f}
#Dessiner les courbes
resaz.pred <- resaz.params %>%
mutate(conc_seq = map(data, ~ seq(min(.x$concentration), max(.x$concentration), length.out = 500)),predicted = pmap(list(conc_seq,
`b:(Intercept)`, `c:(Intercept)`, `d:(Intercept)`, `e:(Intercept)`, `f:(Intercept)`),
function(conc, b, c, d, e, f) {tibble(concentration = conc,survie = predict_LL5(conc, b, c, d, e, f))})) %>%
dplyr::select(experiment, exposition, predicted) %>%
unnest(predicted)
Hoechst.pred <- Hoechst.params %>%
  mutate(conc_seq = map(data, ~ seq(min(.x$concentration), max(.x$concentration), length.out = 500)),predicted = pmap(list(conc_seq,
`b:(Intercept)`, `c:(Intercept)`, `d:(Intercept)`, `e:(Intercept)`, `f:(Intercept)`),
function(conc, b, c, d, e, f) {tibble(concentration = conc,survie = predict_LL5(conc, b, c, d, e, f))})) %>%
dplyr::select(experiment, exposition, predicted) %>%
unnest(predicted)
```

ANNEXE 6

Script R utilisé pour l'interpolation des ICs

```
#Fonction pour déterminer les EC(20,50 et 90)
get_ECx_values <- function(model, max_display = 600, percent_levels = c(20, 50, 90)) {
est <- tryCatch({
ed <- ED(model, percent_levels, interval = "delta")
df <- as.data.frame(ed)
df$EC <- rownames(df)
rownames(df) <- NULL
df <- df[, c("EC", "Estimate", "Lower", "Upper")]
colnames(df) <- c("Level", "Estimate_uM", "CI_Lower", "CI_Upper")
# Coerce all to character for consistent unnesting
df <- df %>%
mutate(
Estimate_uM = ifelse(Estimate_uM > max_display,
paste0(">", max_display),
format(round(Estimate_uM, 1), nsmall = 1)),
CI_Lower = ifelse(CI_Lower > max_display,
paste0(">", max_display),
format(round(CI_Lower, 1), nsmall = 1)),
CI_Upper = ifelse(CI_Upper > max_display,
paste0(">", max_display),
format(round(CI_Upper, 1), nsmall = 1)))
return(df)}, error = function(e) {return(data.frame(Level = NA, Estimate_uM = NA, CI_Lower = NA, CI_Upper = NA))})
return(est)}
#calcul des EC(20,50 et 90)
resaz.ecx <- resaz.nest %>%
rowwise() %>%
mutate(ECx = list(get_ECx_values(model))) %>%
unnest(ECx)
Hoechst.ecx <- Hoechst.nest %>%
rowwise() %>%
mutate(ECx = list(get_ECx_values(model))) %>%
unnest(ECx)
#S'assurer que les données ECX sont dans un data frame adéquat
resaz.ecx <- resaz.ecx %>% dplyr::select(-data, -model,-params)
Hoechst.ecx <- Hoechst.ecx %>% dplyr::select(-data, -model,-params)
#Exporter les données de EC
write_excel_csv2(resaz.ecx, "resaz_ecx.csv")
write_excel_csv2(Hoechst.ecx,"Hoechst_ecx.csv")
```