



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



Centre d'Études Doctorales : Sciences et Techniques

Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement ET Santé

THÈSE

Présentée par

AYAD HOUDA

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : Biologie

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Effet prolifératif et antiprolifératif du carvacrol et des composés aromatiques azotés sur les cellules cancéreuses P815, MCF7 et MDA-mb 468 : Corrélation avec l'expression de la phosphatase alcaline

Soutenu le 02 Mai 2019 à 10h devant la commission d'examen :

HAFID ABDERRAFIA	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Béni-Mellal	Président
ABDELKHALID ESSAMADI	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Settat	Rapporteur
NAJIMI MOHAMED	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Béni-Mellal	Rapporteur
GAMOUH AHMED	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Béni-Mellal	Rapporteur
CHIGR FATIHA	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Béni-Mellal	Examineur
KHOUILI MOSTAFA	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Béni-Mellal	Examineur
ELABBADI NOUREDDINE	Professeur à la Faculté des Science et Technique, Béni-Mellal	Directeur de thèse

RESUME

Le présent travail peut être divisé en deux parties :

Partie I

Effet prolifératif et antiprolifératif du Carvacrol, composé majoritaire de l'huile essentielle de thym, sur les cellules cancéreuses P815 : Corrélation avec l'expression intracellulaire de la phosphatase alcaline.

Dans un premier temps, les effets cytotoxiques *in vitro* de l'extrait acétate de Nigelle et l'huile essentielle du thym ont été évalués sur deux lignées cancéreuses, il s'agit de la lignée adhérente BSR et de la lignée non adhérente P815. Dans ces expériences, la vincristine est utilisée comme test positif. La modulation de l'activité phosphatase alcaline (APAL) dans les cellules tumorales par la présence des extraits et/ou drogues cytotoxiques utilisés dans le présent travail apparaît comme certaine. Ceci est particulièrement vrai pour la vincristine et pour l'extrait de Nigelle qui montrent une corrélation entre l'effet antiprolifératif et la stimulation de l'APAL intracellulaire dans les deux lignées tumorales P815 et BSR utilisées. En revanche, l'effet répresseur du Carvacrol comme celui de l'huile essentielle de thym sur l'APAL intracellulaire est un résultat nouveau, jamais détecté ou signalé auparavant lors de la stimulation ou l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales. La possibilité de l'implication de cette enzyme dans le contrôle prolifératif/antiprolifératif des cellules tumorales, soulève une fois de plus le rôle central que pourrait jouer cette activité phosphatase alcaline dans le développement du cancer.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu approfondir notre approche expérimentale afin de comprendre au niveau moléculaire l'action du Carvacrol sur les cellules cancéreuses ainsi que les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (PBMC). Ces travaux ont montré que l'inhibition de l'APAL par le Carvacrol, à faible concentration, est corrélée avec la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses P815. Le même phénomène a pu être observé dans les PBMC avec une sensibilité moindre (5 fois moins sensible). Les effets observés après 24 à 48 h d'incubation (cycle cellulaire) suggèrent fortement une régulation/inhibition au niveau de la transcription des gènes codant pour la ou les phosphatases alcalines dans les cellules cancéreuses P815. Cet effet prolifératif qui apparaît concomitant à l'effet répresseur du Carvacrol sur l'APAL, suggère

que lorsque cette activité enzymatique est réprimée les cellules tumorales P815 prolifèrent mieux. En revanche, à forte dose, le Carvacrol induit l'apoptose tout en réprimant l'APAL. Contrairement aux extraits ou drogues cytotoxiques qui montrent une corrélation entre l'effet antiprolifératif et l'augmentation de l'APAL. De plus, l'effet du Carvacrol à faible dose apparaît similaire à celui obtenu par l'action de l'agent mitogène pookweed (facteur de croissance) utilisé dans le présent travail. Cette propriété *mitogen-like* du Carvacrol renforce notre approche expérimentale et pourrait nous ouvrir une autre voie différente et nouvelle pour contrer ce fléau « le cancer » qui ne cesse de proliférer.

Tout naturellement dans un troisième temps, nous nous sommes servis de nos connaissances en culture cellulaire et les difficultés rencontrées pour évaluer l'effet cytotoxique des drogues et/ou des extraits (plantes ou autres) *in vitro*, pour mettre au point une nouvelle méthode d'appréciation de l'effet anti-cancéreux des drogues pures ou extraits en utilisant un colorant spécifique. Ce teste de viabilité qui donne les mêmes résultats que ceux obtenus par la méthode MTT (préconisée), présente des avantages indiscutables.

Partie II Evaluation de l'effet cytotoxique et antioxydant des différentes molécules nouvellement synthétisées, *famille des dihydropyrimidinones*, les *dérivés Hydrazones* et les Systèmes *Hétérocycliques Nitré*, sur les différentes lignées tumorales.

Les résultats obtenus sont très encourageants pour certaines molécules avec des effets anticancéreux (IC₅₀) aussi bien, si non mieux, que le cisplatine (anticancéreux de référence). Parallèlement, un effet antioxydant est systématiquement déterminé par le teste DPPH. Certaines molécules possèdent un pouvoir antioxydant comparable à celui de la vitamine C (teste positive). Ces travaux vont nous permettre de sélectionner les molécules « tête de série » et d'envisager une relation structure activité afin d'orienter la synthèse chimique.

Mots-clefs : cellules cancéreuses (P815, MCF-7, MDA-mb468), Carvacrol, proliférative, antiproliférative, effet biphasique, phosphatase alcaline, cytotoxicité, anti oxydant, dihydropyrimidinones, dérivés hydrazones, hétérocycliques nitrés.

REMERCIEMENTS

Au tout premier lieu, je remercie ALLAH le tout Puissant, le Clément et le Miséricordieux, pour m'avoir donné la chance de passer cette merveilleuse expérience doctorale, de m'avoir donné la force et l'audace pour l'achever et d'avoir mis sur mon chemin toutes les personnes qui ont contribuées de loin ou de près pour la réalisation de ce travail doctoral.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude et mes profonds remerciements à Monsieur le Professeur ELABBADI Noureddine, mon directeur de thèse. Outre sa patience, sa bienveillance et la confiance qu'il a toujours su manifester à mon égard, j'aimerais aussi le remercier pour ses directives constructives, ses multiples encouragements et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie Monsieur KHOUILI Mostafa et Monsieur HAFID Abderrafia professeurs à la FST Beni Mellal pour leur aide et leur collaboration constructive et notamment dans la deuxième partie de la thèse.

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir voulu évaluer ce travail et sans doute par leurs remarques pertinentes, vont permettre l'amélioration de la qualité du manuscrit et l'essor vers de nouvelles perspectives. Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Abderrafia HAFID pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse. J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur ESSAMADI Abdel Khaled, Monsieur le Professeur GAMOUH Ahmed et à Monsieur Professeur NAJIMI Mohamed pour l'intérêt qu'ils ont accordé à ma thèse en acceptant d'être rapporteurs. Je leur suis reconnaissante pour leur lecture attentive ainsi que pour leurs remarques et suggestions constructives. Je remercie également Madame le Professeur CHIGR Fatiha et Monsieur le Professeur KHOUILI Mostafa pour avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse.

D'un point de vue personnel, j'ai une pensée très tendre à ma grand-mère, décédée il y a peu, sa prière et sa bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance, j'espère qu'elle repose en paix...

Je tiens à exprimer mon infinie reconnaissance à ma très chère mère, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Merci pour avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui ! J'espère ne jamais te décevoir.

Egalement, je tiens à remercier profondément mon cher père pour son soutien, son amour et ses efforts. Merci pour tout!

Je remercie chaleureusement tous les membres de ma famille. Particulièrement, je suis très reconnaissante envers mes oncles et mes tantes pour leur affection inconditionnelle et leur soutien indéfectible.

Enfin, que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

DEDICACES

A la mémoire de ma tendre grand-mère qui serait contente d'apprendre que sa petite fille a terminé le travail qu'elle avait commencé. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son éternel paradis.

A ma très chère mère : Aucune dédicace ne saurait montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Que Dieu le tout puissant te préserve, te donne santé, bonheur et longue vie.

A mon très cher père : Je te dédie ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma gratitude pour ton soutien et ton encouragement. Je prie Dieu le tout puissant pour qu'il te donne bonheur, prospérité et longue vie.

A la mémoire de mon grand-père qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille en son vaste paradis.

A mes chers oncles et mes chères tantes : Ce travail vous doit beaucoup....Qu'il soit pour vous le témoignage de mon infinie reconnaissance et ma profonde estime. Que Dieu le tout puissant vous garde et vous donne santé et longue vie.

A toute ma famille...

A mes amis...

Sommaire

Liste des tableaux.....	10
Liste des Figures	11
Abréviations	12
PREAMBULE.....	14

Partie I

Chapitre I : Introduction Générale.....	18
1. Le cancer	18
1.1. Incidence et mortalité dues au cancer	20
1.2. La carcinogenèse	20
1.3. Mécanismes moléculaires de l'oncogenèse	23
1.3.1. Les gènes impliqués dans l'oncogenèse.....	23
1.4. Les traitements du cancer	25
1.4.1. La chirurgie.....	26
1.4.2. La radiothérapie.....	26
1.4.3. L'immunothérapie	26
1.4.4. L'hormonothérapie	27
1.4.5. La chimiothérapie	27
1.4.6. La thérapie ciblée.....	38
1.4.7. Les vaccins anticancéreux	43
1.4.8. Thérapie photodynamique	44
1.4.9. Hyperthermie.....	45
1.4.10. Thérapie génique	45
1.4.11. Autres traitements récents.....	47
1.4.12. La phytothérapie	47
1.5. Activités pharmacologiques des plantes.....	47
1.5.1. Plantes médicinales anticancéreuses	47
1.5.2. Plantes à effet préventif	49
1.5.3. Médicaments anticancéreux dérivés de plantes et d'autres sources naturelles.	51
1.6. L'apoptose : nouvelle cible pour la thérapie anticancéreuse	53
1.6.1. L'apoptose et approche thérapeutique.....	53

Références.....	57
Chapitre II : Valorisation des substances naturelles.....	67
2. Valorisation des substances naturelles: source potentielle de chimiothérapie anticancéreuse	69
2.1. Thymus brossonettii	71
2.2. Carvacrol	72
2.2.1. Origine du Carvacrol	72
2.2.2. Propriétés pharmacologiques	73
Références.....	77
Chapitre III : La phosphatase alcaline et cancer	81
3. La phosphatase alcaline et cancer.....	82
3.1. La liaison phosphomonoester et son hydrolyse	82
3.2. Les phosphatases	83
3.3. Les iso enzymes de la phosphatase alcaline et leur distribution	84
3.3.1. Phosphatase alcaline placentaire (PALP).....	84
3.3.2. Phosphatase alcaline intestinale (PALI).....	84
3.3.3. Phosphatase alcaline de cellules germinales (PALCG)	85
3.3.4. Phosphatase alcaline foie / os / rein ou tissu non spécifique (PALTNS).....	85
3.3.5. Gènes des phosphatases alcalines.....	86
3.3.6. Stabilité des phosphatases alcalines.....	88
3.3.7. Sensibilité aux inhibiteurs	88
3.3.8. Études immunologiques	88
3.3.9. Formes fonctionnelles des phosphatases alcalines	89
3.3.10. La phosphatase alcaline est un marqueur de tumeur:	90
3.3.11. Fonctions physiologiques de la PAL	90
Références.....	92

Partie II

Chapitre IV: Matériel et méthodes	97
4.1. La culture cellulaire	98
4.2. Le comptage cellulaire.....	98

4.3. Préparation et traitement des PBMC.....	98
4.4. Mesure de la cytotoxicité cellulaire	99
4.5. Détermination de l'activité phosphatase alcaline (PAL).	100
4.6. Effet antioxydant : méthode DPPH.....	101
Références.....	103
Chapitre V: Résultats Discussion Générale et Conclusion	104
5.1.Effet cytotoxique des huiles essentielles de Thym et des extraits de Nigelle sur les cellules cancéreuses P815 et BSR. Corrélation avec l'expression de la phosphatase alcaline	106
Références.....	110
5.2.Effet prolifératif et antiprolifératif du Carvacrol, composé majoritaire de l'huile essentielle de thym: Corrélation avec l'expression intracellulaire de la phosphatase alcaline.	113
5.3.Nouvelle méthode d'évaluation <i>in vitro</i> de l'effet cytotoxique des extraits et drogues sur les cellules cancéreuses et bactériennes : Méthode rapide, efficace et moins chère que celle préconisée actuellement (test MTT).	120
Références.....	122
5.4. Evaluation du pouvoir anti-oxydant et de l'effet anti-cancéreux et antibactérien des composés chimiques nouvellement synthétisés, famille des dihydropyrimidinones (DHPMs).....	127
5.4.1 évaluation de l'activité antioxydante des dérivés dihydropyrimidinones (DHPMs), nouvellement synthétisés	129
5.4.2. Activité antibactérienne.....	132
5.4.3. Evaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des pyrazolo-énaminones, bipyrazoles et bipyrazolo-pyridines	135
Références.....	138
5.5. Les dérivés hydrazino-hétérocycliques	139
Références.....	145
5.6. Etudes électrochimiques et pouvoir antioxydant des Systèmes Hétérocycliques Nitré.	148
5.7. Valorisation des jus à base de karoubi pour une commercialisation future.	151
5.8. Discussion Générale et Conclusion	153
Références.....	159
5.9. PERSPECTIVES	162
Références.....	168

Liste des tableaux

Tableau I : Les proto-oncogènes impliqués dans les tumeurs humaines

Tableau II : Exemples de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les cancers humaines

Tableau III : Analogues des bases puriques et pyrimidiques et cibles cancéreuses

Tableau IV : Médicaments dérivés de plantes, de microorganismes ou d'organismes marins.

Tableau V : Nomenclature des isozymes et des gènes humains de la PAL, localisation chromosomique, taille du gène et les numéros d'accession.

Tableau VI : Effet cytotoxique, exprimé en IC_{50} , des extraits éthanoliques et/ou d'acétate d'éthyle des graines de Nigelle, du thym ainsi que la vincristine et le Carvacrol sur les lignées P815 et BSR.

Tableau VII : Effet de différentes drogues sur l'activité phosphatase alcaline, exprimé en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux témoins.

Tableau VIII : Effet de différentes drogues sur l'activité phosphatase alcaline, exprimé en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux témoins

Table IX. Effect of carvacrol on both P815 cell viability and intracellular alkaline phosphatase activity.

Tableau X : IC_{50} (exprimé en $\mu\text{g/ml}$) des composés testés pour leur activité antioxydante

Tableau XI : Résultats des tests de l' IC_{50} de l'activité antibactérienne en μmol

Tableau XII : Résultats du test antibactérien des différents composés sur la Bactérie Escherichia coli

Tableau XIII : Résultats du test antibactérien des différents composés sur la Bactérie staphylococcus aureus

Tableau XIV : Résultats des zones d'inhibition (en mm) du test antibactérien des antibiotiques

Tableau XV : Résultats du test antioxydant (DPPH).

Tableau XVI. Evaluation de l'activité antioxydante (test DPPH) et cytotoxique (test MTT) des dérivés hydrazones

Liste des Figures

- Figure 1 : La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse
- Figure 2 : Illustration des principales caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose
- Figure 3 : Cibles pharmacologiques des médicaments cytotoxiques.
- Figure 4 : Métabolisme du cyclophosphamide:
- Figure 5 : Structures chimiques de certains médicaments à base de platine.
- Figure 6 : Structure chimique du methotrexate
- Figure 7 : Mécanisme d'action des antifoliques:
- Figure 8 : Structure chimique des bases nucléiques
- Figure 9 : Structures chimiques des antimitabolites analogues des bases puriques et pyrimidiques.
- Figure 10 : Structure du trastuzumab emtansine et mécanismes d'action.
- Figure 11 : Représentation schématique des principaux types de thérapies géniques et de stratégies d'administration pour la thérapie génique du cancer.
- Figure 12 : Schéma synthétique des voies apoptotiques proposées
- Figure 13 : Synthèse du carvacrol par isopropylation de l'o-crésol avec de l'IPA sur l'UDCaT-5.
- Figure 14 : Relation structure activité de quelques analogues du Carvacrol
- Figure 15 : Illustration des relations évolutives postulées entre les gènes du foie, des os, des reins, de l'intestin et du placenta.
- Figure 16 : Relation entre l'organisation des exons et la structure polypeptidique du gène PAL L / B / K.
- Figure 17 : Formes solubles et insolubles de la phosphatases alcalines
- Figure 18: Effect of carvacrol at various concentration on P815 cell viability and morphology after 48 hours of incubation
- Figure 19: Effect of carvacrol on both cell growth and intracellular alkaline phosphatase activities in PBMC
- Figure 20: Effect of carvacrol and pokeweed mitogen on P815 cell growth and intracellular alkaline phosphatase activity
- Figure 21 : Exemple de composés naturels et synthétiques contenant le noyau dihydropyrimidinique (DHPM)
- Figure 22: *In vitro* cytotoxicity effect of hydrazino-derivative compounds on P815 cancer cells.
- Figure 23: Effet cytotoxique *in vitro* de composés dérivés d'hydrazino sur des cellules cancéreuses
- Figure 24: Effet antioxydant des différentes fractions issues de karoubi

Abréviations

P815	: Mastocytome murin immunogène agressif
MCF-7	: Adénocarcinome de sein humain
MDA-mb468	: Adénocarcinome de sein humain
BSR	: Adénocarcinome d'hamster
ADN	: Acide désoxyribonucléique
MTT	: Méthyl Tetrazolium test
DCPIP	: 2,6 Dichlorophénolindophenol
ALL	: Leucémie lymphoblastique aigues
LAL	: Leucémie aigues lymphoblastique
Cis	: Cisplatine
DHFR	: Dihydrofolate réductase
5-FU	: 5-fluorouracil
FH2	: Dihydrofolate
FH4	: Tétrahydrofolate
TS	: Thymidylate synthase
TFT	: 5-Trifluorothymidine
MTX	: Méthotrexate
TOP	: Topoisomérases
ROS	: Reactive oxygen species
PI	: Proteasome inhibitor
L-ASNase	: L-Asparaginases
ASN	: Asparagine
SMD	: Small molecules drugs
Moabs	: Monoclonal Antibodies
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DCPIP	: 2,6 Dichlorophenolindophenol
DMSO	: Diméthyl sulfoxyde
TX-100	: Triton X-100
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra acide est un agent chelatent
APAL	: Activité phosphatase alcaline
PAL	: Phosphatase alcaline

LPS	: Lipopolysacharide
PBMC	: Cellules mononuclées du sang périphérique
POOK	: Pookweed-mitogene
DO	: Donsite Optique
PBS	: Phosphate buffered saline
SDS	: Dodécylsulfate de sodium

PREAMBULE

Dans la première partie de ce travail, nous présenterons tout d'abord une revue bibliographique (chapitre I) des connaissances actuelles concernant ce fléau « le cancer » qui ne cesse de progresser dans le monde. Le deuxième chapitre sera consacré aux substances naturelles : source potentielle de chimiothérapie anticancéreuse et enfin l'implication de la phosphatase alcaline dans le développement des cellules tumorales (chapitre III). Quand si possible, nous ferons allusion à notre approche expérimentale préconisée dans le présent travail de recherche. Dans la deuxième partie, nous déclinons les résultats et une discussion générale puis nous clôturons ce document par une conclusion et des perspectives.

Le cancer est une maladie intrinsèque de la cellule, inhérente à la nature même de sa propre machinerie enzymatique. Contrairement à de nombreuses maladies qui sont dues à un désordre métabolique ou au développement au sein de notre organisme d'un agent venu de l'extérieur (virus, bactéries, parasites), le cancer provient du fait que certaines de nos propres cellules ont perdu la capacité de contrôler leur prolifération consécutive à des causes chimiques, physiques ou biologiques, et ont réussi à contourner les mécanismes de surveillance qui, dans ces circonstances, les conduiraient normalement à la mort. Les cellules cancéreuses, devenues immortelles et insensibles aux signaux venus de l'extérieur, ne cessent de se diviser et finissent par envahir l'organisme entier.

Durant les deux dernières décennies, d'énormes efforts ont apporté l'espoir d'améliorer le traitement des maladies cancéreuses. De nombreuses alternatives de traitements ont été découvertes incluant des agents cytotoxiques nouveaux, des combinaisons d'agents multiples, des analogues hormonaux, la thérapie génique, de l'enzymothérapie, la thérapie ciblée etc. Parmi ces différentes approches thérapeutiques, la chimiothérapie curative reste un des moyens le plus utilisé « efficace » pour le traitement des maladies cancéreuses avancées.

La majorité des principes actifs utilisés en chimiothérapie anticancéreuse ont pour origine les plantes médicinales, citons à titre d'exemple les anthracyclines, l'adriamycine, la vincristine et la vinblastine. Le développement des molécules actives possédant des structures voisines ne peut que favoriser les phénomènes de résistance, d'où l'intérêt

d'exploiter de nouvelles cibles pharmacologiques avec de nouvelles molécules originales avec un mécanisme d'action original. C'est dans cette optique que nous avons lancé un programme de recherche des principes actifs, anticancéreux, à partir de plantes médicinales marocaines.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'effet du carvacrol pur, à faible et à forte concentration, sur la multiplication des cellules tumorales ainsi que les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Les résultats obtenus montrent très clairement que le comportement des cellules tumorales est différent selon la concentration du carvacrol dans le milieu d'incubation. Ainsi à forte concentration le carvacrol montre un effet inhibiteur alors qu'à faible concentration, il devient stimulateur de la croissance des cellules cancéreuses utilisées. Dans un deuxième temps, on a pu corréler cet effet stimulateur de la croissance cellulaire à la répression de l'activité phosphatase alcaline intracellulaire par le carvacrol (résultat inédit). L'agent mitogène pookweed (facteur de croissance) donne les mêmes résultats que le carvacrol. Cette propriété mitogen-like du carvacrol renforce notre approche expérimentale et pourrait nous ouvrir une autre voie différente et nouvelle pour contrer ce fléau « le cancer » qui ne cesse de proliférer. La phosphatase alcaline de type *proliférative* (PAL-*pr*) serait probablement responsable et/ou impliquée fortement dans une voie de «signalisation intracellulaire», contrôlant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses *via* un mécanisme impliquant la répression du gène codant pour PAL-*pr*. Cette activité PAL-*pr* pourrait être une enzyme particulière (iso-enzyme de la famille des phosphatases alcalines) et lorsqu'elle est réprimée de manière spécifique, directement ou indirectement, conduirait à la prolifération cellulaires cancéreuses. Dans cette hypothèse, la PAL-*pr* constituerait une cible potentielle pour l'immunothérapie et la chimiothérapie.

Les méthodes utilisées lors de la sélection initiale des anticancéreux potentiels doivent être suffisamment sensibles pour détecter de petites différences dans le nombre de cellules; mais suffisamment reproductibles sous diverses conditions expérimentales. C'est dans ce sens que nous avons mis au point et proposé le test DCPIP (2-6 DiChloroPhenol-Indophenol). Cette nouvelle approche qui est simple à mettre en place et qui assure des données fiables, constitue une bonne alternative et / ou complémentaire à la méthode MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide].

Parallèlement, nous avons entrepris une étude d'évaluation de l'effet cytotoxique et

antioxydant des différentes molécules nouvellement synthétisées, famille des dihydropyrimidinones, les dérivés Hydrazones Hétérocycliques et les systèmes Hétérocycliques Nitré. L'objectif étant de sélectionner des molécules 'tête de série' et d'envisager une étude relation structure-activité permettant l'orientation de la synthèse chimique afin d'améliorer l'efficacité cytotoxique.

Partie I

INTRODUCTION GENERALE

Chapitre I. Le cancer

**Chapitre II. Valorisation des substances naturelles :
Source potentielle de chimiothérapie
anticancéreuse**

Chapitre III. La phosphatase alcaline et cancer

Chapitre I

INTRODUCTION GENERALE

1. Le cancer

Le cancer est un terme qui englobe une grande diversité de maladies pouvant toucher l'ensemble des organes de l'organisme. Il est le résultat de la prolifération de cellules d'un type différent à partir de cellules normales de l'organisme. La prolifération peut être rapide ou lente. Une cellule cancéreuse n'obéit pas aux règles complexes d'architecture et de fonctionnement qui régissent d'habitude l'emplacement et le comportement des cellules dans un tissu. Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (un néoplasme) ou se propager à travers le corps et former des métastases.

L'apparition d'un cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes au cours desquelles l'accumulation d'anomalies sur différents gènes, au fil des divisions cellulaires, confère un avantage sélectif au clone malin. Les cellules, toutes issues d'une première cellule mutée (clone), forment une tumeur (Fig. 1). Celle-ci devient de plus en plus agressive pour son environnement et échappe progressivement à tout contrôle [1].

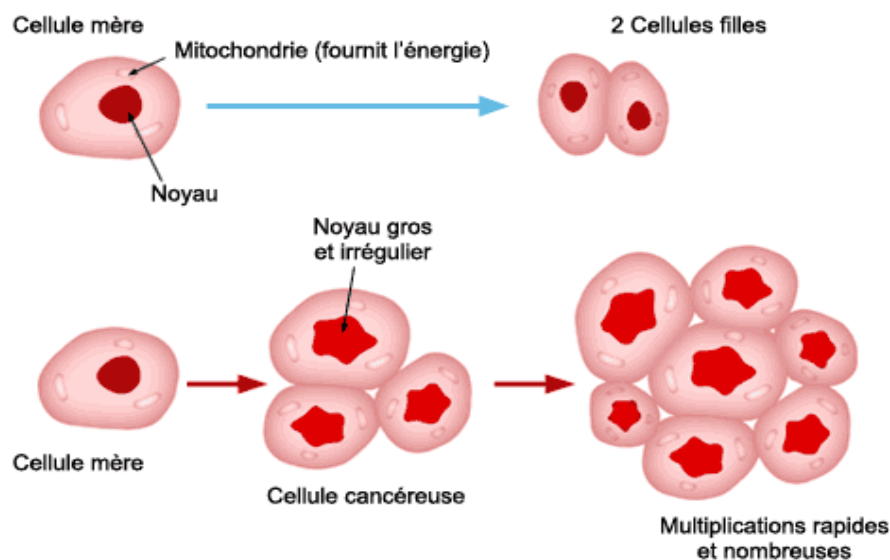


Figure 1 : La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse

Il est désormais acquis que le cancer est dû à une grave perturbation de la communication cellulaire. Il se caractérise par une prolifération cellulaire anarchique et indéfinie d'un clone cellulaire, une perte de la différenciation et une absence de mort cellulaire. Cette prolifération conduit à la destruction du tissu originel, ainsi que des tissus environnants. Sans traitement, l'envahissement conduit à la mort de l'individu [1].

Le cancer est causé par des modifications (mutations) de l'ADN dans les cellules. L'ADN est formé d'un grand nombre de gènes individuels, chacun d'entre eux contenant un ensemble d'instructions indiquant à la cellule ses fonctions, ainsi que les méthodes de croissance et de division. Des erreurs dans les instructions peuvent empêcher la cellule de fonctionner normalement et permettre à une cellule de devenir cancéreuse.

Il existe un certain nombre de facteurs favorisant le développement d'un cancer. Parmi ceux-ci, on distingue :

a. les facteurs biologiques :

➤ **Hérédité** : certaines variétés de cancer du sein ou de cancer du côlon sont plus répandues dans les familles à risques. Dans ces familles, une personne peut recevoir de ses parents et transmettre à ses enfants un gène, présent dans toutes ses cellules, qui favorise le mécanisme de développement d'un cancer.

➤ **Virus** : certains virus possèdent parfois un gène, dit oncogène viral, capable de transformer les cellules saines en cellules malignes. C'est pour cette raison qu'on appelle souvent, par opposition, les oncogènes normaux des cellules humaines des proto oncogènes cellulaires.

L'alimentation joue un rôle important dans l'apparition des cancers. En effet la consommation de graisses et des nitrites provenant du sel, utilisés comme conservateur alimentaire, sont accusés comme facteur favorisant le cancer de l'estomac. En revanche, la consommation régulière des fruits et des légumes diminue le risque de nombreux cancers.

b. les facteurs physiques

Les rayonnements ionisants (beta) et non ionisants (UV), responsables de modifications de l'ADN, déclenchent les mécanismes de la carcinogenèse qui se traduirait par un cancer après quelques années de latence [2].

c. Les facteurs chimiques

L'abus chronique de l'alcool favorise les cancers de la gorge, de l'œsophage et de foie. Les cancers de la peau et des poumons surviennent chez les travailleurs de l'arsenic et l'amiante. D'autres substances minérales pouvant induire un cancer sont signalées : le chrome et les sels de nickel induisent des tumeurs pulmonaires alors que le cadmium induit des tumeurs de la prostate. Les substances organiques aromatiques, comme le goudron de houille à base de noyaux anthracénique et phénanthrène, peuvent induire des cancers de la peau et du col utérin [2].

1.1. Incidence et mortalité dues au cancer

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2015, le cancer est considéré comme la première ou la seconde cause de décès avant l'âge 70 ans dans 91 pays sur 172, et se classe troisième ou quatrième sur 22 autres pays [3].

Les données disponibles [3], concernant l'incidence du cancer et la mortalité selon une répartition géographique dans 20 régions du monde, présentent une estimation de 18,1 millions de nouveaux cas de cancer et 9,6 millions de décès par le cancer en 2018 dans 185 pays. Dans les deux sexes réunis, le cancer du poumon est le plus souvent diagnostiqué (11,6% du total des cas) et la cause principale de décès (18,4% du total des décès par cancer), suivi par le cancer du sein chez les femmes (11,6%), cancer de la prostate (7,1%), cancer colorectal (6,1%), cancer de l'estomac (8,2%) et en fin le cancer du foie (8,2%) [3].

1.2. La carcinogenèse

La carcinogenèse décrit tous les mécanismes et les facteurs impliqués dans la transformation de la cellule. Plusieurs types d'inducteurs et de nombreuses étapes sont en cause dans la cancérisation d'une cellule saine [4]. L'oncologie actuelle reconnaît trois phases principales : phase d'initiation, phase de la promotion et la phase de progression [5].

Initiation : consiste essentiellement à des modifications irréversibles des cellules somatiques. L'initiation implique une ou plusieurs modifications cellulaires stables apparaissant spontanément ou induites par l'exposition à un cancérogène. Ceci est

considéré comme la première étape de la cancérogenèse, où le génome cellulaire subit des mutations, créant un potentiel de développement néoplasique et prédispose la cellule affectée et ses progénitures à la transformation néoplasique ultérieure [6,7]. Les séquences d'ADN humain responsables de la transformation s'appellent des oncogènes. Plusieurs des oncogènes actifs ont été isolés par clonage [5]. Une défaillance des mécanismes de réparation qui interviennent pour empêcher la transmission d'un matériel génétique altéré et une division cellulaire non contrôlée doivent se produire pour que l'initiation survienne. Les cellules qui ne sont pas initiées vont mourir soit par apoptose ou par nécrose :

- **Apoptose** : est une forme « physiologique » de mort cellulaire, hautement régulée et qui est indispensable à la survie des organismes multicellulaires. C'est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal précis. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. La cellule émet des signaux, en particulier l'exposition sur le feuillet externe de sa membrane plasmique de la phosphatidylsérine (phospholipide normalement constitutif de son feuillet interne) qui permettra sa phagocytose par les globules blancs (Fig. 2) [8].

- **Nécrose** : est une mort cellulaire dite "accidentelle" qui survient lors d'un dommage tissulaire et qui implique des groupes de cellules. Lors de la nécrose, la cellule gonfle puis la membrane cellulaire éclate déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquant localement une inflammation (Fig. 2). Cette inflammation est provoquée par la présence d'enzymes et de substances inflammatoires présentes dans le cytosol. Les organelles (notamment les mitochondries et le noyau) restent intactes tout au long de ce processus [8].

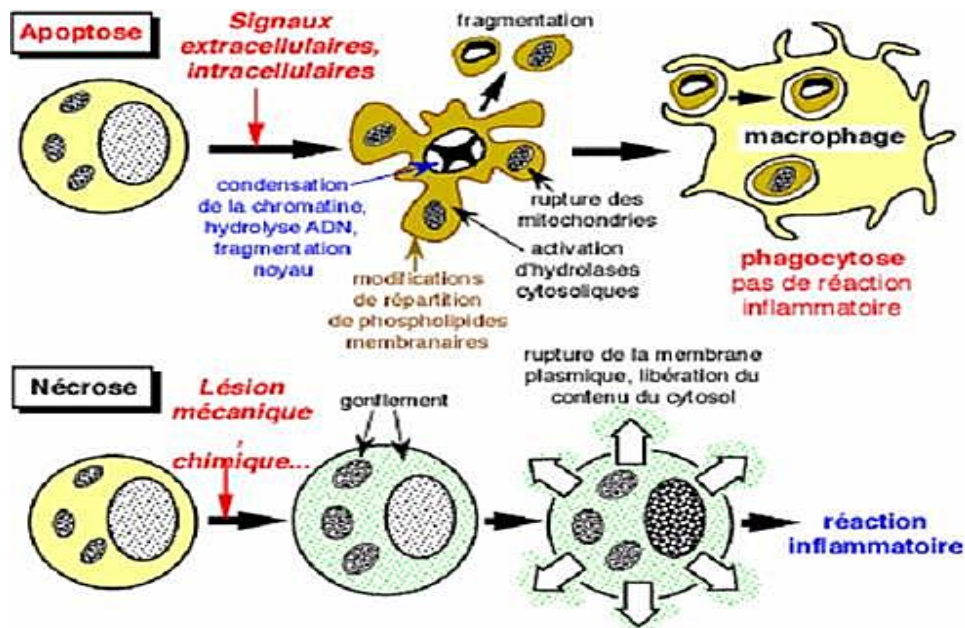


Figure 2 : Illustration des principales caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose

Promotion : la cellule transformée (initiée) peut rester inoffensive, à moins qu'elle soit stimulée pour continuer à proliférer, ce qui perturbe l'équilibre cellulaire. Les modifications ultérieures d'une cellule initiée conduisant à une transformation néoplasique peuvent impliquer plusieurs étapes et nécessitent des expositions répétées et prolongées à des stimuli promoteurs. Le développement néoplasique est influencé par l'environnement intra et extracellulaire. L'expression de la mutation initiale dépend non seulement de l'interaction avec d'autres mutations oncogènes, mais également des facteurs susceptibles de modifier temporairement les schémas d'expression de gènes spécifiques, par exemple : les cytokines, les métabolites lipidiques et certains esters de phorbol [5]. Ceci peut entraîner un accroissement du potentiel de croissance cellulaire et / ou un découplage des processus de communication intercellulaire qui restreignent l'autonomie cellulaire et coordonnent ainsi le maintien et le développement des tissus [6,9].

Progression : processus par lequel des modifications successives de la tumeur donnent lieu à des sous-populations de plus en plus malignes. Les mécanismes moléculaires de la progression tumorale ne sont pas entièrement compris, mais des mutations et des aberrations chromosomiques peuvent être impliquées. Le processus peut être accéléré par des expositions répétées à des stimuli cancérigènes ou par des pressions de sélection favorisant les dérivés clonaux autonomes. Les cellules initiées prolifèrent, provoquant une augmentation rapide de la taille de la tumeur. À mesure que la taille de la tumeur grossit,

les cellules peuvent subir d'autres mutations, ce qui entraîne une hétérogénéité croissante de la population cellulaire [5].

1.3. Mécanismes moléculaires de l'oncogenèse

Le gène est une unité d'information constituée d'une séquence ADN utilisée comme matrice pour synthétiser une protéine ou un ARN qui aura un rôle dans le fonctionnement de la cellule. Chez l'humain la taille du génome humain est de 3 200 000 000 paires de base (pb) [10]. La taille moyenne d'un gène est d'environ 3 000 pb, mais elle peut être très variable. 100 000 000 pb est une approximation rapide de la taille totale de l'ADN correspondant à des protéines. Cette petite portion du génome (environ 3 %) est qualifiée de codante. La majeure partie du génome humain est donc constituée de séquences non-codantes, qui correspondent notamment à des régions régulatrices de l'ADN [11].

Les dommages génétiques responsables d'un cancer peuvent survenir de diverses façons : des translocations génétiques peuvent juxtaposer deux gènes de telle manière que leur fonction n'est plus régulée, des mutations peuvent activer des gènes qui causent le cancer ou inactiver des gènes qui le préviennent, enfin des modifications épigénétiques des protéines qui s'associent à l'ADN peuvent modifier l'expression des gènes essentiels. Parfois, la première étape est la mutation des gènes qui empêchent normalement les mutations d'autres gènes, les cellules subissent alors rapidement des mutations supplémentaires qui à la suite d'une sélection naturelle morbide, produisent finalement le clone mutant qui génère une tumeur maligne [12].

1.3.1. les gènes impliqués dans l'oncogenèse

Les gènes associés au cancer ont été classés en deux catégories sur la base de leurs caractères cancérogènes ou protecteurs [4].

1.3.1.1. Les oncogènes

Les oncogènes sont des gènes cellulaires normaux qui participent à la stimulation des voies de croissance et deviennent anormalement activés en cas de cancer. Les mutations ponctuelles qui activent une enzyme de manière constitutive, les délétions qui suppriment les régions régulatrices négatives des protéines, ou l'augmentation de l'expression qui résulte de la dérégulation du promoteur ou de la multiplication du nombre de copies du

gène (amplification) [13] peuvent rendre les protéines correspondantes indifférentes aux signaux de régulation négative (Tableau I).

Tableau I : Les proto-oncogènes impliqués dans les tumeurs humaines

<i>Proto-oncogenes</i>	<i>Type d'anomalie</i>	<i>Exemples de tumeurs impliquées</i>
<i>ERBB1(EGFR)</i>	Surexpression ou mutation activatrice	Nombreux carcinomes
<i>ERBB2(HER2)</i>	Amplification	Carcinomes mammaires et ovariens
<i>FLT3</i>	Mutation activatrice	Leucémies aiguës myéloïdes
<i>RET</i>	Mutation activatrice	Carcinomes thyroïdiens
<i>PDGFR</i>	Mutation activatrice	Sarcomes, gliomes
<i>KIT</i>	Mutation activatrice	Tumeurs stromales gastro-intestinales
<i>KRAS</i>	Mutation activatrice	Carcinomes coliques, bronchiques, pancréatiques
<i>NRAS</i>	Mutation activatrice	Leucémies, mélanomes
<i>BRAF</i>	Mutation activatrice	Mélanomes
<i>ABL</i>	Translocation	Leucémie myéloïde chronique
<i>CMYC</i>	Translocation	Lymphome de Burkitt
<i>NMYC</i>	Amplification	Neuroblastomes
<i>CYCLINE D</i>	Translocation	Lymphomes du manteau
<i>CDK4</i>	Mutation activatrice	Mélanomes

1.3.1.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs (tumor suppressor genes) (TSGs)

Les TSGs agissent en sens inverse des oncogènes. Ce sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Leur inactivation n'empêchant plus la prolifération cellulaire et favorise donc la survenue des cancers. Certains TSGs sont spécifiques de certains cancers (Tableau II). Ainsi le gène RB1 est impliqué dans le développement du rétinoblastome. Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont impliqués dans les cancers du sein [14], APC dans les

cancers du colon [15], WT1 dans les cancers du rein [16]. D'autres ont un spectre d'inactivation plus large comme TP53 ou CDKN2A qui sont inactivés dans un grand nombre de types de cancer [17,18].

Tableau II : Exemples de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les cancers humaines

Genes suppresseurs	Exemples de tumeurs impliquees
TP53	Nombreux cancers
NF1	Tumeurs des nerfs périphériques
NF2	Méningiomes
APC	Carcinomes digestifs
WT1	Néphroblastome (tumeur de Wilms)

1.3.1.3. Les gènes de réparation de l'ADN

L'ADN est continuellement soumis aux activités métaboliques intrinsèques à la cellule et à des facteurs environnementaux externes qui portent atteinte à son intégrité. Les facteurs environnementaux peuvent être de nature physique (rayonnements), chimique (radicaux libres, médicaments) ou biologique (toxines, virus). On estime entre mille et plus d'un million le nombre de lésions par cellule et par jour [19]. Beaucoup de ces lésions provoquent des dommages tels que la cellule elle-même ne peut se reproduire ou donne naissance à des cellules-filles non viables. Les gènes de réparation de l'ADN sont capables de détecter et de réparer les lésions de l'ADN et prévenir cet état anormal. Les mécanismes de réparation de l'ADN garantissent la stabilité du génome. La capacité de réparation de l'ADN d'une cellule est essentielle à l'intégrité de son génome, et donc à son fonctionnement normal et à celui de l'organisme [4].

1.4. Les traitements du cancer

Le choix du protocole de traitement dépend essentiellement du type de cancer et de la localisation de la tumeur. Le but ultime de tous traitements est de détruire ou de bloquer la prolifération des cellules malignes.

1.4.1. La chirurgie.

Elle consiste à enlever la masse tumorale ou les tissus détériorés par le cancer. La chirurgie du cancer a des règles et des principes spécifiques pour la maladie néoplasique. Cela implique non seulement l'élimination de la tumeur en tant que formation pathologique locale, mais également l'implication de tout l'organisme. Dans de nombreuses situations, la simple excision avec résection étendue au-delà des limites de la tumeur ne résout pas le problème de la récurrence et des métastases. La chirurgie reste une méthode de base en oncologie, même s'il existe de nombreuses limites et contre-indications telles que les adénopathies, les métastases, etc. [2,20].

1.4.2. La radiothérapie

La radiothérapie est basée sur l'irradiation des cellules tumorales. Les rayons X et gamma sont capables de pénétrer dans la profondeur du tissu, détruisant les cellules tumorales. Elle est utilisée seule ou associée à la chirurgie. La tumeur est traitée de l'extérieur ou par des sources radioactives introduites dans l'organisme (curiethérapie). La radiothérapie induit des lésions directes dans l'ADN ou des molécules biologiques, qui finissent par affecter l'ADN. Ces changements dérèglent la division cellulaire et les cellules filles finissent par mourir [2].

1.4.3. L'immunothérapie

L'immunothérapie ne vise pas directement la tumeur. Elle agit principalement sur le système immunitaire du patient pour le rendre apte à attaquer les cellules cancéreuses. L'immunothérapie spécifique consiste à stimuler certaines cellules immunitaires pour les rendre plus efficaces ou à rendre les cellules tumorales plus reconnaissables par le système immunitaire. Elle repose sur les anticorps monoclonaux, notamment les inhibiteurs de points de contrôle, les anticorps bispécifiques, le transfert adoptif de cellules ou encore la vaccination anti-tumorale. Nous reviendrons sur cette partie lors qu'on abordera plus tard la thérapie ciblée (en 1.4.7.2 et 1.4.7.3) et les vaccins anticancéreux (1.4.8.).

1.4.4. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est un traitement qui consiste à bloquer l'action ou la production d'hormones naturelles afin d'empêcher le développement des cellules cancéreuses. Contrairement à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, qui cherchent à tuer rapidement les cellules cancéreuses, l'hormonothérapie vise à entraîner leur mort à plus long terme en créant un milieu hormonal qui leur est défavorable. Le développement de certaines cellules cancéreuses est stimulé par des hormones qui se fixent sur des récepteurs à la surface de ces cellules. Ces récepteurs sont alors activés, déclenchant des réactions à l'intérieur de la cellule, comme par exemple une division cellulaire. Différentes stratégies ont été développées :

- Stratégie 1: on bloque la production d'hormones.
- Stratégie 2: on empêche l'hormone d'agir au niveau de son site (cible)
- Stratégie 3: on fait les deux à la fois.

1.4.5. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à utiliser des entités chimiques pour soigner ou traiter les cancers. Ces agents ciblent des processus critiques pour la division cellulaire et notamment les cellules cancéreuses en croissance rapide [21]. Bien que les médicaments s'attaquent en particulier aux cellules cancéreuses, leur action toxique peut également toucher dans une bien moindre mesure les cellules saines. Ainsi, la plupart des chimiothérapies entraînent des effets secondaires comme la chute des cheveux, des nausées et des vomissements, la baisse des globules rouges et blancs. L'efficacité de la chimiothérapie est limitée également par les phénomènes de résistance. En effet, les cellules cancéreuses possèdent ou acquièrent la possibilité de contourner les mécanismes d'action des médicaments utilisés en chimiothérapie. Certains types de cancers sont naturellement résistants à tous les médicaments (exemple : cancers du rein ou de la thyroïde), d'où la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques synthétisées ou d'origine naturelle et de préférence moins toxique vis-à-vis des cellules hôtes. Quand la chimiothérapie est associée à la chirurgie et/ou à l'irradiation, on parle de chimiothérapie adjuvante [2].

Les agents cytotoxiques sont classés en fonction de leurs modes d'action [21] notamment les agents alkylants, les anti-métabolites, ciblage des microtubules, les inhibiteurs d'enzymes (topo-isomérases, etc.) et les antibiotiques (Fig. 3).

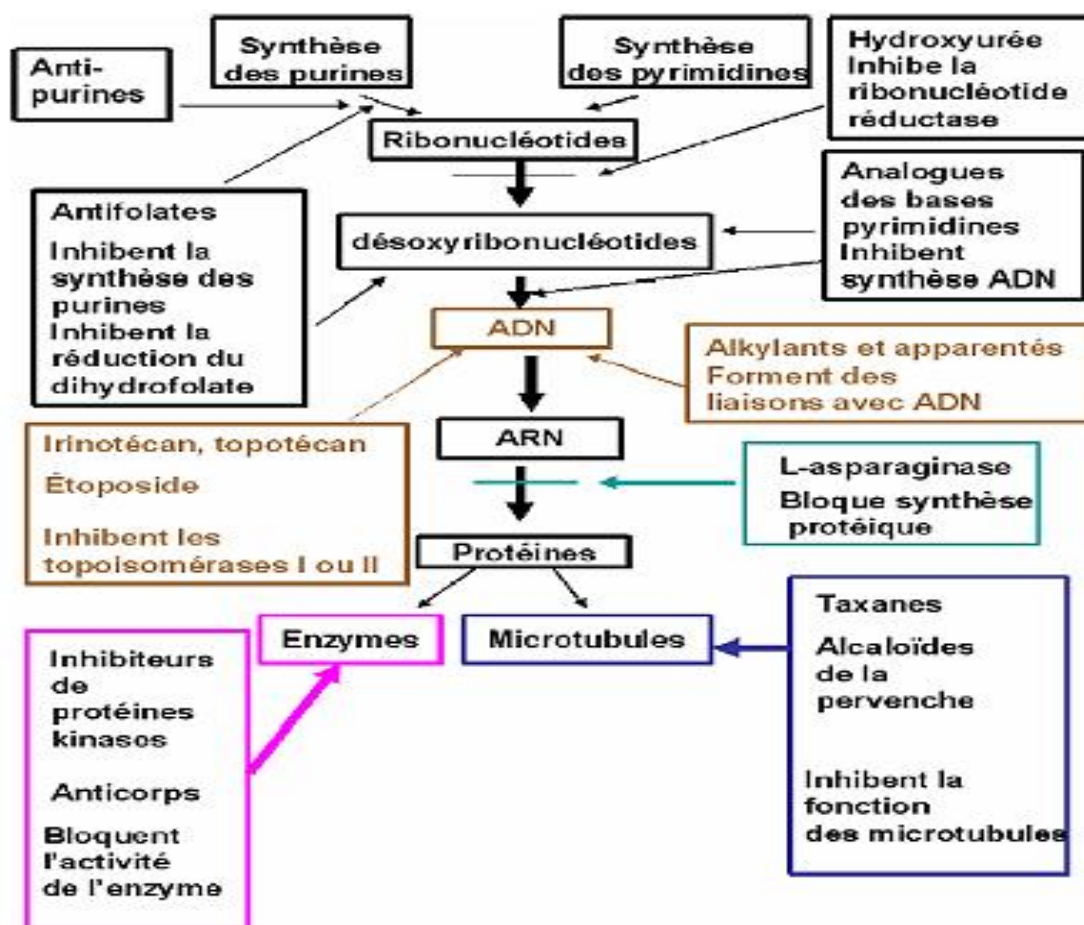


Figure 3 : Cibles pharmacologiques des médicaments cytotoxiques.

1.4.5.1. Les agents alkylants et les sels de platine

Les agents alkylants sont les premières molécules non hormonales génotoxiques à être utilisées dans le traitement du cancer [22]. Ces médicaments qui affectent les acides nucléiques et leur fonction par l'établissement des liaisons directes dans l'ADN et en interférant avec la réplication et la transcription entraînent des mutations. De cette manière, l'objectif de l'utilisation de ces agents est d'induire des dommages dans l'ADN des cellules cancéreuses et d'entraîner éventuellement la mort des cellules (apoptose). Les agents alkylants agissent en remplaçant un atome d'hydrogène dans une autre molécule par un

radical alkyle [23]. Ces molécules sont divisées en deux groupes : celles qui réagissent directement avec les molécules biologiques et celles qui forment d'abord des dérivés intermédiaires qui vont par la suite réagir avec les molécules biologiques.

On distingue les agents alkylants mono-fonctionnels (n'ayant qu'un seul lien chimique avec l'ADN) et les agents bi-fonctionnels qui créent de véritables ponts entre différents secteurs de l'ADN.

- Les alkylants monofonctionnels peuvent ne pas entraîner une véritable mort cellulaire du fait de l'existence d'enzymes de réparation de l'ADN (ligase, endonucléase, polymérase). Ils peuvent au contraire, favoriser l'apparition de l'ADN porteur de malformations, susceptibles d'évoluer secondairement en cancers chimio-induits.

- Les alkylants bifonctionnels comprennent le cyclophosphamide (Endoxan*) (Fig. 4), l'Ifosfamide, le melphalan, la procarbazine, le busulfan, le triphosphoramide, l'hexaméthylmélamine, la dacarbazine et la chlorméthine. Les moutardes azotées sont les premiers agents anticancéreux cliniquement utilisés [24]. Et leurs dérivés tel que le cyclophosphamide, qui n'est pas le produit actif mais il subit une activation dans l'organisme (Fig. 4) [25]. L'Ifosfamide est l'isomère du cyclophosphamide utilisé dans le traitement de sarcome des tissus mous localement avancé ou métastatique [26]. Au milieu des années 1980, l'Ifosfamide s'est avéré efficace chez les patients atteints de tumeurs germinales réfractaires [27].

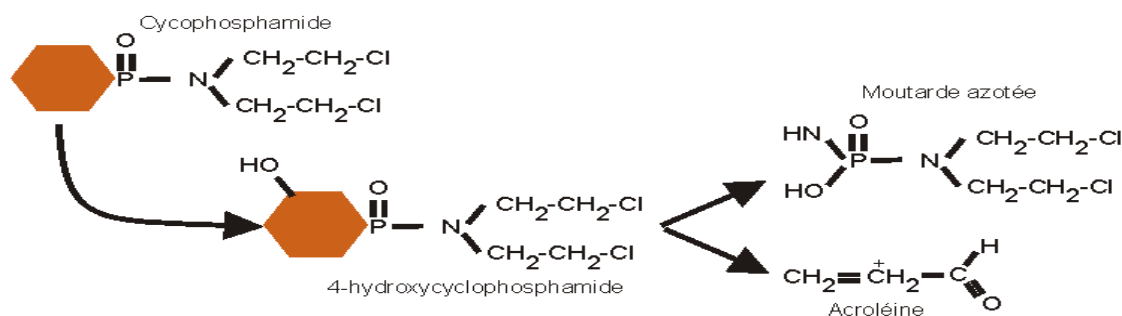


Figure 4 : Métabolisme du cyclophosphamide : Le cyclophosphamide est administré sous la forme d'un précurseur de médicament hautement stable, qui est transformé en 4 hydroxycyclophosphamide par l'hydroxylation du cycle oxazaphosphorine sur le cyclophosphamide par les systèmes hépatiques de cytochrome P-450. Plusieurs métabolites sont générés, mais le 4-hydroxycyclophosphamide est considéré comme le plus important car il se distribue dans tout le corps, notamment pour atteindre la tumeur où il est converti préférentiellement en moutarde à l'azote actif [28].

Rosenberg et ses collaborateurs ont signalés en 1965 que les complexes de platine présents dans le milieu nutritif à de faibles concentrations pouvaient inhiber la division cellulaire d'*Escherichia coli* [29]. Dans les années soixante-dix, l'efficacité chez des patients cancéreux a été établie [30]. Plus de 3 000 dérivés du platine ont été synthétisés et testés contre des cellules cancéreuses [31]. En raison des effets rénaux et neurotoxiques du Cisplaine, des efforts intensifs ont été déployés pour concevoir des analogues présentant moins d'effets secondaires graves.

Aujourd'hui, six composés de platine sont utilisés en clinique : le cisplatine (disponible depuis 1978), carboplatine, oxaliplatine et nédaplatine (analogues 2^{ème} génération) et lobaplatine et heptaplatine (analogues de 3^{ème} génération) (Fig. 5). Certains complexes de platine sont toujours à l'étude clinique, y compris ceux développés pour l'administration orale [23].

- Cisplaine (cis-diamine dichloroplatine), premier composé du platine approuvé par le FDA pour le traitement du cancer en 1978 [32], est un produit majeur dans la chimiothérapie anticancéreuse. Il est utilisé pour traiter différents types de cancers : tel que le sarcome, cancer des os, des muscles et des vaisseaux sanguins [33]. Les sels de platine sont des agents proches des alkylants dans leur mécanisme d'action. Leur mode d'action est lié à leur capacité de réticulation avec les bases puriques de l'ADN. Le cisplaine se lie au centre réactif N7 sur les résidus de purine et, en tant que tels, peuvent causer des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN). Une telle interférence avec les mécanismes de réparation de l'ADN peut induire l'apoptose des cellules cancéreuses comme les cellules saines. Le cisplatine nécessite une hydratation pour réagir avec les bases. La disposition 'cis' des radicaux chlore et nitrate est indispensable à l'action du cisplatine, car elle donne une forme coplanaire à la molécule. Les autres formes (formes trans) sont totalement inactives.

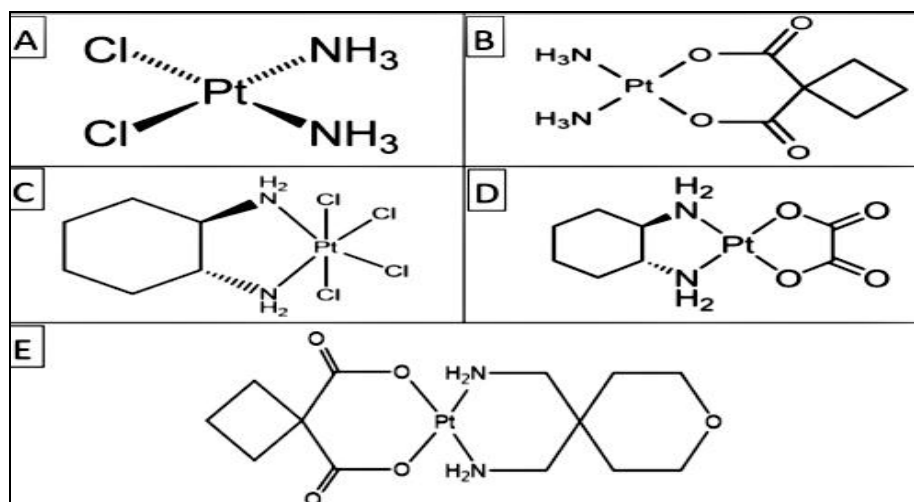


Figure 5 : Structures chimiques de certains médicaments à base de platine : (A) cisplatine; (B) carboplatine; (C) oxaliplatine; (D) dormaplatine; (E) enloplatin [34].

1.4.5.2 Les Anti métabolites

Les anti-métabolites sont des agents cytotoxiques développés depuis plus de 65 ans et considérés comme un pilier dans la chimiothérapie anticancéreuse. Les anti-métabolites peuvent être divisés en fonction de leurs structures et de leurs fonctions. On trouve les analogues de l'acide folique, de la purine, de la pyrimidine et les analogues de la cytidine [23].

a/ Les antagonistes de l'acide folique

L'acide folique (ou vitamine B9) est une substance indispensable à la synthèse de d'ARN et de l'ADN. Les cellules de mammifères n'ont pas la capacité de synthétiser leurs propres dérivés de folate réduits et doivent donc les obtenir de sources exogènes (c'est-à-dire des compléments alimentaires et diététiques). Dans les cellules normales comme cancéreuses, l'acide folique est réduit en dihydrofolate (FH2) puis en tétrahydrofolate actif (FH4) qui est un cofacteur indispensable fournissant des méthyles pour la synthèse des bases puriques (adénine, guanine) et de la thymidine (base pyrimidinique) en présence de la thymidylate synthase (TS) (Fig. 7) [35]. La dihydrofolate réductase (DHFR) est bloquée par le méthotrexate alors que la TS est inhibée par les métabolites polyglutamates du méthotrexate et les métabolites actifs du 5-fluorouracile (5-FU). On va retrouver le 5-FU dans les antithymidiniques puisqu'il agit aussi sous la forme d'un faux substrat dans la synthèse de l'ADN. Les antagonistes de l'acide folique, encore appelés antifolates, sont des drogues cytotoxiques utilisées comme antinéoplasiques, antimicrobiens, anti-

inflammatoires et comme agents immunosuppresseurs. Ils agissent comme drogues anti-métaboliques cytotoxiques en interférant avec une ou plusieurs étapes de biosynthèse impliquant les co-enzymes folates [22,36].

Le méthotrexate, acide 2,4-diamino-N10-méthylpropylglutamique (Fig. 6), agit de manière sélective sur la phase S de la réplication cellulaire. Il est l'un des agents thérapeutiques largement utilisés dans le traitement des cancers : comme le lymphome, la leucémie aigue lymphoblastique (LAL) et l'ostéosarcome.



Figure 6 : Structure chimique du méthotrexate (acide (N-[4-[(2,4-diamino-6 pteridinyl)méthyl]méthylamino]benzoyl]-L-glutamique) et comparaison avec la structure du folate (acide ptéroyl-L-glutamique)

De plus, le méthotrexate (MTX) fait partie des schémas chimiothérapeutiques du choriocarcinome, du cancer du sein, de la vessie et des cancers de la tête et du cou [37]. Le MTX est aussi un médicament utilisé pour le traitement de certaines maladies non cancéreuses comme l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et la maladie cutanée du greffon contre l'hôte (graft-versus-host dans les tumeurs digestives) [22]. Le MTX qui pénètre dans les cellules *via* un porteur de folate réduit (RFC) ou *via* la protéine de liaison au folate membranaire (FBP) est polyglutamé par la folylpolyglutamate synthétase (FPGS) en MTX polyglutamate. Ce dernier peut être conservé dans les cellules pendant des périodes plus longues par rapport au MTX [38,39]. La cible principale de MTX et de MTX-polyglutamate est l'inhibition de l'enzyme DHFR, entraînant une déplétion partielle des cofacteurs FH4 nécessaires à la synthèse de nouveaux nucléotides, thymidylate et purines (Fig. 7). Par conséquent, la synthèse de l'ADN et de l'ARN diminuera. En outre, les polyglutamates de MTX sont également des inhibiteurs d'autres enzymes nécessitant du

folate, telles que : TS et deux enzymes liées à la synthèse de novo-purine – la glycinamide ribonucléotide transformylase (GART) et l’ aminoimidazole carboxamide ribonucléotide transformylase (AICART) [38]. Dans les cellules normales, une diminution de la polyglutamation est observée par rapport aux cellules malignes, ce qui explique en partie la sélectivité du MTX pour le tissu malin [40]. Malgré cette prédilection pour les cellules malignes, le MTX peut tuer des cellules normales se divisant rapidement telles que celles de l’épithélium intestinal et de la moelle osseuse [41]. Les effets indésirables fréquents sont la cytopénie, les infections graves, les lésions hépatiques, les problèmes cutanéomuqueux, l’alopécie et la pneumopathie interstitielle allergique [42].

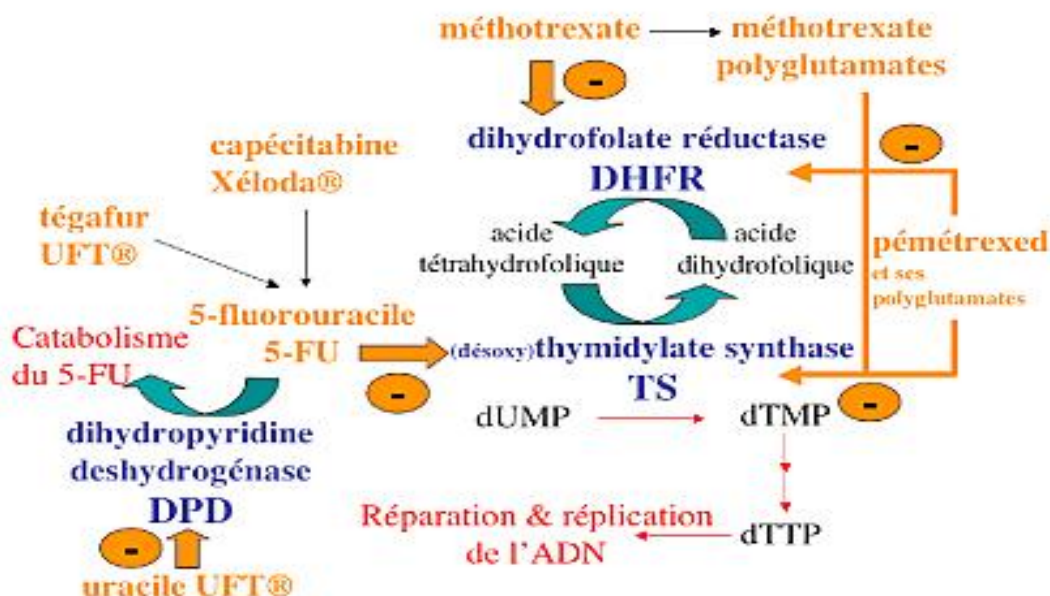


Figure 7 : Mécanisme d’action des antifolates : Sites d’action du méthotrexate (MTX) et MTX polyglutamates (MTX-glu)_n. Le MTX entre dans la cellule soit par le transporteur du folate réduit soit par les protéines membranaires de fixation des folates. Le MTX est ensuite polyglutamylé par l’enzyme folylpolyglutamate synthétase. Le MTX (glu)_n est un puissant inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR). Les MTX polyglutamates sont hydrolysés en MTX dans le lysosome par γ -glutamyl hydrolase (GGH). CH₂FH₄ = méthylène tétrahydrofolate ; dTMP = déoxythymidine monophosphate ; dUMP = déoxyuridine monophosphate/déoxyuridylylate ; FH₂ = dihydrofolate ; FH₄ = tétrahydrofolate ; MTX = méthotrexate ; MTX (glu)_n = méthotrexate polyglutamate avec n résidus glutamate.

Le pemetrexed qui a la capacité de bloquer simultanément plusieurs enzymes, la DHFR, la TS et la glycinamide ribonucléotide formyltransférase (GARFT) (Fig. 7) [43] a été approuvé par le FDA en 2004 pour le traitement du mésothéliome pleural malin (MPM) et du cancer du poumon (cellules mineures avancées ou métastatiques). Actuellement, des

essais cliniques évaluent l'efficacité du pemetrexed dans d'autres tumeurs malignes telles que les cancers du sein, colorectal, de la vessie, du col utérin, de l'estomac et du pancréas.

b/ Les analogues des bases puriques et pyrimidiques.

Le développement des analogues des bases puriques et pyrimidiques comme agents anticancéreux a évolué depuis qu'on a su que les acides nucléiques sont impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire. Ces analogues inhibent la réplication de l'ADN en s'incorporant à la place des bases nucléiques (Fig. 8) [36, 44]. Il a été démontré que plusieurs médicaments à base de purine et de pyrimidine exercent une activité anticancéreuse contre diverses tumeurs solides, leucémies et lymphomes. Parmi les médicaments à base de pyrimidine, on trouve les analogues de désoxycytidine, la cytarabine, la gemcitabine, la troxacitabine et la sapacitabine, ainsi que le fluorouracile et le capecitabine (Fig. 9). Deux autres analogues nucléosidiques à base d'uracile substitué en 5 (5-fluoro-dUrd [5FdUrd] et 5-trifluorothymidine [TFT]) sont en cours d'approbation pour un usage clinique. Parmi les analogues à base de purine, on trouve la thioguanine, la mercaptopurine et son précurseur médicamenteux, l'azathioprine et les analogues de la désoxyadénosine, fludarabine, cladribine et clofarabine (Fig. 9). Les dérivés de désoxyguanosine comme le nélarabine, un promédicament de β -D arabinofuranosylguanine, et le 2-difluoroguanosine sont en cours d'évaluation.

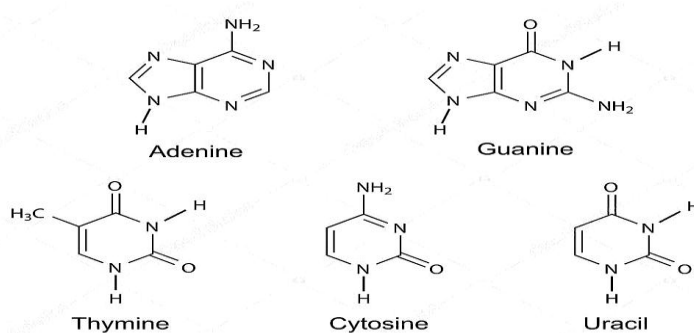


Figure 8 : Structure chimique des bases nucléiques.

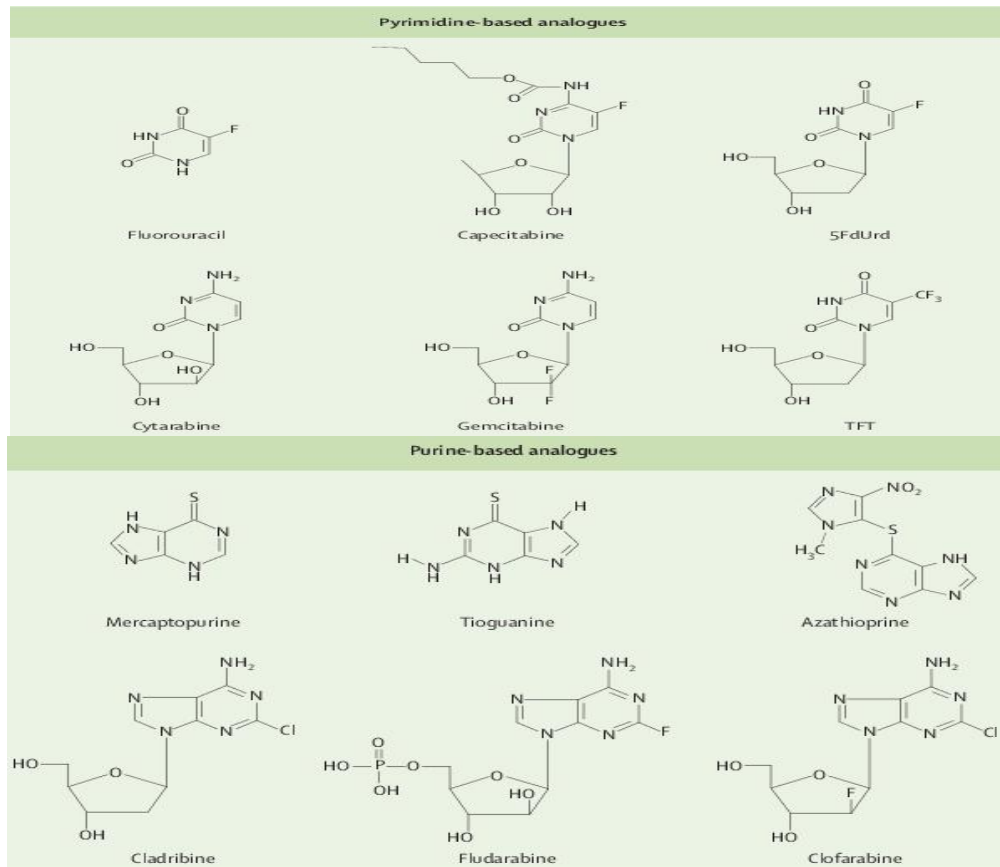


Figure 9 : Structures chimiques des antimétabolites analogues des bases puriques et pyrimidiques. 5FdUrd = 5-fluorodésoxyuridine. TFT = 5-trifluorothymidine [45].

Les différents cancers traités par des médicaments approuvés cliniquement sont montrés dans le tableau III [45].

<i>Analogues des bases puriques</i>	Cancer ciblé
<i>Mercaptopurine</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë
<i>Thioguanine</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë et leucémie myéloïde
<i>Azathioprine</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë
<i>Fludarabine</i>	la leucémie lymphocytaire chronique
<i>Cladribine</i>	leucémie à tricholeucocytes lymphome non hodgkinien
<i>Clofarabine</i>	leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) récidivante ou réfractaire
<i>Analogues des bases pyrimidiques</i>	
<i>Cytarabine</i>	Leucémie aiguë lymphoblastique et myéloïde
<i>Gemcitabine</i>	Cancers du pancréas, du poumon, du sein et de la vessie
<i>Fluoracil</i>	Cancers gastro-intestinaux, pancréatiques, de la tête et du cou, du rein, de la peau et du sein
<i>Capecitabine</i>	Cancers du sein et cancer colorectal

1.4.5.3. Les produits agissant sur l'ADN-topoisomérase

Les topo-isomérases sont des enzymes clés dans les processus de réplication assurant la spiralisation / déspiralisation de l'ADN. Les inhibiteurs de topo-isomérases ciblent les cellules cancéreuses en empêchant le déroulement de l'ADN, ce qui est essentiel pour la réplication, la transcription et la division cellulaire. Deux principales topo-isomérases sont présentes dans les cellules humaines, TOPI et TOPII, et des médicaments qui ciblent l'une ou l'autre protéine sont utilisés pour le traitement des cancers. TOPI, ou topo-isomérase de type I, effectue des coupures 'simple brin' d'ADN, tandis que TOPII permet des coupures 'double brin'. La camptothécine, extraite de la plante chinoise *Camptotheca acuminata*, est l'un des premiers inhibiteurs de TOPI identifiés. La camptothécine et ses dérivés : le topotécan et l'irinotécan, sont indiqués dans le traitement de tumeurs solides. L'irinotécan est une prodrogue métabolisée par le foie en produit actif qui inhibe l'activité de la topo-isomérase en se liant à l'intermédiaire de la réaction de l'ADN TOPI. Les mécanismes d'action des inhibiteurs de TOPII, tels que la doxorubicine, l'étoposide et la daunorubicine, incluent l'intercalation dans l'ADN et les modifications enzymatiques. L'étoposide possède une activité antitumorale à large spectre à la fois sur les tumeurs d'origine hématopoïétique et sur les tumeurs solides. Les anthracyclines, agents intercalants, sont aussi des inhibiteurs de la topo-isomérase II [2, 46].

1.4.5.4. Les agents tubulo-affines

Les microtubules constituent la cible essentielle pour les produits d'origine naturelle. Les agents tubulo-affines perturbent la progression de la mitose et la dynamique du cytosquelette. Les vinca-alcaloïdes empêchent la formation de microtubules ou induisent une dépolymérisation, tandis que les taxanes stabilisent les microtubules ou augmentent la polymérisation. Les vainca-alcaloïdes sont isolés à l'origine de la pervenche (*Catharanthus roseus*) et ils sont utilisés pour traiter le diabète, l'hypertension artérielle et le cancer. La vinblastine, la première vinca alcaloïde décrite, s'est révélée très efficace dans le traitement de la maladie de Hodgkin, la leucémie et d'autres cancers chez des modèles murins. D'autres vinca-alcaloïdes, notamment la vincristine, la vinorelbine et la vinedésine, sont utilisés en clinique pour le traitement de divers cancers. Les taxanes sont utilisés pour traiter un certain nombre de cancers, tels que le cancer de l'ovaire, le poumon, le sein et la

prostate. Le paclitaxel, le premier taxane caractérisé, est isolé de l'écorce de l'if du Pacifique, *Taxus brevifolia*. Les dérivés semi-synthétiques du paclitaxel, du docétaxel et / ou du cabazitaxel sont approuvés par le FDA pour le traitement des cancers avancés de la prostate, du sein, de la tête, du cou et du colon [21].

1.4.5.5. *Les antibiotiques*

Les antibiotiques sont principalement des dérivés de la bactérie *Streptomyces* et, comme les autres classes des agents cytotoxiques, ils agissent sur l'ADN pour tuer les cellules cancéreuses. Les anthracyclines, qui comprennent la doxorubicine (adriamycine), la daunorubicine, l'idarubicine et l'épirubicine, constituent une classe d'agents antibiotiques chimiothérapeutiques couramment utilisés dans le traitement de plusieurs cancers. Les anthracyclines induisent une cytotoxicité des cellules cancéreuses *via* quatre mécanismes principaux : l'inhibition de la synthèse de l'ADN ou de l'ARN par intercalation entre les bases; inhibition de l'enzyme topo isomérase II, génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et interférence avec l'interaction histones-ADN. La doxorubicine est largement utilisée en clinique dans le traitement des cancers du sein, du col utérin, de l'estomac et de l'endomètre, ainsi que pour la leucémie aiguë et le lymphome non hodgkinien [47]. La daunorubicine est la première anthracycline utilisée dans le traitement du cancer, où elle s'est avérée efficace dans la leucémie lymphoïde aiguë chez l'adulte [48]. L'un des principaux inconvénients de l'utilisation d'anthracycline pour le traitement du cancer est le risque élevé de cardiotoxicité. D'autres agents chimiothérapeutiques dérivés de bactéries comprennent l'actinomycine D, la bléomycine, la mitomycine C et la mitoxantrone. L'actinomycine D était l'antibiotique le plus ancien utilisé dans le traitement du cancer, où il augmentait le taux de survie de la tumeur de Wilms chez l'enfant à 90% [21, 49, 50].

1.4.5.6. *Enzymo-thérapie, Asparaginase (L-ASNase)*

Les L-Asparaginases (L-ASNase) sont des agents antinéoplasiques efficaces, utilisés dans le traitement de première intention de divers troubles lymphoprolifératifs et en particulier les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). L-Asparaginase est utilisée en association avec d'autres agents, notamment le méthotrexate, la doxorubicine, la

vincristine et la prednisone [51]. Actuellement, trois préparations de L-ASNase sont disponibles pour une utilisation clinique : enzyme native d'Escherichia coli (Elspar®); une L-ASNase de E. coli pégylée (Oncospar®) et une enzyme native erwinia d'Erwinia chrysanthemi (Erwinase®).

Le mécanisme d'action de la L-ASNase repose sur l'hypothèse que les cellules tumorales, en particulier les cellules leucémiques, nécessitent une quantité énorme d'acide aminé asparagine (Asn) pour maintenir leur croissance maligne rapide. Ces cellules manquent de quantités adéquates d'asparagine synthétase et dépendent d'une source exogène d'Asn pour leur survie. La L-ASNase catalyse l'hydrolyse de la L-ASN en acide L-aspartique et en ammoniac, entraînant ainsi une diminution significative de la quantité d'asparagine en circulation dans le plasma [37,52].

Comme les médicaments, les enzymes ont aussi des effets indésirables et le plus couramment observé sont liés à l'inhibition de la synthèse des protéines et aux réactions allergiques. Les réactions d'hypersensibilité peuvent être résolues en utilisant des versions modifiées de L-ASNase telles que l'asparaginase (PEG) conjuguée au polyéthylène glycol (PEG). La pegasparaginase réduit les réactions immunogènes et possède une demi-vie considérablement plus longue, ce qui réduit le nombre d'injections pour le patient. Au cours des dernières années, des essais cliniques ont montré l'importance de la pegasparaginase dans le traitement de la LAL chez les enfants et les adultes [53,]. Néanmoins, la résistance apparaît lors de l'induction de l'asparagine synthétase dans les cellules tumorales [54] et l'administration de L-ASNase peut induire le développement d'anticorps neutralisant l'enzyme [51, 52, 55].

1.4.6. La thérapie ciblée

Le concept thérapeutique ciblé ou moléculairement ciblé implique l'utilisation d'un composé médicamenteux pour bloquer et / ou minimiser la croissance des cellules cancéreuses. Durant ce processus, les tissus normaux ne sont pas affectés et ce type de traitement peut être plus efficace et moins cytotoxique que la chimiothérapie traditionnelle non ciblée. Par conséquent, l'objectif principal des thérapies ciblées est de traiter les cellules cancéreuses avec moins d'effets secondaires. Les médicaments à petites molécules

(SMD), les anticorps monoclonaux (moabs), les anticorps conjugués (ADC) ainsi que les vaccins anticancéreux font partie des agents de base largement utilisés [56].

1.4.6.1. Les médicaments à petites molécules (SMD)

Les SMD peuvent pénétrer plus facilement la membrane cellulaire et la barrière hémato-encéphalique. Ils sont de simples molécules organiques de faible poids moléculaire (<1000 kDa) pouvant être administrées par voie orale ou intraveineuse. Ces médicaments sont utilisés comme inhibiteurs d'enzymes dans le traitement du cancer et d'autres maladies.

a/ Les inhibiteurs de kinase

Les inhibiteurs de kinase forment un groupe de molécules qui inhibent spécifiquement l'action d'une ou de plusieurs protéines kinases. Ils peuvent donc être subdivisés ou caractérisés par les acides aminés dont la phosphorylation est inhibée [57]. Ces inhibiteurs bloquent la fonction de signalisation cellulaire. L'administration de fortes doses d'inhibiteurs de kinases aux patients empêchent les kinases de se lier au système chaperon Hsp90-Cdc37, un complexe de molécules qui joue un rôle vital dans la stabilité des protéines [58,59]. Quelques exemples des inhibiteurs de tyrosine-Kinase qui sont actuellement utilisées : Erlotinib dans le traitement des cancers pulmonaire métastatiques, Lapatinib dans le traitement du cancer sein HER2-positif et Sorafenib dans le traitement du cancer du rein.

b/ Les inhibiteurs du protéasome (IP)

Les inhibiteurs du protéasome (IP) sont la deuxième classe de SMD. Les cellules transformées sont plus sensibles à ce type de médicament que les cellules saines [60, 61]. La lactacystine est le premier IP non peptidique. Comme les SMD se sont avérés plus efficaces dans le myélome multiple que dans d'autres cancers. Ils sont introduits dans la pratique clinique en monothérapie ou en association avec d'autres composés déjà établis (carzomzomib, marizomib et MLN9708) [62].

c/ Les inhibiteurs de la cyclindependent kinase (CDK)

Le besoin urgent de nouveaux médicaments anticancéreux ciblés a conduit au développement d'un type supplémentaire d'inhibiteur appelé inhibiteurs de la cyclindependent kinase (CDK) [63]. Ils fonctionnent en arrêtant les cellules dans la phase

G1 du cycle cellulaire. Palbociclib est un nouveau médicament expérimental approuvé par le FDA (Food and Drug Administration), sélectif des CDK 4 et 6. Les CDK 4 et 6 sont deux kinases étroitement apparentées qui permettent la progression des cellules tumorales pendant les phases G1 et S du cycle cellulaire. De nombreux inhibiteurs de CDK à large spectre tels que l'avopiridol et l'olomoucine, ainsi que certains inhibiteurs de CDK tels que la fascaplysine, la ryuvidine et le purvalanol A, font actuellement l'objet d'études cliniques [64].

En général, ce type de molécule capable d'inhiber simultanément plusieurs cibles, y compris les récepteurs des cellules ou les protéines de la voie de transduction du signal, s'est révélé moins spécifique que les anticorps monoclonaux thérapeutiques. Par conséquent, l'utilisation de certaines de ces molécules peut augmenter le risque de toxicité et de symptômes gastro-intestinaux. En effet, il a été démontré que les thérapies à ciblage moléculaire qui sont utilisées en combinaison avec la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle ou les anticorps monoclonaux (moabs) permettent d'obtenir de meilleurs résultats [65].

1.4.6.2. Les anticorps monoclonaux (moabs)

En raison de leurs interactions spécifiques aux épitopes, les moabs demeurent l'une des stratégies de traitement du cancer les plus prometteuses. Ils ont la capacité de cibler des antigènes spécifiques tels que les antigènes de différenciation hématopoïétique, les antigènes de matrice extracellulaire, les glycoprotéines des tumeurs solides, les molécules nécessaires à la croissance et la différenciation, les inhibiteurs de l'angiogénique et les glycolipides et glucides [66,67]. Conformément à leurs caractéristiques fondamentales, les moabs reconnaissent simplement les cellules cancéreuses et les rendent visibles au système immunitaire. L'ofatumumab (HuMax-CD20), un agent de destruction des cellules B, est un moab développé contre la protéine CD20, qui se trouve principalement à la surface des cellules B du système immunitaire. Le rituximab (Mabthera) utilisé dans le traitement du lymphome non hodgkinien et de l'alemtuzumab (MabCampath) est également un composé appartenant à la même catégorie [68-70].

Un autre groupe de moabs stimule une réponse immunitaire anticancéreuse en se liant aux récepteurs situés à la surface des cellules immunitaires et en inhibant les signaux qui

les empêchent d'attaquer les cellules cancéreuses. Le panitumumab (IgG2) et le cétuximab (IgG1) sont un type de moab qui cible le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), bien qu'ils diffèrent par leur isotype et donc par leur mécanisme d'action. Ils peuvent également déclencher l'apoptose et activer le système immunitaire pour détruire les cellules tumorales [71,72].

Le FDA a approuvé un grand nombre d'anticorps monoclonaux et de nombreux autres sont en cours d'essais cliniques. Au cours des dernières décennies, une nouvelle génération de médicaments à base monoclonale est mise au point à l'aide de méthodes de modification de la partie Fc des anticorps monoclonaux et de présentation du phage, ainsi que des procédures de transformation du virus d'Epstein-Barr [73,74]. Malgré les avantages offerts par ces médicaments, les patients présentent toujours des effets secondaires tels que des symptômes pseudo-grippaux, des réactions allergiques graves, des lésions d'organes impliquant généralement le cœur, les poumons, reins, foie ou cerveau. De plus, leur densité moyenne est généralement inférieure à celle des anticorps polyclonaux. En ce qui concerne leur spécificité, les moabs dirigés contre des épitopes conformationnels sur des protéines natives peuvent perdre de la réactivité avec des antigènes qui sont peu perturbés. Ainsi, ils peuvent parfois présenter des réactions croisées inattendues avec des antigènes non apparentés.

Des chercheurs ont récemment découvert un anticorps monoclonal unique capable de pénétrer efficacement dans les cellules cancéreuses, car la plupart des protéines associées au cancer sont situées à l'intérieur de la cellule [75].

1.4.6.3. Les anticorps conjugués

Les anticorps conjugués (ADC) également appelés immunoconjugués appartiennent à la famille des anticorps monoclonaux (moab). La différence entre les moab et les ADC est que la molécule ADC consiste en un anticorps lié à un petit composé tel que la toxine végétale ou bactérienne, un médicament de chimiothérapie ou une molécule radioactive. Le mécanisme d'action est basé sur le fait que le moab (adresse) conduit la toxine dans la cellule cancéreuse où elle va manifester son activité cytotoxique (Fig. 10). En fait, le processus est plus complexe et lorsque l'ADC pénètre dans la circulation, le lieu qui conjugue le moab à la toxine doit être stable pour ne pas être endommagé. Cependant, le

moab doit pouvoir se lier spécifiquement à la cible et être intériorisé par la cellule pour faciliter une meilleure libération du médicament (sous forme active). Enfin, l'efficacité élevée de l'ADC par rapport à la cible sélectionnée est due à sa toxicité [76]. 90Y ibritumomab tiuxetan qui est un ADC approuvé par le FDA, cible l'antigène CD20 pour délivrer de l'yttrium-90 à des cellules B non radioactives. Un autre ADC est le tositumomab 131I, qui cible l'antigène CD20 pour délivrer de l'iode 131 radioactif aux cellules de lymphome non hodgkinien. MLN0264 expérimental est conçu pour délivrer sélectivement une charge utile cytotoxique extrêmement puissante aux tumeurs exprimant la guanyl cyclase C (GCC). MLN0264 consiste en un agent hautement toxique, la monométhyl auristatine E (MMAE), lié à un anticorps qui reconnaît la GCC via un lieu clivable [77].

Dans le cas des ADC, certains inconvénients doivent encore être surmontés. Pour que les ADC soient utilisés dans le traitement du cancer, la tumeur doit être testée pour l'expression de l'antigène cible. De plus, la charge utile peut devenir toxique à la suite d'une libération prématurée. De plus, comme mentionné ci-dessus, une toxicité peut être provoquée par une liaison non spécifique à des tissus sains et à des tumeurs solides hétérogènes [78].

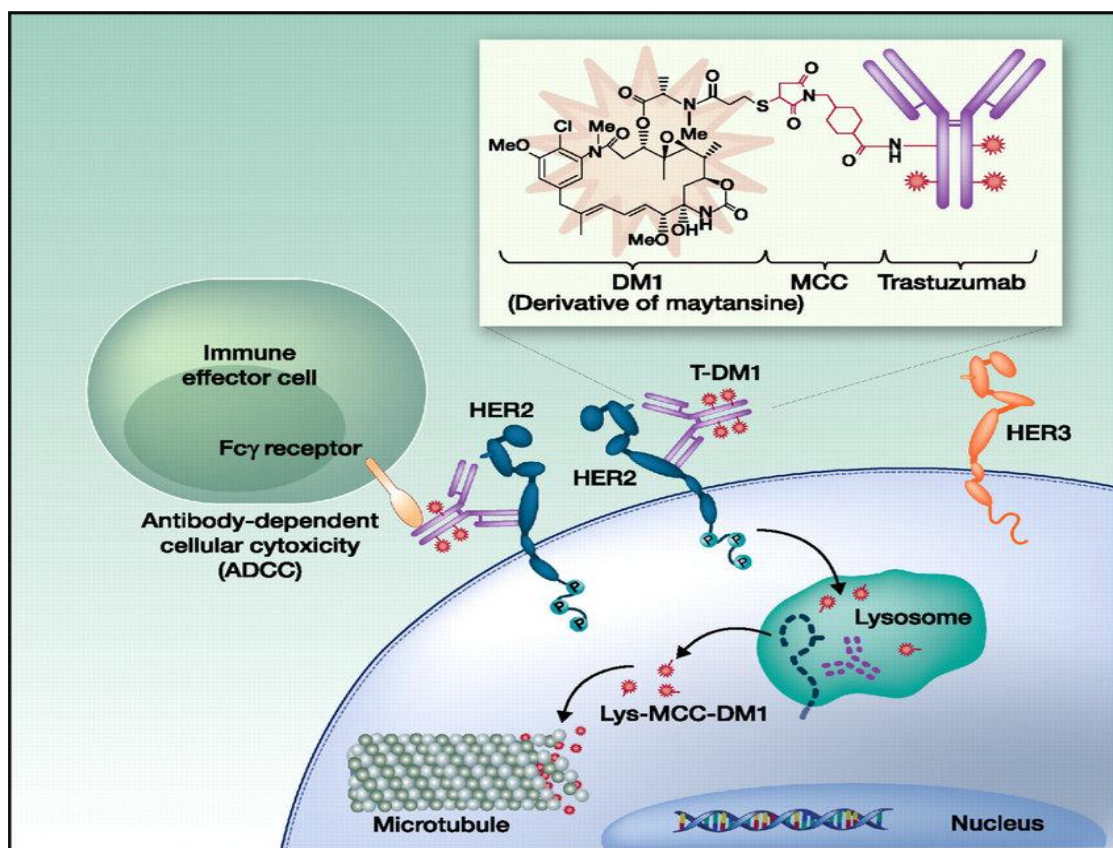


Figure 10 : Structure du trastuzumab emtansine et mécanismes d'action. Lors de la liaison du trastuzumab emtansine (T-DM1) au récepteur 2 du facteur de croissance humain (HER2), le T-DM1 est internalisé et subit une dégradation lysosomale. Cela entraîne la libération de DM1, qui se lie à la tubuline, ce qui entraîne la suppression de l'instabilité dynamique des microtubules et la prévention de la polymérisation des microtubules. Il a également été démontré que T-DM1 conserve les mécanismes d'action du trastuzumab, notamment la perturbation de la transduction du signal de HER2 et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Trastuzumab emtansine : un anticorps conjugué unique en cours de développement pour le cancer du récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 positif [79].

1.4.7. Les vaccins anticancéreux

Les vaccins anticancéreux appartiennent à la famille des modificateurs de la réponse biologique. Ils sont classés en tant que vaccins préventifs (ou prophylactiques) et vaccins thérapeutiques. Dans le domaine du cancer, on utilise des vaccins thérapeutiques destinés soit au traitement des cancers déjà développés, soit à la prévention de la maladie. En ce qui concerne le mode d'action du système immunitaire, il est capable de réponses spécifiques et non spécifiques contre les cellules tumorales. Pour qu'un vaccin anticancéreux soit efficace, il doit pouvoir stimuler le système immunitaire pour qu'il agisse principalement et d'une manière spécifique sur la tumeur. Dans ce cas, il présenterait des antigènes

tumoraux aux cellules immunitaires et activerait les CD4 (également appelés cellules T auxiliaires) et les cellules T CD8 (également appelés cellules T cytotoxiques ou tueuses). Les cellules T CD8, lorsqu'elles sont activées, tuent directement les cellules tumorales [80], tandis que les cellules T CD4 sont activées indirectement par les cellules dendritiques et les macrophages [81] pour produire des messagers (cytokines) qui stimulent l'activité des cellules T CD8 (tueuses) [82,83].

Divers vaccins candidats contre le cancer ont été prometteurs lors d'études cliniques préliminaires (phases I et II). Ces vaccins sont dirigés contre le carcinome à cellules rénales, le mélanome, le cancer du côlon, du sein et de la prostate, ainsi que le cancer du sang (hématologique). Presque tous ont progressé vers des études cliniques de phase III. Sipuleucel-T (APC8015, nom commercial Provenge) est le premier vaccin thérapeutique anticancéreux approuvé par FDA pour le cancer de la prostate. C'est un vaccin contre les cellules dendritiques. Les autres types de vaccins anticancéreux étudiés sont les vaccins à cellules tumorales, les vaccins à antigènes et les vaccins à base d'ADN et de vecteurs [84,85].

A ce stade, il convient de mentionner que ce type d'immunothérapie a des effets systémiques et locaux. Des études récentes ont montré que la vaccination avec des cellules souches embryonnaires pouvait générer une immunité antitumorale efficace contre le cancer de l'ovaire [86]. Les cellules cancéreuses utilisées pour la mise au point de vaccins pour le traitement du cancer contiennent une proportion élevée de cibles qui pourraient ne pas être spécifiques à un cancer [87].

1.4.8. Thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (TPD) est une technologie qui utilise un photosensibilisateur activé lors de l'exposition à la lumière visible ou proche infrarouge (NIR) et transfère de l'énergie à l'oxygène moléculaire, générant ainsi des espèces réactives de l'oxygène (par exemple, oxygène singulet, radicaux libres, peroxydes). L'oxydation ultérieure des lipides, des acides aminés et des protéines induit la mort cellulaire [88]. Les photosensibilisants approuvés par le FDA absorbent dans les régions spectrales visibles en dessous de 700 nm, où la lumière pénètre seulement quelques

millimètres dans la peau. La thérapie photodynamique est donc limitée au traitement de certains types de cancer de la peau et son efficacité pour d'autres tumeurs n'est pas encore confirmée [89, 90].

1.4.9. Hyperthermie

L'hyperthermie, en tant que traitement anticancéreux, consiste à chauffer une tumeur utilisant des micro-ondes, des ultrasons et des radiofréquences afin d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses dans le but de les détruire ou de les rendre plus sensibles aux effets des protocoles conventionnels de radiothérapie et de chimiothérapie. En fait, l'hyperthermie est actuellement utilisée en tant que traitement d'appoint à la radiothérapie et / ou à la chimiothérapie. Lorsque les cellules sont chauffées au-delà de leur température normale, elles peuvent devenir sensibilisées aux agents thérapeutiques classiques tels que la radiothérapie et la chimiothérapie. Lorsque des températures élevées sont utilisées, généralement supérieures à 43 °C, la chaleur provoque des dommages irréparables et entraîne la mort des cellules tumorales dans un processus appelé ablation thermique. Le succès de l'ablation thermique locale consiste à détruire la totalité de la masse tumorale sans endommager les structures vitales adjacentes. Cette exigence est particulièrement importante pour les patients ayant des réserves limitées de fonction tissulaire [90].

1.4.10. Thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire un gène sain (ou gène - médicament) dans l'organisme du malade afin de corriger l'anomalie génétique responsable de la maladie. Le transporteur du gène-médicament dans l'organisme est appelé vecteur. Ces vecteurs sont le plus souvent des fragments de virus dont on utilise les capacités naturelles à s'introduire dans les cellules et à y déposer leur ADN (Fig. 11). Ces fragments sont dérivés de plusieurs types de virus (adeno-associated virus, lentivirus...) et ne contiennent aucun des éléments responsables des propriétés pathogènes des virus, pour n'en conserver que les qualités de « transporteurs » [91].

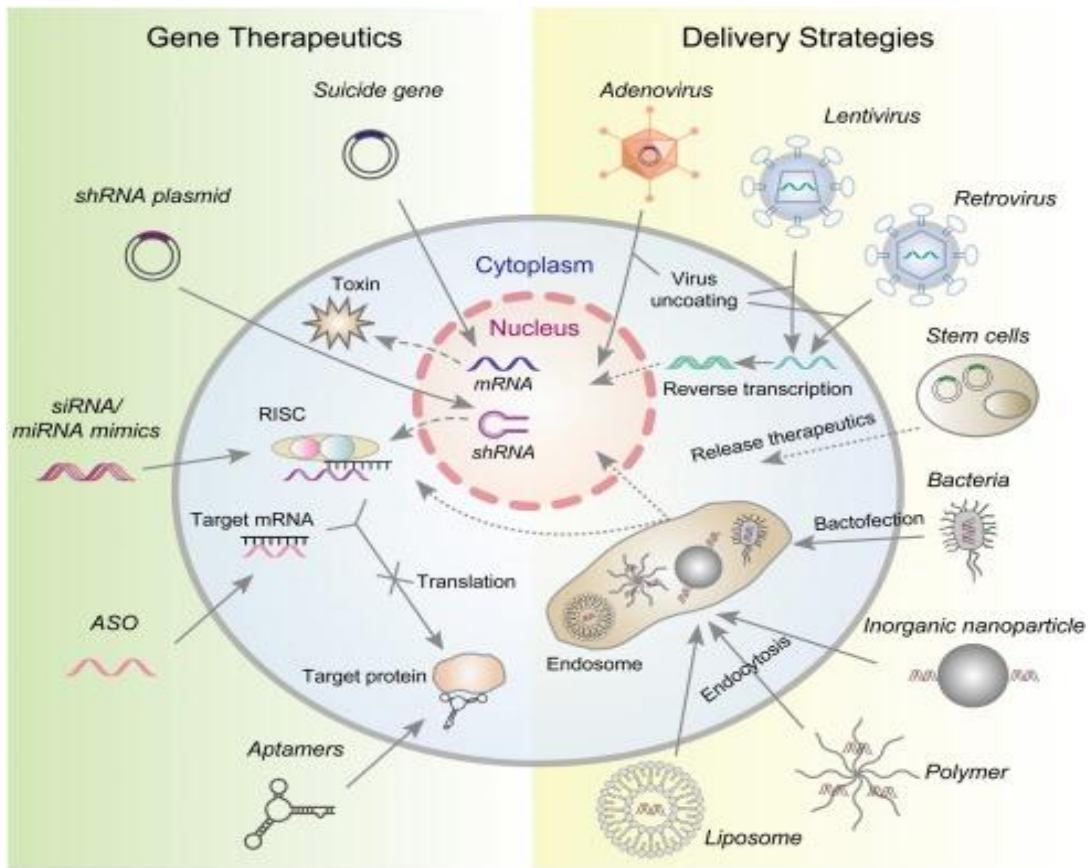


Figure 11 : Représentation schématique des principaux types de thérapies géniques et de stratégies d'administration pour la thérapie génique du cancer. Le gène de suicide est délivré dans les cellules tumorales sous forme d'ADN plasmide, qui exprime des enzymes de conversion de pro-médicament ou des protéines toxiques par voie intracellulaire. Les produits d'assemblage d'ARNi peuvent être introduits dans les cellules tumorales sous forme d'ADN plasmide codant pour un ARN en épingle à cheveux court (ARNsh), de petits ARN interférents (ARNsi), de mimétiques de micro-ARN (miARN) ou d'oligonucléotide antisens (ASO), qui peuvent ensuite être traités par des endonucléases hôtes, ou incorporer directement dans un complexe de silençage induit par l'ARN (RISC), ou s'hybrider avec l'ARNm complémentaire pour initier la suppression du gène. Les aptamères peuvent se lier directement aux protéines cibles pour moduler la signalisation en aval. Les thérapies géniques peuvent être induites dans des cellules tumorales à l'aide de vecteurs viraux. L'adénovirus est capable de convertir son ADN en un noyau, qui est ensuite utilisé pour le traitement du cancer. Les lentivirus et les rétrovirus peuvent s'intégrer de manière stable dans le génome de l'hôte des cellules tumorales après transcription inverse du génome viral. Les cellules souches génétiquement modifiées peuvent libérer localement leur charge thérapeutique à la suite de leur migration vers le microenvironnement tumoral et de leur incorporation. D'autres vecteurs de libération non viraux, comprenant des bactéries et des nano-constructions (nanoparticules inorganiques, polymères et liposomes) chargés d'acides nucléiques, peuvent pénétrer dans les cellules tumorales et libérer des agents thérapeutiques par endocytose [92].

1.4.11. Autres traitements récents

Le développement de systèmes d'administration de médicaments à base de nanopolymères est un autre type de traitement du cancer. Les produits à base de liposomes et de lipides sont devenus des systèmes d'administration de médicaments à libération prolongée. Marqibo (Talon) avec le nom générique sulfate de vincristine est utilisé pour le traitement des patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë; Myocet (Cephalon), une forme de doxorubicine encapsulée dans un liposome, est utilisé pour le traitement du cancer du sein. Ce sont deux exemples des nombreux médicaments approuvés par le FDA dans cette catégorie [93, 94]. De plus, des méthodes de traitement comprenant des combinaisons de modèles thérapeutiques déjà utilisés ont été étudiées [56].

1.4.12. La phytothérapie

Consiste à utiliser des produits végétaux pour le traitement des maladies humaines, et qui sont parfois toxiques selon le dosage. La phytothérapie tire parti de tous les éléments des plantes, les racines et les rhizomes, recueillis pendant la période de dormance, avant la reprise de la végétation ; l'écorce des troncs et des branches, prélevée sur des arbres ou des arbustes ; feuilles et tiges ramassées, comme les fleurs, au moment de la floraison. Les fruits et les baies sont récoltés à maturité. On peut également recueillir des substances (gomme, résines...) sur des végétaux en place. On compte environ 2 000 plantes utilisées en herboristerie. La médecine par les plantes est l'une des plus vieilles médecines du monde.

1.5. Activités pharmacologiques des plantes

1.5.1. Plantes médicinales anticancéreuses

Les plantes et leurs composés bioactifs sont dans les pratiques médicinales depuis les temps anciens. Plusieurs espèces de plantes médicinales et leurs composés phytochimiques inhibent la progression et le développement du cancer [95, 96]. Les plantes ont été toujours utilisées pour leur vertus pharmacologiques telles que les activités antibactériennes, activités antiparasitaires, antifongiques [97] ou encore les activités antivirales [98]. Il existe un certain nombre de plantes qui sont utilisées par les patients cancéreux en médecine

alternative ou complémentaire dans un but préventif ou curatif. Les plus importantes sont l'astragale, le ginseng, le gui, le thé vert et l'ail [99]. Les plantes dont les constituants ont révélé des propriétés antitumorales sont nombreuses et très diversifiées dont voici quelques exemples.

1.5.1.1. *Berbérine* [96]

La berbérine est un puissant composé anticancéreux en termes d'efficacité et d'essais cliniques isolé de la racine et du rhizome de *Tinospora cordifolia*, *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium* et *Rhizoma coptidis* [100]. La berbérine a été utilisée pour traiter divers types de cancers, à savoir : cancer du sein, de la prostate et colorectal [101]. La berbérine induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 / M dans les cancers du sein, colorectal et du foie. Elle inhibe les protéines anti-apoptotiques c-IAP1 et Bcl-2 et active les protéines pro-apoptotiques (p21, p53, caspase-3 et caspase-9) [102].

1.5.1.2. *Le gui*

Le gui est une plante parasite appartenant à la famille des Loranthacées. Le gui blanc européen pousse sur différentes espèces d'arbres, les pommiers, les peupliers et, très exceptionnellement, les chênes. Le gui blanc a reçu le nom botanique de *Viscum album*, le gui d'Amérique celui de *Phoradendron flavescens*, et le gui nain celui d'*Arceuthobium pusillum*. Le gui est l'une des plantes les plus utilisées en thérapie anticancéreuse alternative en Europe. De récentes études ont confirmé qu'il induit l'apoptose, stimule le système immunitaire et protège l'ADN des cellules saines contre la chimiothérapie et les radiations. L'activité cytotoxique est attribuée à des glycoprotéines de 50 à 60 kDa appelées léctines et aux viscotoxines, groupe de polypéptides basiques de 5 kDa. La cytotoxicité ainsi que la composition chimique de l'extrait du gui dépendent du processus de fabrication, de l'arbre hôte et de la période de récolte [103].

L'extrait aqueux de la plante entière présente un effet anticancéreux aussi bien par voie locale que par voie systémique. En effet, en plus de son effet immunostimulant, il inhibe l'incorporation d'acides aminés marqués au ³H dans plusieurs lignées cellulaires, la croissance des tumeurs ainsi que les métastases pulmonaires [22].

1.5.1.3. La Nigelle

N. sativa (famille : renonculacées) est une plante médicinale appelée communément sous différents noms, tels que graine noire, cumin noir et graine de la bénédiction (Habatul-barakah en arabe) [104]. *N. sativa* pousse principalement dans les régions asiatiques telles que le Moyen-Orient, l'Europe méridionale et le nord de l'Afrique. Ses fleurs bleues solitaires sont sur de longs pédoncules. Lorsque la capsule du fruit se forme, elle se compose de nombreuses graines blanches qui deviennent noires lorsque le fruit est mûr et ouvert, exposant les graines noires à l'air [105,106].

La plante *N. sativa* a été traditionnellement utilisée comme tonique pour prévenir les maladies et promouvoir la santé. *N. sativa* et ses composés actifs possèdent également des activités antitumorales. Pendant de nombreuses années, des extraits de graines de *N. sativa*, *Smilax glabra* (rhizome) et *Hemidesmus indicus* (racine), ont été utilisés pour le traitement du cancer au Sri Lanka [107].

L'effet anticancéreux de graines de *N. sativa*, d'extraits de *Smilax glabra* (rhizome) et d'*Hemidesmus indicus* (racine) a pu être observé et a indiqué que les effets inhibiteurs les plus importants sur la synthèse de l'ADN ont été observés avec l'extrait de plante de *N. sativa* ($88 \pm 3,8\%$) et cela même à de faibles concentrations (5 mg / mL) [108]. Plus récemment, Shafi et al. ont observé que des extraits méthanoliques, de n-hexane et de chloroforme de *N. sativa* étaient capables de tuer des cellules de carcinome cervical humain (HeLa) et que les valeurs de la CI_{50} étaient de 2,28 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 2,20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ et 0,41 ng / mL, respectivement. Dans cette étude, l'apparition de l'apoptose dans les cellules HeLa a été corroborée par l'utilisation de test de fragmentation de l'ADN, des analyses par Western blot et des tests de marquage par dUTP-digoxigenin-end (TUNEL) induits par la transférase terminale. Sur la base de leurs observations, les auteurs ont conclu que les extraits régulaient l'expression des gènes pro- et anti-apoptotiques, indiquant que *N. sativa* serait une plante médicinale thérapeutique pouvant être utilisée dans le traitement du cancer du col utérin [109].

1.5.2. Plantes à effet préventif

Une des stratégies la plus prometteuse, aujourd'hui, pour la prévention du cancer est l'utilisation de la chimioprévention basée sur l'utilisation des substances extraites de

plantes. Il a été rapporté que le risque de développer un cancer diminue avec l'augmentation de la consommation des fruits et des végétaux [110]. Les plantes dont l'étude a montré un effet préventif contre différents types de cancer sont nombreuses, en voici quelques exemples :

1.5.2.1 Le thé vert

Le thé vert est constitué par les feuilles séchées du théier (*Camelia thea link*) qui est un arbuste de la famille des théacées. Il est originaire de Chine et du Japon. Au Maroc, il est cultivé dans la région de Larache. Le thé étant la boisson la plus consommée au monde, avec 3 362 000 tonnes de thé noir et 884 000 tonnes de production de thé vert en 2006 [111]. Les effets sur la santé du thé et des extraits de thé ont suscité un intérêt considérable. Le thé prévient le cancer par ses propriétés antimutagènes et antioxydantes de ses composants. Parmi ces derniers, l'epigallocatechine gallate (EGCG) est le plus important. Comparé à plusieurs antioxydants (comme le resveratrol, selenium, curcumin, vitamines C et E, N-acétyl-L-cystéine, etc.), l'EGCG présente l'effet protecteur de l'ADN contre les cassures et contre l'effet mutagène du peroxyde d'hydrogène. L'EGCG peut aussi agir en association avec d'autres médicaments à effet préventif. En effet, il possède une activité préventive, synergique avec le sulindac et additive avec le tamoxifène [112,113]. Le thé vert prévient contre différents types de cancers : tels que le cancer du poumon [114, 116], le cancer du sein [117, 118], le cancer du côlon [119], le cancer de la prostate [120, 123] et le cancer gastrique [124, 125].

1.5.2.2 Le safran (Crocetin)

Crocus sativus L. communément appelé Safran, est une plante herbacée de la famille des Iridacées. Originaire de l'orient, il est cultivé au Maroc dans la région de Taroudant. Riche en composés anticancéreux puissants, caroténoïdes, crocine, crocétine et safranal [126]. Le safran est considéré comme un agent prometteur contre les cancers du poumon, du foie, de la peau, du pancréas, du côlon, du cancer colorectal et du sein en régulant différents facteurs nucléaires et cellulaires. En effet il inhibe les enzymes iNOS, COX-2, réduit le taux sérique de la cycline B, cyclineA et cdk2, régule positivement le rapport Bax / Bcl-2, régule l'expression des caspases-3, 8 et 9, régule négativement l'expression de

MMP-2, MMP-9, induit l'apoptose, cible les microtubules et inhibe l'invasion des métastases [96, 127, 128].

1.5.2.3. La curcumine

La curcumine (diferuloylméthane) est l'agent de chimioprévention le plus étudié. Cette poudre de curcuma jaune-orange est un polyphénol qui s'accumule dans le rhizome de *Curcuma longa*. En raison de ses capacités à réguler d'importants facteurs de transcription, cytokines, protéines kinases, molécules d'adhésion et statut redox, la curcumine peut servir d'agent anti-inflammatoire, anti-oxydant, anti-prolifératif, anti-angiogénique et antinéoplasique. Ainsi, il a été utilisé pour traiter de nombreuses affections telles que les maladies neurodégénératives, maladies cardiovasculaires, diabète, allergies, asthme et bronchite, maladies intestinales inflammatoires, polyarthrite rhumatoïde, ischémie rénale, psoriasis, sclérodermie, immunodéficience acquise (SIDA), cancer et comme agent anti-vieillessement [129-133, 157].

La liste des plantes à effet anticancéreux est loin d'être exhaustive, mais nous nous contenteront de ce qu'on a mentionné ci-dessus

1.5.3. Médicaments anticancéreux dérivés de plantes et d'autres sources naturelles.

Il existe un certain nombre de plantes qui sont utilisées par les patients cancéreux en médecine alternative ou complémentaire dans un but préventif ou curatif. Les plus importantes sont l'astragale, le ginseng, le gui, le thé vert et l'ail [99].

Une analyse du nombre des agents chimio thérapeutiques et de leur source indique que plus de 60% sont dérivés de produits d'origine naturelle [134]. Au cours des dernières années, les progrès dans le domaine de l'exploration des profondeurs de la mer et des technologies de l'aquaculture ont conduit à la découverte d'un nombre important de produits dérivés d'organismes marins qui ont fait l'objet d'évaluations précliniques et cliniques comme agents anticancéreux potentiels (Tableau IV) [135]

Tableau IV : Médicaments dérivés de plantes, de microorganismes ou d'organismes marins [32]

Médicament	Utilisation	Mécanisme d'action	Source
Aspirine	Analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique	Inhibition de la cyclo-oxygénase	Plante
Atropine	Dilatateur de la pupille	Anti-cholinergique au niveau Des récepteurs muscariniques	Plante
Caféine	Stimulant	Antagoniste des récepteurs adénosine	Plante
Codeine	Analgésique, anti-tussif	Antagoniste des récepteurs opoïde	Plante
Digoxine	Cardiotonique	Inhibition de la pompe membranaire N^+/K^+ ATPase	Plante
Eugénol	Mal de dents	Réduction de l'excitabilité des nerfs sensoriels	Plante
Morphine	Analgésique	Antagoniste des récepteurs opoïde	Plante
Pilocarpine	Glaucome	Antagoniste des récepteurs muscariniques	Plante
Quinine	Prophylaxie de la malaria	Inhibition de la synthèse protéique du parasite	Plante
Taxol	Anticancéreux	Antimitotique (se lie aux microtubules)	Plante
Penicilline	Antibiotique	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Microbe
Tétracycline	Antibiotique	Inhibition de la synthèse protéique	Microbe
Cyclosporine	immunosuppresseur	Inhibition de la prolifération des lymphocytes T	Microbe
Aurantosides	Antifongique	Inhibition de la polymérisation de la tubuline	Marin
Spongistatine	antifongique	Inhibition de la polymérisation de la tubuline	Marin

1.6. L'apoptose : nouvelle cible pour la thérapie anticancéreuse

L'apoptose est le processus de mort cellulaire programmée (PCD). La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans le fonctionnement du processus de la mort cellulaire qui se produit dans différentes cellules du corps humain serait d'un atout considérable. Elle affecte généralement les cellules individuelles dispersées plutôt que toutes les cellules d'une zone donnée. Une fois initiée, elle survient rapidement. Par conséquent, l'apoptose est un phénomène régulé par un gène qui provoque des modifications cellulaires telles que l'altération de la morphologie de la cellule, le retrait cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN chromosomique et la désintégration globale de l'ARNm [136, 137]. L'apoptose joue un rôle important dans de nombreuses maladies et troubles neurodégénératifs et auto-immuns, ainsi que dans les cancers et le sida [138-140]. L'apoptose est également induite par différents stimuli nuisibles tels que l'hypoxie, les radiations, les espèces réactives de l'oxygène, la chaleur et les anticancéreux cytotoxiques [138].

1.6.1. L'apoptose et approche thérapeutique

Les modifications biochimiques des cellules apoptotiques sont très étendues et comprennent le clivage des protéines, la reconnaissance phagocytaire, la réticulation des protéines et la fragmentation de l'ADN [141]. Les caspases (protéases cystéine-aspartiques ou dirigées par l'aspartate dépendantes de cystéine) constituent une famille de protéases de cystéine qui jouent un rôle important en tant que catalyseurs des réactions hydrolytiques centrales de l'apoptose, de la nécrose et de l'inflammation [142-144]. Au moins 12 de ces enzymes sont connues. Les caspases sont largement exprimées sous forme de proenzyme inactive dans la plupart des cellules et peuvent souvent activer d'autres procaspases, permettant ainsi l'initiation d'une cascade de protéases [145, 146]. Les voies mitochondriales (intrinsèques) et les récepteurs de la mort (extrinsèques) sont deux voies apoptotiques majeures identifiées [147]. Ces voies sont en contact et partagent une phase finale générale d'apoptose qui démantèle les substrats essentiels à la maintenance cellulaire [148]. La figure 12 montre les voies apoptotiques et les médiateurs importants dans le processus d'apoptose.

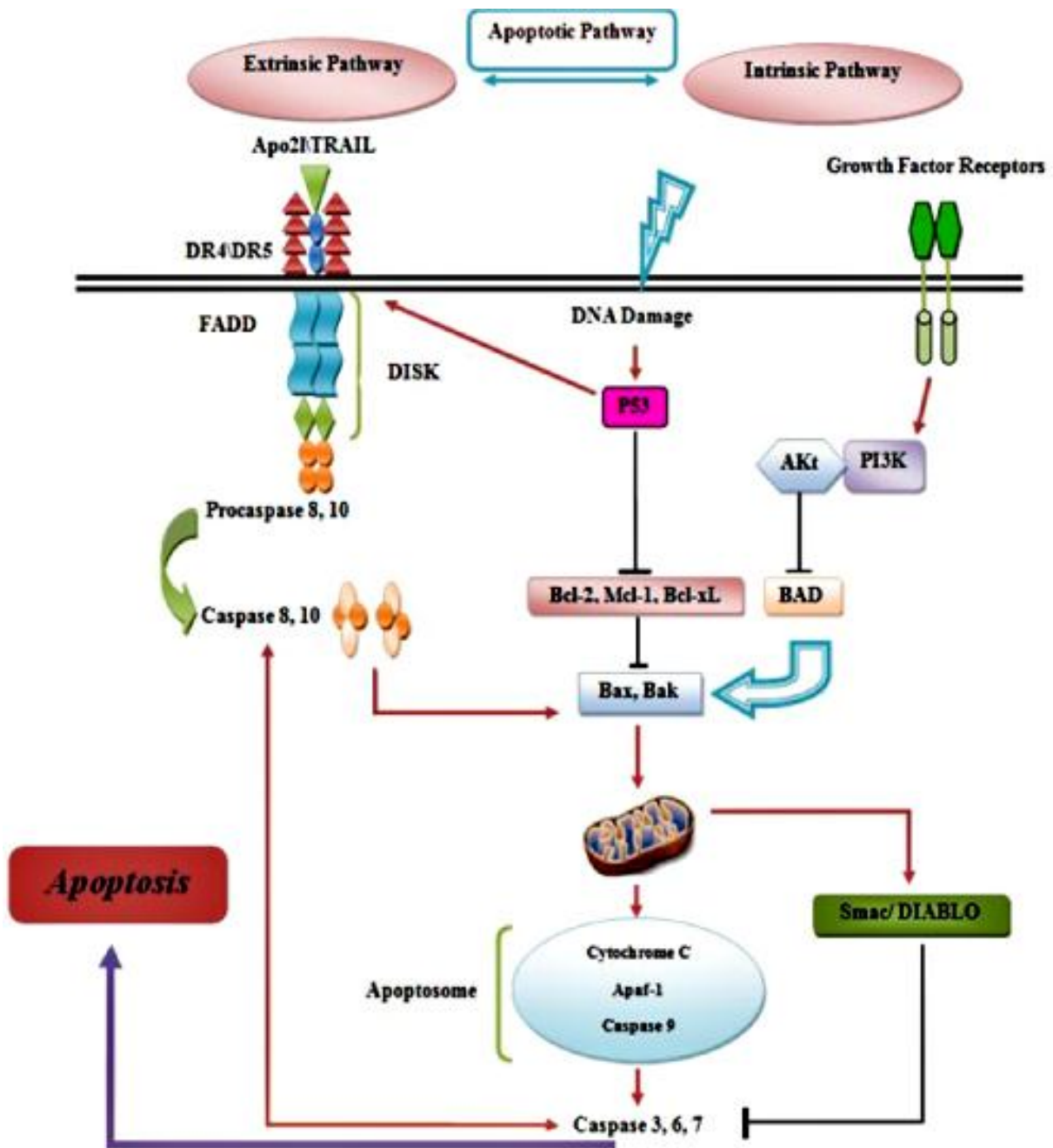


Figure 12 : Schéma synthétique des voies apoptotiques proposées

1.6.1.1. Voie Apoptotique (extrinsèque)

Les récepteurs de la mort cellulaire (récepteurs transmembranaires – interactions médiées) qui font partie de la famille des gènes du récepteur du facteur de nécrose

tumorale (TNF) jouent le rôle principal dans les voies de signalisation extrinsèques de l'apoptose. Les signaux de mort provenant de la surface de la cellule sont envoyés dans l'espace intracellulaire avec ces récepteurs qui possèdent des domaines extracellulaires riches en cystéine et des domaines cytoplasmiques de 80 acides aminés. Dans cette voie, des ligands trimériques, tels que TNF α , FasL, Apo3L, Apo2L et Apo2L se lient à des récepteurs en grappe, après quoi des protéines adaptatrices cytoplasmiques sont recrutées pour présenter des domaines de mort correspondants. Cette association entre protéines du domaine de mort (FADD) et du récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1 complexé aux protéines adaptatrices est la conséquence de la liaison du FasL au récepteur Fas et du ligand du TNF au récepteur du TNF, respectivement [149, 150]. Une combinaison de FADD et de procaspase-8 dans cette voie entraîne la formation du complexe de signalisation induisant la mort (DISC) et tend à activer la caspase-8, à la suite de laquelle la phase d'exécution de l'apoptose est déclenchée [151]. Un autre ligand important pour l'activation de la voie extrinsèque est le ligand induisant l'apoptose liée au TNF (TRAIL), y compris le TNF- α et le FasL, dont les activations conduisent à une interférence de la mort cellulaire apoptotique via TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) dans une large gamme de cellules malignes en culture [152].

1.6.1.2. Voie Apoptotique (Intrinsèque) Mitochondriale

La voie intrinsèque débute avec des stimuli positifs ou négatifs, et tout stimulus qui ne provoque pas la suppression des programmes de mort, y compris l'absence de certains facteurs de croissance (cytokines et les hormones), est classé comme un signal négatif. Les radiations, l'hypoxie, les toxines, l'hyperthermie, etc., susceptibles de déclencher l'apoptose sont un sous-ensemble des stimuli positifs [138]. Les modifications de la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) entraînent la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial. Les protéines pro-apoptotiques, telles que le cytochrome C, Smac / DIABLO et la sérine protéase (en tant que premier groupe) et HtrA2 / Omi AIF, l'endonucléase G et la Dnase activée par la caspase (CAD) (en tant que second groupe), sont extraites de l'espace intermembranaire de la mitochondrie [153]. Le premier groupe active la voie mitochondriale dépendante de la caspase. Dans cette collection, le cytochrome C se lie et active Apaf-1, ainsi que la procaspase-9, formant une «apoptosome»

et Smac / DIABLO, et HtrA2 / Omi favorise l'apoptose en inhibant l'activité de l'IAP (inhibiteur de la protéine de l'apoptose) [154]. L'activation de la caspase 9 est la principale conséquence de la libération de protéines pro-apoptotiques [155].

Le deuxième groupe de protéines pro-apoptotiques est libéré par les mitochondries lors de l'apoptose. L'AIF et l'endonucléase G sont des protéines indépendantes de la caspase qui passent (se transfèrent) dans le noyau et provoquent la fragmentation de l'ADN. La condensation nucléaire dans cet état, appelée condensation de «stade I», et les protéines dépendantes de la caspase qui sont clivées par la caspase-3 produisent une condensation de la chromatine avancée, appelée condensation de «stade II» [138, 156].

Références

- [1]. MOREAU D. Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Université de Nantes Faculté de Pharmacie, **2006**.
- [2] IoanBaba A. and Cornel C. “Comparative Oncology”, the Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest. **2007**.
- [19] Ames B N, M K Shigenaga, and L S Gold. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division : three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environmental health perspectives* **1993**; 101 Suppl.
- [20] Magnol JP, Achache S. Cancerologie vétérinaire et comparée. Maloine Editeur; Paris: **1983**.
- [21] M. Shields Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, United States, Chemotherapeutics, Chapitre 14, **2017**
- [22] Holland J. F. “cancer medicine”, **2003**, 6th edition, Hamilton (CANADA)
- [23] Isabella dos Santos Guimarães, Renata Dalmaschio Daltoé*, Alice Laschuk Herlinger, Klesia Pirola Madeira, Taciane Ladislau, Iuri Cordeiro Valadão, Paulo Cilas Morais Lyra Junior, Sarah Fernandes Teixeira, Gustavo Modesto Amorim, Diandra Zipinotti dos Santos, Karina Rangel Demuth and Leticia Batista Azevedo Rangel. *Conventional Cancer Treatment*. May **2013**.
- [24] Gilman A & Phillips FS. The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. *Science* **1946**; 103(2675): 409-436.
- [25] Haskell C M. Cancer Treatment. Philadelphia: Saunders; **1990**.
- [26] Penel N, Van Glabbeke M, Marreaud S, Ouali M, Blay JY, Hohenberger P. Testing new regimens in patients with advanced soft tissue sarcoma: analysis of publications from the last 10 years. *Annals of Oncology* **2011**; 22: 1266-1272.
- [27] Voss MH, Feldman DR, Bosl GJ, Motzer RJ. A review of second-line chemotherapy and prognostic models for disseminated germ cell tumors. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **2011**; 25: 557-576.
- [28] Siddik ZH. Mechanism of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. In The cancer handbook. Edited by Alison M R. New Jersey: John Wiley & Sons **2002**.
- [29] Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **1965**; 205: 698-699.

- [30] Desoize B. Metals and metal compounds in cancer treatment. *Anticancer Research* **2004**; 24(3a): 1529-1544.
- [31] Boulikas T, Pantos A, Bellis E, Christofis P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy* **2007**; 5: 537-583.
- [32] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat.Rev.Cancer*. 2007; 7:573–
- [33] Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev.Oncol.Hematol*. **2002**; 42:317–325.
- [34] Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs*. **1993**; 46:360–377.
- [35] Zhao R& Goldman ID. Resistance to antifolates. *Oncogene* **2003**; 22(47): 7431-7457.
- [36] Chauvergne J. et Hoerni B. “Chimiothérapie anticancéreuse”, **2001**, 4e édition, MASSON, Paris
- [37] Brunton LL, Chabner BA & Knollmann BC. Goodman & Gilman’s. The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill Companies **2011**.
- [38] Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *The Journal of Clinical Investigation* **1985**; 76(3): 907-912.
- [39] Cho RC, Cole PD, Sohn KJ, Gaisano G, Croxford R, Kamen BA, Kim YI. Effects of folate and folylpolyglutamyl synthase modulation on chemosensitivity of breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapy* **2007**; 6(11): 2909-2920.
- [40] Fabre I, Fabre G, Goldman ID. Polyglutamylation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. *Cancer Research*. **1984**; 44(8): 3190-3195.
- [41] Holmboe L, Andersen AM, Mørkrid L, Slørdal L, Hall KS. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2012**; 73(1): 106-114.
- [42] Salliot C& Van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2009**; 68(7): 1100-1104.
- [43] Buqué A, Muhialdin JS, Muñoz A, Calvo B, Carrera S, Aresti U, Sancho A, Rubio I, López-Vivanco G. Molecular mechanism implicated in Pemetrexed induced apoptosis in human melanoma cells. *Molecular Cancer* **2012**; 11(1): 25.
- [44] Husson M. C., Becker A."Médicaments anticancéreux: de la préparation à l'administration. Optimisation", **1995**, Ed : Lavoisier, p : 1518.

- [45] Liekens S Annelies Bronckaers, Jan Balzarini. Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasma-encoded catabolic enzymes *The lancet oncology* **2009**; 10: 628–35.
- [46] Loichot C. "Les anticancéreux cytotoxiques" Faculté de Médecine de Strasbourg, www.ulpmmed.u-strasbg.fr **2017**.
- [47] Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2002**; 2(3):188-200.
- [48] Gottlieb AJ, Weinberg V, Ellison RR, Henderson ES, Terebelo H, Rafla S, et al. Efficacy of daunorubicin in the therapy of adult acute lymphocytic leukemia: a prospective randomized trial by cancer and leukemia group B. *Blood* **1984**; 64(1):267-74.
- [49] Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* **2011**; 4(6):687_99.
- [50] D'Angio GJ, Evans A, Breslow N, Beckwith B, Bishop H, Farewell V, et al. The treatment of Wilms' tumor: results of the Second National Wilms' Tumor Study. *Cancer* **1981**; 47(9):2302-11.
- [51] Masetti R& Pession A. First-line treatment of acute lymphoblastic leukemia with pegasparginase. *Biologics* **2009**; 3: 359-368.
- [52] Avramis VI. Asparaginases: A Successful Class of Drugs Against Leukemias and Lymphomas. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **2011**; 33: 573-579.
- [53] Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: pegasparginase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *The Oncologist* **2007**; 12(8): 991-998.
- [54] Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster SM, Kilberg MS. Amino acid control of ornithine decarboxylase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *The American Journal of Physiology* **1997**; 272(5): 1691-1699.
- [55] Albertsen BK, Schroder H, Jakobsen P, et al. Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with Erwinia asparaginase. *Medical and Pediatric Oncology* **2002**; 38: 310–316.
- [56] M Toloudi¹, P Apostolou¹, M Chatziioannou¹, E Kourtidou¹, I Vlachou¹, G Mimikakou¹, A Chlichlia² and I Papatotiriou¹, Recent Developments in Cancer Treatment, *Pharmaceut Reg Affairs* **2014**, 10.4172/2167-7689.S1-001
- [57] Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2009**; 9: 28-39.
- [58] Polier S, Samant RS, Clarke PA, Workman P, Prodromou C, et al. ATPcompetitive inhibitors block protein kinase recruitment to the Hsp90-Cdc37 system. *Nat Chem Biol.* 2013; 9: 307-312.

- [59] Vaughan CK, Mollapour M, Smith JR, Truman A, Hu B, et al. Hsp90- dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol Cell* **2008**; 31: 886-895.
- [60] Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **2003**; 9: 6316-6325.
- [61] Voorhees PM, Orlowski RZ. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2006**; 46: 189-213.
- [62] Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma : 10 years later. *Blood* **2012**, 120 : 947-959.
- [63] Krystof V, Uldrijan S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* **2010**; 11: 291-302.
- [64] Cicenias J, Valius M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* **2011**; 137: 1409-1418.
- [65] Widakowich C, de Castro G, Jr, de Azambuja E, Dinh P, Awada A. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist* **2007**; 12:1443-1455.
- [66] Silacci M, Brack SS, Spath N, Buck A, Hillinger S, et al. Human monoclonal antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors in vivo. *Protein Eng Des Sel* **2003**; 19: 471-478.
- [67] Murakami H, Doi T, Yamamoto N, Watanabe J, Boku N, et al. Phase I study of ganitumab (AMG 479), a fully human monoclonal antibody against the insulin-like growth factor receptor type I (IGF1R), in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2012**; 70: 407-414.
- [68] Jain P, O'Brien S (2013) Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Biol Ther* **13**: 169-182.
- [69] Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* **2013**; 122: 3482-3491.
- [70] Bhutani D, Vaishampayan UN. Monoclonal antibodies in oncology therapeutics: present and future indications. *Expert Opin Biol Ther.* **2013**; 13: 269-282.
- [71] Park NJ, Wang X, Diaz A, Goos-Root DM, Bock C, et al. Measurement of cetuximab and panitumumab-unbound serum EGFR extracellular domain using an assay based on slow off-rate modified aptamer (SOMAmer) reagents. *PloS One* **8**. **2013**.
- [72] Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* **2013**; 34: 8690-8707.
- [73] Karpas A, Dremucheva A, Czepulkowski BH A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98: 1799-1804.

- [74] Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.* 2012; 12: 14.
- [75] Veomett N, Dao T, Scheinberg DA. Therapeutic antibodies to intracellular targets in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* **2013**; 13:1485-1488.
- [76] Ducry L, Stump B (2010) Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem* **2010**; 21: 5-13.
- [77] Antibody-drug conjugate may inhibit pancreatic cancer. *Cancer Discov* **2013**.
- [78] Teicher BA, Chari RV. Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin Cancer Res.* **2011**; 17: 6389-6397.
- [79] Sadeghi S, Hurvitz S, Olevsky O. Profiling and targeting HER2-positive breast cancer using trastuzumab emtansine. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* **2014**; 7: 329-338.
- [80] Janeway CA Jr, Bottomly K (1994) Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell.* **1994**; 76: 275-285.
- [81] Grohmann U, Fioretti MC, Bianchi R, Belladonna ML, Ayroldi E, et al. Dendritic cells, interleukin 12, and CD4+ lymphocytes in the initiation of class I-restricted reactivity to a tumor/self peptide. *Crit Rev Immunol.* **1998**; 18: 87-98.
- [82] Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 635-673.
- [83] Harrop R. Cancer vaccines: identification of biomarkers predictive of clinical efficacy. *Hum Vaccin Immunother.* **2013**; 9: 800-804.
- [84] Fiorito C, Gontero P. Adverse events after intravesical therapy: are we always ready to recognize and prevent them? *Urologia* **2013**; 21: 27-32.
- [85] Zhang Z, Chen X, Chang X, Ye X, Li Y, et al. Vaccination with embryonic stem cells generates effective antitumor immunity against ovarian cancer. *Int J Mol Med* **2013**; 31: 147-153.
- [86] Lokhov PG, Balashova EE. Cellular cancer vaccines: an update on the development of vaccines generated from cell surface antigens. *J Cancer* **2010**; 1:230-241.
- [87] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **2004**; 303: 1818-1822.
- [88] Chatterjee, D.K.; Fong, L.S.; Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1627-1637.
- [89] Fayter, D.; Corbett, M.; Heirs, M.; Fox, D.; Eastwood, A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technol. Assess.* **2010**; 14, 1-288.

- [90] Arruebo M, Vilaboa N , Gutierrez BS, Lambea J , Tres A , Valladares M and Fernández ÁG. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* **2011**, 3, 3279-3330.
- [91] Midol AS, Bardon S, Broudin G. Des traitements de thérapie génique pour les maladies rares. **2012**
- [92] Kui Wanga, Forrest M. Kievit b, Miqin Zhang Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacological Research* **2016**; 114, 56–66.
- [93] Medina OP, Zhu Y, Kairemo K. Targeted liposomal drug delivery in cancer. *Curr Pharm Des.* **2004**; 10: 2981-2989.
- [94] Wang Y, Minko T. A novel cancer therapy: combined liposomal hypoxia inducible factor 1 alpha antisense oligonucleotides and an anticancer drug. *Biochem Pharmacol.* **2004**; 68: 2031-2042.
- [95] Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *Int J Mol Sci.* **2017**; 18(3): 656.
- [96] Javed I, Banzeer AA, Tariq M, Sobia K, Barkat A, Sayed Afzal SA, Talha K. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pac J Trop Biomed* **2017**; 7(12): 1129-1150.
- [97] Lunz R., Burri C., Menzinger M., Kaminsky R, **1994**, vol. 74, no1, pp. 51-59 Goemaere, Bruxelles, BELGIQUE (1972-1995) (Revue).
- [98] Poyet Jean-Lu ; Hoeveler A. Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat. Note(s) : 171 p. **1996**, No 96 BESA 2025.
- [99] Smith, M., Boon, H.S. counseling cancer patients about herbal medicine. *Patient Educ. Couns.* **1999**; 38 (2), 247-67.
- [100] Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3- dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* **2006**; 5: 296-308.
- [101] Barzegar E, Fouladdel SH, Movahhed TK, Atashpour SH, Ghahremani HM, Ostad SN, et al. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. *Iran J Basic Med Sci* **2015**; 18: 334-42.
- [102] Xu H, Zhang S. Scutellarin induced apoptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells via a STAT3 pathway. *Phytother Res* **2013**; 27(10): 1524-8.
- [103] Bussing A. and Schietzel M. Apoptosis-inducing Properties of viscum album L.Extracts from different Host Trees, correlate with their content of toxic Mistletoe Lectins. *Anticancer Research.* **1999**, 19:23-28.
- [104] Halawani E. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Adv Biol Res.* **2009**; 3(5-6):148-52.
- [105] Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: a miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* **2013**; 3(5):337-52.

- [106] Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl MN, Sadeghnia HR, Ziaee T. Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine*. **2007**; 14(9):621-7.
- [107] Samarakoon SR, Thabrew I, Galhena PB, De Silva D, Tennekoon KH. A comparison of the cytotoxic potential of standardized aqueous and ethanolic extracts of a polyherbal mixture comprised of *Nigella sativa* (seeds), *Hemidesmus indicus* (roots) and *Smilax glabra* (rhizome). *Pharmacognosy Res*. **2010**; 2(6):335-42.
- [108] Thabrew MI, Mitry RR, Morsy MA, Hughes RD. Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci*. **2005**; 77(12):1319-30.
- [109] Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A, Lei D. Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell Int*. **2009**; 9:29.
- [110] Park EJ, Pezzuto JM. "Botanicals in cancer chemoprevention", *Cancer Metastasis Rev*. **2002**; 21 (3-4):231-55.
- [111] Ho C.T.; Lin, J.K.; Shahidi, F. (Eds.) *Tea and Tea Products; Nutraceutical Science and Technology Series*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2009**; Volume 8.
- [112] Pillai SP, Mitscher LA, Menon SR, Pillai CA, Shankel DM. "Antimutagenic/antioxidant activity of green tea components and related compounds", *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. **1999**; 18(3): 147-58.
- [113] Suganuma M., Ohkura Y., Okabe S., Fujiki H. "combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice" *J Cancer Res Clin Oncol* **2001**; 127: 69-72
- [114] Arts, I.C. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. *J. Nutr.* **2008**; 138, 1561S–1566S.
- [115] Clark, J.; You, M. Chemoprevention of lung cancer by tea. *Mol. Nutr. Food Res*. **2006**; 50, 144–151.
- [116] Fritz, H.; Seely, D.; Kennedy, D.A.; Fernandes, R.; Cooley, K.; Fergusson, D. Green tea and lung cancer: A systematic review. *Integr. Cancer Ther*. **2013**; 12, 7–24.
- [117] Butt, M.S.; Ahmad, R.S.; Sultan, M.T.; Qayyum, M.M.; Naz, A. Green tea and anticancer perspectives: Updates from last decade. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. **2015**, 55, 792–805.
- [118] Wu, A.H.; Butler, L.M. Green tea and breast cancer. *Mol. Nutr. Food Res*. **2011**, 55, 921-930.
- [119] Kumar, N.; Shibata, D.; Helm, J.; Coppola, D.; Malafa, M. Green tea polyphenols in the prevention of colon cancer. *Front. Biosci*. **2007**; 12, 2309–2315.
- [120] Lee, A.H.; Fraser, M.L.; Meng, X.; Binns, C.W. Protective effects of green tea against prostate cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther*. **2006**, 6, 507–513.

- [121] Connors, S.K.; Chornokur, G.; Kumar, N.B. New insights into the mechanisms of green tea catechins in the chemoprevention of prostate cancer. *Nutr. Cancer* **2012**; 64, 4–22.
- [122] Khan, N.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. Review: Green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: Preclinical and clinical studies. *Nutr. Cancer* **2009**, 61, 836–841.
- [123] Siddiqui, I.A.; Adhami, V.M.; Saleem, M.; Mukhtar, H. Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**; 50: 130–143.
- [124] Carlson, J.R.; Bauer, B.A.; Vincent, A.; Limburg, P.J.; Wilson, T. Reading the tea leaves: Anticarcinogenic properties of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Mayo Clin. Proc.* **2007**, 82, 725–732.
- [125] Schulze J, Melzer L, Smith L and Teschke R. Green Tea and Its Extracts in Cancer Prevention and Treatment Beverages **2017** doi:10.3390.
- [126] Pang SQ, Wang GQ, Lin JS, Diao Y, Xu RA. Cytotoxic activity of the alkaloids from *Broussonetia papyrifera* fruits. *Pharm Biol.* **2014**; 52: 1315-9.
- [127] Hoshyar R, Mollaei H. A comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin. *J Pharm Pharmacol* **2017**.
- [128] Patel S, Sarwat M, Khan TH. Mechanism behind the anti-tumour potential of saffron (*Crocus sativus* L.): the molecular perspective. *Crit Rev Oncol/Hematol.* **2017**; 115: 27-35.
- [129] Aggarwal, B. B., Kumar, A., and Bharti, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer. Res.* **2003**; 23, 363–398.
- [130] Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., and Aggarwal, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* **2007**; 4, 807–818.
- [131] Johnson, J. J., and Mukhtar, H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett.* **2007**; 255, 170–181.
- [132] Aggarwal, B. B., and Harikumar, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**; 41, 40–59.
- [133] Thangapazham, R. L., Sharad, S., and Maheshwari, R. K. Skin regenerative potentials of curcumin. *Biofactors* **2013**; 39, 141–149.
- [134] Cragg GM., Newman DJ . “Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources.” *Cancer Invest* **1999**; 17:153-163.
- [135] Schwartsmann G. “Marine organisms and other novel natural sources of new anticancer drugs.” *Ann Oncol* **2000**; 11:235-243.
- [136] Lo AC, Woo TT, Wong RL, Wong D. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. *Ophthalmologica* **2011**; 226:10-7.
- [137] Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet.* **1993**; 341(8855):1251-4.

- [138] Mousavi S H, Tayarani Najaran Z, Hersey P. Apoptosis: from communica pathways to therapeutic tools. *Iranian J Basic Med Sci.* **2008**; 11(3):121-42.
- [139] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **2007**; 35(4):495-516.
- [140] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **1995**; 267(5203):1445-9.
- [141] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **2000**; 407(6805):770-6.
- [142] Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* **1996**; 87(2):171.
- [143] Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* **1997**; 22(8) :299-306.
- [144] Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* **2006**; 6(11):813-22.
- [145] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology.* **1999**; 15(1):269-90.
- [146] Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol.* **2000**; 2(6):318-25.
- [147] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **1998**; 281(5381):1305-8.
- [148] Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* **2002**; 2(4):277- 88.
- [149] Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **2002**; 296(5573):1635-6.
- [150] Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and-independent pathways. *Oncogene* **2001**; 20(17) :2122-33.
- [151] Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **1999**; 274(3):1541-8.
- [152] Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, Altnauer F, Simon HU, Graeve T, et al. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest.* **2000**; 106(1):25- 35.
- [153] Saelens X, Festjens N, Walle LV, Van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **2004**; 23(16):2861-74.
- [154] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **2006**; 13(9):1423-33.

- [155] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2010**; 11(9):621-32.
- [156] Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* **2000**; 192(4):571-80.
- [157] Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**; 9, 767–776.

Chapitre II

**Valorisation des substances naturelles : Source potentielle de
chimiothérapie anticancéreuse**

2. Valorisation des substances naturelles

2.1. Thymus brossonettii : une source potentielle de chimiothérapie anticancéreuse ?

2.2. Carvacrol :

- Structure et synthèse chimique

2.2.1. Origine du Carvacrol

2.2.2. Propriétés pharmacologiques

a/ Effets cytotoxique du carvarol

b/ Effets antibactérien du carvacrol

c/ Effet anti viral

d/ Activité antioxydante et élimination des radicaux libres

e/ Effets anti-cancérigènes et antiplaquettaires

2. Valorisation des substances naturelles: source potentielle de chimiothérapie anticancéreuse

La chimiothérapie curative reste un des moyens le plus utilisé « efficace » pour le traitement des maladies cancéreuses. Cependant, l'apparition des résistances aux médicaments disponibles, constitue une menace pour les maladies cancéreuses pour qui les rechutes sont fréquentes et l'efficacité des traitements est provisoire pour des raisons complexes.

Le cancer est une maladie intrinsèque de la cellule, inhérente à la nature même de sa propre machinerie enzymatique. Contrairement à de nombreuses maladies qui sont dues à un désordre métabolique ou au développement au sein de notre organisme d'un agent venu de l'extérieur (virus, bactéries, parasites), le cancer provient du fait que certaines de nos propres cellules ont perdu la capacité de contrôler leur prolifération consécutive à des causes chimiques, physiques ou biologiques, et ont réussi à contourner les mécanismes de surveillance qui, dans ces circonstances, les conduiraient normalement à la mort. Les cellules cancéreuses, devenues immortelles et insensibles aux signaux venus de l'extérieur, ne cessent de se diviser et finissent par envahir l'organisme entier.

Normalement, les cellules contrôlent finement leur prolifération en fonction d'une multitude de signaux extrinsèques de nature chimique (hormones, cytokines, facteurs de croissance, conditions métaboliques) ou mécanique (contacts entre cellules ainsi qu'avec la matrice extracellulaire) qui assurent le maintien harmonieux de la taille et de la fonction de chaque organe, ainsi que le renouvellement nécessaire de certaines de leurs cellules au cours du temps. Le cancer est une maladie de la transduction de ces signaux, c'est à dire des processus internes par lesquels les cellules mettent en œuvre et coordonnent les effets biologiques qu'induisent ces signaux. Le cancer est également une défaillance des mécanismes de surveillance propres à chaque cellule qui normalement veillent à maîtriser ou à éliminer les cellules affectées dans ces événements de transduction. Chacune de ces déficiences est consécutive à la lésion (mutation ponctuelle, délétion, amplification, translocation...) des gènes qui codent pour les fonctions que nous venons d'évoquer. C'est l'accumulation de défauts dans plusieurs de ces mécanismes de transduction et de surveillance qui permet le développement des cancers, accumulation elle-même favorisée par la défaillance des mécanismes qui surveillent le maintien de l'intégrité du génome ; le cancer est également une maladie de la stabilité génétique.

Durant les deux dernières décennies, d'énormes efforts ont apporté l'espoir d'améliorer le traitement des maladies cancéreuses. De nombreuses alternatives de traitements ont été découvertes incluant des agents cytotoxiques nouveaux et des combinaisons d'agents multiples, des analogues d'hormones, et des agents biologiques. Parmi ces différentes approches thérapeutiques, la chimiothérapie demeure un traitement de choix pour les maladies avancées. Cependant, il est très fréquent que son efficacité soit provisoire et que la maladie réapparaisse après des périodes plus ou moins longues. Les raisons de ces échecs thérapeutiques sont multiples et complexes et peuvent être liées, soit à l'hôte (le médicament est mal toléré, son métabolisme ou sa pharmacocinétique est modifié, etc.), soit à la tumeur et à son micro- environnement. Une tumeur peut être, pour des raisons peu encore élucidées, intrinsèquement résistante aux médicaments (c'est le cas fréquent du cancer du colon et du cancer du poumon à l'exception de celui à petites cellules) ou elle peut développer, au cours du traitement, différents mécanismes de résistance (résistance acquise). Le mécanisme le plus étudié de la résistance acquise est la surexpression de la glycoprotéine membranaire P170. Cette protéine est capable de refouler certains médicaments, en particulier les anthracyclines, du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire [1]. D'autres mécanismes de résistance acquise incluent l'expression d'autres protéines de transports membranaires tels que MRP (*multidrug resistance-associated protein*) [2] et LRP (*Lung resistance-associated protein*) [3], une diminution du métabolisme intracellulaire du médicament ou son désactivation par des enzymes de détoxification, une altération de la cible cellulaire du médicament [4] et une augmentation de la capacité de réparation. Tous ces mécanismes permettent à la cellule tumorale d'échapper aux effets toxiques des médicaments et/ou à la mort cellulaire programmée (apoptose) attribuée à de nombreux agents anticancéreux. Le micro-environnement tumoral peut également jouer un rôle dans la résistance. Ainsi, l'hétérogénéité des cellules tumorales, la création de conditions hypoxiques, la présence ou l'absence d'interactions entre les cellules ou des changements de la micro-vascularisation tumorale peuvent contribuer à la résistance [5-7].

De nombreux médicaments anticancéreux, en particulier les agents alkylants et les analogues du cis-platine, exercent leurs effets cytotoxiques en formant des adduits et des liaisons intra- et intercaténaux au niveau de l'ADN (*DNA crosslinks*). Ces lésions sont capables d'inhiber la transcription, la réplication, et aboutiront à la mort cellulaire. Les cellules possèdent des mécanismes de défense assez élaborés qui sont activés par les agents génotoxiques, y compris les médicaments. En particulier, les cellules peuvent neutraliser les

lésions de l'ADN par des mécanismes de réparation impliquant l'activation et/ou la régulation de nombreuses protéines et facteurs de transcription.

La majorité des principes actifs utilisés en chimiothérapie anticancéreuse ont pour origine les plantes médicinales, citons à titre d'exemple les anthracyclines, l'adriamycine, la vincristine et la vinblastine.

Le développement des molécules actives possédant des structures voisines ne peut que favoriser les résistances, d'où l'intérêt d'exploiter de nouvelles cibles pharmacologiques avec de nouvelles molécules originales avec un mécanisme d'action original. C'est dans cette optique que nous avons lancé un programme de recherche des principes actifs, anticancéreux, à partir de plantes médicinales marocaines.

2.1. *Thymus brossonettii*: une source potentielle de chimiothérapie anticancéreuse

Plus de 200 composés volatiles ont été détectés dans les différentes espèces de thym à travers le monde dont les plus importants sont les phénols monoterpéniques (thymol et Carvacrol), leurs précurseurs les hydrocarbures monoterpéniques (p-cymène et γ -terpinène), les monoterpènes oxygénés (bornéol et linalol), le 1,8-cinéole, le camphre, le géraniol et le β -caryophyllène.

Le Thym a été utilisé dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs siècles en Afrique et en Europe et particulièrement dans le bassin méditerranéen. Cette plante a été utilisée pour la prévention ou le traitement de certaines maladies [8]. Le thymol et le Carvacrol, deux composés majoritaires de l'huile essentielle du thym, ont été considérés comme responsables des activités pharmacologiques du thym, incluant les effets antioxydant [9], antimicrobien [10-12] et antifongique [13,14]. D'autre part, l'extrait a été décrit comme un antimutagène naturel. Cependant, ces activités ne concernent que des espèces fréquentes en Europe. *Thymus Brossenettii* est une espèce endémique du Maroc et il n'y a pas eu suffisamment d'études détaillées sur l'huile essentielle de cette espèce. Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'activité anti tumorale de l'huile essentielle de *Thymus Brossenettii*, activité jusqu'à maintenant jamais décrite dans la littérature. Nous avons ainsi effectué l'extraction et la caractérisation par la technique de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle de cette plante. Nous avons démontré que l'huile essentielle de cette espèce avait une activité cytotoxique contre diverses lignées tumorales

[15]. Les lignées tumorales utilisées sont des lignées animales (BHK, Hep, Véro) ou humaines (OV1/P) ainsi que ses dérivées sélectionnées *in vitro* pour leur résistance à la chimiothérapie, en particulier à l'adriamycine (OV1/ADR), à la vincristine (OV1/VINC) ou au cis-platine (OV1/CP). Ces lignées, OV1/ADR et OV1/VINC, expriment les gènes, MDR1 et P-gp, responsables du processus de résistance, et leur sensibilité à l'effet toxique de l'huile essentielle de *Thymus Brossenettii* suggère que les principes actifs responsables de cet effet cytotoxique ne sont pas refoulés par la P-gp. Cette étude concernait également d'autres lignées cancéreuses du tube digestif humain telle que la lignée HepG2 (adénocarcinome hépatique) et HT-29 (carcinome colorectal). Cette activité anti tumorale observée *in vitro*, a été reproduite dans le modèle murin de souris DBA-2 porteuse de tumeur P815 [15]. Cependant, les mécanismes et les cibles moléculaires impliqués dans l'inhibition ou la régulation de la croissance des cellules tumorales par l'huile essentielle de thym et en particulier le Carvacrol (plus active) restent à déterminer. Ainsi nous ne sommes intéressés aux mécanismes d'action par lesquels le Carvacrol induit la régulation des cellules tumorales P815.

2.2. Carvacrol

2.2.1. Origine du Carvacrol

Le carvacrol est un phénolique monoterpénoïde (2-méthyl-5- (1-méthylethyl) -phénol) synthétisé et concentré dans les huiles essentielles de certaines plantes médicinales, comme le cumin noir (*Nigella sativa*), l'origan (*Origanum compactum*), le monarda didyma, l'origanum dictamnus, l'origanum microphyllum, l'origanum ornites, l'origanum scabrum, l'origanum vulgare, le thym (*Thymus glandulosus*), la sarriette (*Satureja hortensis*) [16-19]. Le carvacrol est également produit par synthèse chimique et biotechnologique *via* des microorganismes [20,21].

- Synthèse chimique du Carvacrol catalysée par UDCaT-5

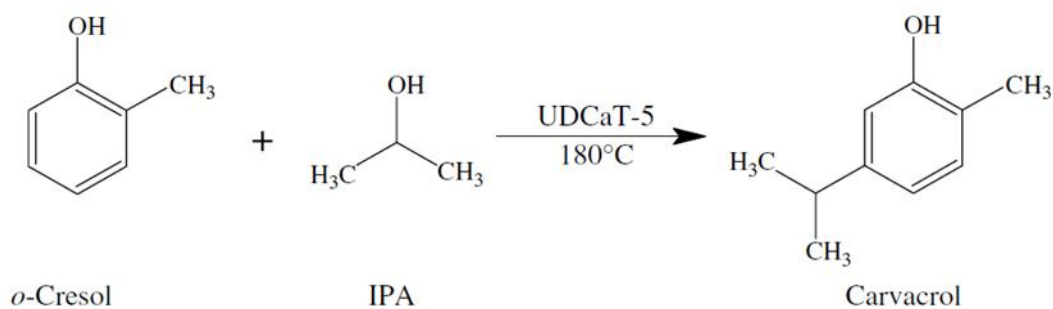


Figure 13 : Synthèse du carvacrol par isopropylation de l'*o*-crésol avec de l'IPA sur l'UDCaT-5

Le carvacrol est un liquide qui a le même goût que thymol. La densité du carvacrol varie de 0,975 à 0,975 à 25 °C, évaporé à -36 ~ - 35 °C. Il est hautement lipophile et très soluble dans le tétrachlorure de carbone, l'éthanol, l'éther diéthylique, l'acétone; mais insoluble dans l'eau [22].

2.2.2. Propriétés pharmacologiques

a/ Effets cytotoxique du carvacrol

Les huiles essentielles, y compris le Carvacrol, deviennent de plus en plus populaires en tant qu'agents bioactifs naturels. Le Carvacrol qui est abondant dans l'huile de thym, d'origan et de piment fort [16] est connu pour posséder diverses vertus médicinales comme antioxydant [23,24], effets antimicrobiens [10-12], antifongique [13,14], analgésique, anti-inflammatoire, antivirale, anti-angiogénique, anti-oxydante, anti -élastase, insecticide et activité antitumorale [25-27]. Il est également utilisé comme agent de saveur dans les productions cosmétiques et alimentaires.

L'effet cytotoxique du Carvacrol contre le cancer a été étudié sur différentes lignées cellulaires comme les cellules cancéreuses pulmonaires (petites cellules) [28], les cellules hépatocellulaires [29], les cellules cancéreuses mammaires métastatiques humaines [30] et les cellules leucémiques myéloïdes chroniques [31]. Nous avons précédemment montré qu'un extrait brut (huile essentielle) de thym et un de ses composants majeurs, le Carvacrol, sont capables de réduire les taux de prolifération *in vitro* des lignées cancéreuses humaines, adénocarcinome ovarien sensible ou résistant à la chimiothérapie [15], MCF7, et la lignée cellulaire de mastocytome murin (P815) [32]. De plus, nous avons également montré que l'huile essentielle de thym ainsi que le Carvacrol inhibent efficacement la croissance tumorale

et retardent la mortalité de modèles de souris DBA2 (H2d) animales portant des tumeurs [15,32].

Des données récentes suggèrent fortement que de nombreux produits naturels inhibent préférentiellement la croissance des cellules tumorales en ciblant une ou plusieurs cascades de signalisation cellulaire conduisant à l'induction de l'apoptose [33]. Puisque le déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose est corrélé avec la progression du cancer, alors l'identification des agents prolifératifs ou chimio-préventifs est d'une grande importance. Très récemment, il a été rapporté que le Carvacrol posséderait un potentiel thérapeutique pour le traitement du cancer de la prostate et cela impliquerait une inhibition des canaux TRPM7 et la suppression des voies de signalisation PI3K / Akt et MAPK [34]. Cependant, dans les cellules cancéreuses leucémiques (cellules HL-60 et Jurkat), le Carvacrol semble induire l'apoptose par voie mitochondriale grâce à l'implication de la caspase-3 [35].

b/ Effets antibactérien du carvacrol

Les effets antimicrobiens des huiles essentielles sont dûs essentiellement à la présence de composés phénoliques, tels que le carvacrol, thymol et eugénol. Les bénéfices (inhibiteur) de ces composés phénoliques pourraient être attribués aux interactions entre ces composés hydrophobes et les membranes cellulaires des micro-organismes [21]. Le Carvacrol possède un spectre d'action antimicrobien large. Ainsi, de nombreuses espèces de microbes tels que *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus* et *Fusarium* sont sensibles au Carvacrol [25, 36,37].

Récemment, une étude de modélisation basée sur la structure du pharmacophore a été utilisée pour identifier de petites molécules inhibitrices de l'enzyme chorismate mutase (CM) issue de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. Le Carvacrol, composé principal, qui a démontré une bonne activité inhibitrice de l'enzyme CM avec un IC₅₀ de 1,06 ± 0,4 µM, n'a pas montré d'activité importante contre la souche bactérienne (CMI = 41,6 µM) (Fig. 14). Tous les dérivés du Carvacrol sélectionnés se sont révélés moins puissants que le carvacrol en tant que composés antituberculeux, à l'exception du thymol qui est aussi puissant que le carvacrol. Par rapport aux antituberculeux de première ligne tels que l'isoniazide (CMI: 0,66 µM), la rifampicine (CMI: 0,23 µM) et l'éthambutol (CMI: 15,31 µM), tous les composés étaient moins actifs. L'absence de traduction du fort pouvoir inhibiteur de l'enzyme en activité

antituberculeuse peut être due à l'incapacité de ces molécules de pénétrer dans la paroi cellulaire des mycobactéries [38].

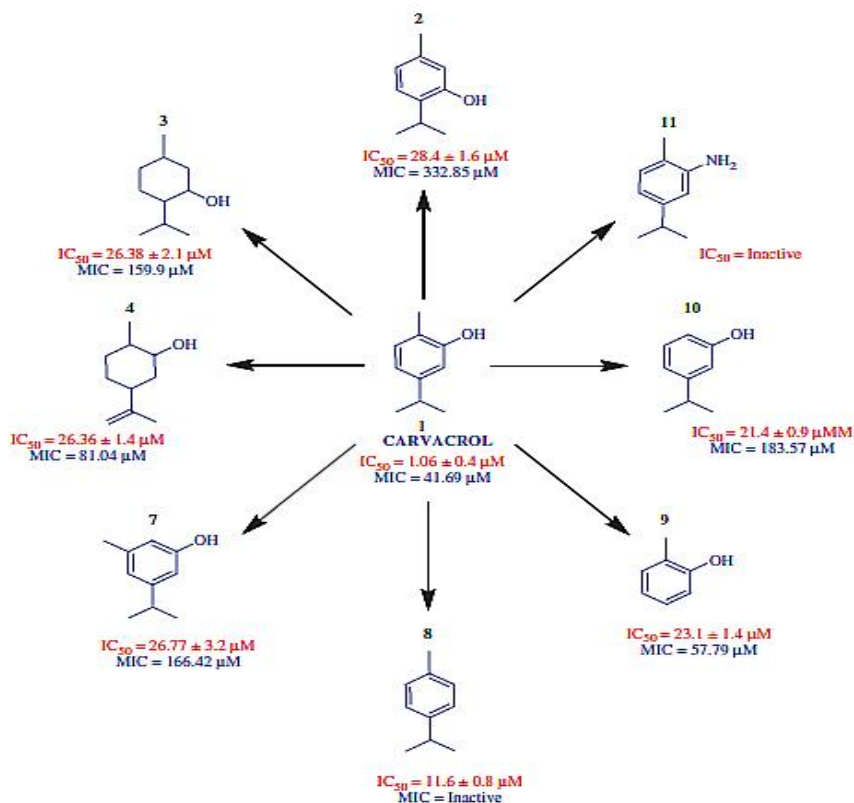


Figure 14 : Relation structure activité de quelques analogues du Carvacrol

c/ Effet anti viral

Le carvacrol joue un rôle clé en tant que composant antiviral contre le rota virus humain (RV). Dans le même contexte, l'extrait et l'huile d'origan mexicain (*Lippia graveolens*) ainsi que le composant carvacrol sont capables de réduire / inhiber les maladies virales chez l'animal et l'humain. Plus précisément, l'activité antivirale de l'origan et de ses composants phénoliques sur le virus de l'herpès simplex résistant à l'acyclovir de type 1 (ACVRHHV-1) et le virus respiratoire humain (VRSH) et sur RV a été documentée [21,39].

d/ activité antioxydante et élimination des radicaux libres

Les radicaux libres ou les intermédiaires réactifs de l'oxygène sont générés par les cellules au cours du métabolisme normal. Lorsque des radicaux libres tels que le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH) s'accumulent excessivement, cela entraîne une détérioration des tissus et la privation de nombreuses fonctions cellulaires. Le carvacrol en tant qu'antioxydant protège les cellules contre les radicaux libres. De plus, les antioxydants inhibent la synthèse des prostaglandines et induisent de nombreuses activités biologiques, y compris les enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments [21,40]. Certaines études ont confirmé l'efficacité du carvacrol dans le piégeage des radicaux libres, à savoir l'oxyde nitrique, les radicaux superoxydes, les radicaux peroxydes et le peroxyde d'hydrogène [41,42]. L'existence d'un groupe hydroxyle (OH) lié à un cycle aromatique est suggérée comme étant la raison de l'activité hautement antioxydante du carvacrol, *in vitro* comme *in vivo* [43,44]. La réaction du carvacrol avec un radical libre est facilitée par son caractère acide faible, donnant ainsi des atomes d'hydrogène à un électron non apparié, produisant un autre radical stabilisé par une diffusion électronique générée par une structure de résonance moléculaire [21,42].

e/ effets anti-cancérigènes et antiplaquettaires

Certains antioxydants naturels, tels que le carvacrol, exercent des effets antiagrégants et antiagrégants plaquettaires [45,46]. L'effet du Carvacrol comme anticancéreux et antiagrégant *in vivo* comme *in vitro* au cours du carcinome hépatocellulaire, des tumeurs pulmonaires et de la cancérogenèse induite par des produits chimiques a été affirmé [47,48]. Plus récemment, il a été suggéré que le Carvacrol présente une activité antigénotoxique à des concentrations non toxiques (<0,05 mM) [21, 49,50].

Références

- [1]. Lepage P, Gros P. La glycoprotéine P : la résistance croisée aux médicaments et au transport des liquides biliaires. *Médecine/Sciences* 1995; 11:357-366.
- [2]. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-1653.
- [3]. Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJLM, Clevers HC, and Scheper RJ. The drug-resistance related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med.* 1995; 1:578-582.
- [4]. Gupta RS, Ross WE., Etoposide (VP16), teniposide (VM26), and related epipodophyllotoxin derivatives. In : drug resistance in mammalian cells, vol. 2. Boca Raton, FL : *CRC Press*, 1989; 89-107.
- [5]. Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang Y, Pfeffer MR, Crawford JW, Frei I. I. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only *in vivo*. *Science* 1990, 247:1457-1461.
- [6]. Zyad A, Benard J, Tursz T, Clarke R and Chouaib S. Resistance to Tumor Necrosis Factor and Adriamycin in the human breast cancer MCF7 cells: Relationship to MDR1, MnSOD and TNF gene expression, *Cancer Research*.1994; 54:825-831.
- [7]. Zyad A, Cai Z, Morizet J, Tursz T, Benard J and Chouaib S. *In vivo* resistance to the combination of TNF and adriamycin against a human breast cell line expressing the MDR-phenotype. *International Journal of Oncology* 1995; 12:106-113.
- [8]. Von Ardenne M., Reitnauer P. G. The elevation of the leucocyte and thrombocyte counts produced by a thyme extract in the peripheral blood as compared to that caused by 2-cyanoethylurea. *Pharmazie* 1981; 36:703-770.
- [9]. Youdim KA, Deans SG. Dietary supplementation of thyme (*thymus vulgaris L.*) essential oil during the life time of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech Ageing Dev.* 1999; 163-175.
- [10]. Lattaoui N, Tantaoui-Elaraki A. Comparative kinetics of microbial destruction by essential oils of *Thymus briussonettii*?*Thymus zygist* and *Thymus satureioides*. *J Essen Oil Res.* 1994; 6: 165-171.
- [11]. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994; 76: 626-631.
- [12]. Tabak M, Armon R, Potasman I, Neeman I. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J Appl Bacteriol* 1996; 80: 667-672.
- [13]. EL-Maraghy SS, Effect of some spices as preservatives of storage of lentil (*Lens esculenta L.*) seeds. *Folia Microbiol.* 1995; 40: 490-492.
- [14]. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG, CG-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 2576-2581.
- [15]. Ait M'Barek L, H. Ait Mouse, A. Jaafari, R. Aboufatima, A. Benharref, M ; Kamal, J. Benard, N. Elabbadi, M. Bensalah, A. Gamouh, A. Chait, A. Dalal and A. Zyad. Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus brousionettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007; 40: 1537-1544.

- [16]. De Vincenzi M, Stammati A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*. 2004; 75(7-8): 801-804
- [17]. Coskun S, Girisgin O, Kurkcuoglu M, MalyerH, Girisgin AO, Kirimer N, Baser KH. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). *Parasitol.Res*. 2008; 103(2): 259–261.
- [18]. Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chem*. 2009; 112(1): 77–83.
- [19]. Figiel A, Antoni S, Antonio GO, Carbonell-Barrachina, ANgel A. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *J. Food Eng*. 2010; 98 (2): 240–247.
- [20]. More UB, Narkhede HP, Dalal DS, Mahulikar PP. Synthesis of biologically active carvacrol compounds using different solvents and supports. *Synthetic Communications*. 2007; 37(12): 1957-1964.
- [21]. Alagawani M, MohaMed ezzat abd el-hack1, Mayada Ragab FaRag2, Ruchi tiwaRi3, kuldeep dhaMa4. Biological Effects and Modes of Action of Carvacrol in Animal and Poultry Production and Health - A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2015, 3(2): 74-84.
- [22]. Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot*. 2000, 63(5): 620–624.
- [23]. Youdim K A, Deans SG. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Br J Nutr* 2000, 83: 87-93.
- [24]. Suganthi RU, Manpal S: Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: an updated review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013, 2(5): 3581-3595.
- [25]. Baser KH: Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des* 2008, 14: 3106-3119.
- [26]. Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat HA, Sahin F, Sokmen A: *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum Acutidens*: *J. Agric. Food Chem* 2004, 52: 3309-3312.
- [27]. Suntres ZE, Coccimiglio J, and Alipou M: The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015, 55 (3): 304-318.
- [28]. Koparal AT, Zeytinoglu, M: Effects of carvacrol on a human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology* 2003, 43: 149-154.
- [29]. Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ: Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology* 2011, 64(1):43-51.
- [30]. Arunasree KM: Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomed. Int J Phytother Phytopharm*. 2010, 17: 581-588.
- [31]. Horvathova E, Turcaniova V, Slamenova D: Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma* 2007, 54: 478-483.
- [32]. Jaafari A, Ait Mouse H, Ait M'Barek L, Tilaoui M, Elhansali M, Lepoivre M, Aboufatima R, Melhaoui A, Chat A, Zyad A: Differential antitumor effect of essential oils and their major

- components of *Thymus broussonettii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction. *Herba polonica* 2009, 55: 36-50.
- [33]. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* 2007, 28: 233-239.
- [34]. Yun Luo, Wu JY, Lu MH, Shi Z, Na N, Di JM. Carvacrol Alleviates Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration, And Invasion through Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 5: 1-11.
- [35]. Elango B, Natarajan S, Dornadula S, Kannan K, Sivanesan SD, Palanisamy R, Kunka M R: Carvacrol induced mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *European Journal of Pharmacology* 2016; 772: 92-98.
- [36]. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. enteritica*. *J. Food Prot.* 2002; 65: 1545–60.
- [37]. Nastro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelki J, Sudano Roccano A, Alonzo V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEBS Lett.* 2002; 230: 191–195.
- [38]. Reshma Alokam, Variam Ullas Jeankumar, Jonnalagadda Padma Sridevi, Siddharth Sai Matikonda, Santosh Peddi, Mallika Alvala, Perumal Yogeewari, and Dharmarajan Sriram. Identification and structure–activity relationship study of carvacrol derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2014; 29(4): 547-554.
- [39]. Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. Antiviral activity of the *lippigraveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Br. J. Microbiol.* 2011; 42: 1616-1624.
- [40]. Azirak S, Rencuzogullari E. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environ. Toxicol.* 2008; 23: 728-735.
- [41]. Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002; 30: 620-650.
- [42]. Aristatle B, Numair AKS, Assaf AHA, Veeramani C, Pugalendi KV. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripherallymphocytes. *J. Biochem. Mol. Toxic.* 2010; 1-11.
- [43]. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* 1994. 32: 31-36.
- [44]. Guimaraes AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, Silva FA, Santos JP, Rocha RF, Moreira JC, Araujo AA, Gelain DP, Quintans-Junior LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 107: 949-957.
- [45]. Karkabounas S, Binolis J, Zelovitis J, Kotsis N, Charalabopoulos A, Avdikos A, Zouridakis A, Liasko R, Giannakopoulos X, Charalabopoulos K. Inhibition and modification of benzo[a]pyrene-induced chemical carcinogenesis by ascorbic acid alone or in combination with atocopherol in Wistar rats. *Exp. Oncol.* 2002; 24: 274–8.
- [46]. Ipeka E, Zeytinoglu H, Okaya S, Tuylua BA, Kurkuoglu M, Can Baserb KH. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem.* 2005; 93(30): 551–556.

- [47]. Karkabounas S, Kostoula O, Daskalou T. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Exp. Oncol.* 2006; 28: 121-125.
- [48]. Michiels J, Missotten J, Dierick N, Fremaut D, Maene P, Smet SD. *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and transcinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *J. Sci. Food Agric.* 2008; 88: 2371-81.
- [49]. Aydin Y, Kutlay O, Ari S, Duman S, Uzuner K, Aydin S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive Rats. *Planta Med.* 2007; 73: 1365-71.
- [50]. Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol. Cell Biochem.* 2012; 360: 51-60

Chapitre III

La phosphatase alcaline et cancer

3. La phosphatase alcaline et cancer

- 3.1. La liaison phosphomonoester et son hydrolyse
- 3.2. Les phosphatases
- 3.3. Les iso enzymes de la phosphatase alcaline et leur distribution
 - 3.3.1. *Phosphatase alcaline placentaire (PALP)*
 - 3.3.2. *Phosphatase alcaline intestinale (IALP)*
 - 3.3.3. *Phosphatase alcaline de cellules germinales (GCALP)*
 - 3.3.4. *Phosphatase alcaline foie / os / rein ou tissu non spécifique (TNSALP)*
 - 3.3.5. *Gènes des phosphatases alcalines*
 - 3.3.6. *Stabilité des phosphatases alcalines*
 - 3.3.7. *Sensibilité aux inhibiteurs*
 - 3.3.8. *Études immunologiques*
 - 3.3.9. *Formes fonctionnelles des phosphatases alcalines*
 - 3.3.10. *La phosphatase alcaline est un marqueur de tumeur:*
 - 3.3.11. *Fonctions physiologiques de la PAL*

3. La phosphatase alcaline et cancer

3.1. La liaison phosphomonoester et son hydrolyse

La liaison phosphomonoester joue un rôle central dans le fonctionnement cellulaire. Outre sa présence dans de nombreuses molécules des êtres vivants (phospholipides, phosphoprotéines, énergétique, etc.), la liaison phosphomonoester est associée à de multiples aspects de la vie cellulaire : métabolisme énergétique, régulation métabolique, signalisation intra- et extra-cellulaire, etc. Ainsi, le système de phosphorylation/déphosphorylation est une réaction au coeur de nombreux processus biologiques. D'un point de vue thermodynamique, cette réaction d'hydrolyse, schématisée ci-dessous, est une réaction spontanée ($\Delta G^0 \sim -9$ kJ.mol) mais très lente [1].



Dans les systèmes biologiques, cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes, regroupées sous le terme générique de phosphatases, découverte au début du 20^{ème} siècle. En 1907, Suzuki *et al.* [2] observent une augmentation de la quantité de phosphate inorganique dans les graines de riz lors de la germination de ces dernières. Ils concluent que la phytine a été transformée en inositol et en acide phosphorique par une enzyme qu'ils nomment à l'époque "phytase". A la même époque, Harden et Young étudient la fermentation alcoolique chez les levures et découvrent une enzyme capable de produire du phosphate inorganique à partir d'hexose diphosphate. Ils montrent également que le phosphate inorganique inhibe l'activité de cette enzyme. Plus tard, l'hydrolyse de la glycérphosphate et de fructose-1,6-bisphosphate par des extraits de divers tissus de mammifères a pu être détectée [3].

Depuis ces premiers travaux, de nombreuses phosphatases ont été étudiées et cette famille compte désormais un grand nombre de représentants, classés en plusieurs subdivisions [1]. La classification des phosphatases est basée sur leur mécanisme d'action (certaines utilisent des cofacteurs métalliques, d'autres non), par leurs conditions physico-chimiques optimales (en l'occurrence, le pH) et par leur spécificité de substrat. En 1992, une classification des phosphatases en cinq classes a été proposée [1]: 1- les phosphatases alcalines, 2- les phosphatases acides pourpres, 3- les phosphatases acides à bas poids moléculaire, 4- les phosphatases acides à haut poids moléculaire, et 5- les protéines Ser/Thr phosphatases. Une sixième classe a été décrite en 1996 par Fauman et Saper [4], il s'agit des protéines tyrosine phosphatases. Les deux classes concernant les protéines phosphatases peuvent être elles-

mêmes subdivisées en plusieurs sous-classes. Les classes 1 à 4 correspondent à des phosphatases substrat-aspécifiques, tandis que les protéines phosphatases sont des enzymes substrat-spécifiques.

3.2. Les phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes omniprésentes dans les processus cellulaires fondamentaux. D'après la classification évoquée ci-dessus, il apparaît que les phosphatases peuvent être plus ou moins spécifiques vis-à-vis de leurs substrats. Les phosphatases substrat-spécifiques sont représentées par les protéines phosphatases. Ces dernières jouent un rôle très important dans la régulation des processus cellulaires, en déphosphorylant certaines protéines. La phosphorylation des protéines sur certains résidus hydroxylés provoque des changements de conformation majeure, pouvant aboutir à des modifications fonctionnelles. Le système de phosphorylation-déphosphorylation des protéines agit ainsi tel un interrupteur "marche-arrêt". Les protéines kinases sont connues pour avoir un tel rôle dans la régulation de voies métaboliques, en phosphorylant certaines protéines [5]. Les phosphatases substrat-aspécifiques sont notamment classées selon le pH auquel elles montrent leur activité maximale. Ainsi, les phosphatases aspécifiques dont l'activité maximale est observée à des pH avoisinant 5 sont appelées "phosphatases acides"; se sont des hydrolases qui catalysent la déphosphorylation d'esters ortho phosphoriques organiques. Elles possèdent également une activité transférase, assurant le transfert d'un phosphate sur le groupement hydroxyle d'un alcool. Une activité phosphatase acide importante est trouvée au niveau de la prostate, du foie, de la rate, du pancréas, des os, et au niveau des cellules sanguines circulantes. Il s'agit d'une protéine dimérique de masse moléculaire environ 100 000, sécrétée en majeure partie dans le liquide séminal et pour une faible partie dans le sang [6].

Par opposition, celles qui ont une activité maximale à pH basiques sont nommées "phosphatases alcalines" (ortho phosphorique mono ester phosphohydrolase, EC 3.1.3.3). Les phosphatases alcalines (PAL) forment une grande famille des enzymes dimériques, généralement confinées à la surface des cellules [7,8], et qui hydrolysent divers esters de monophosphate avec libération de phosphate inorganique [9,10]. Chez les mammifères, ces phosphatases alcalines sont des métallo-enzymes codées par une famille multi-génique et fonctionnent comme des molécules dimériques. Trois ions métalliques (deux Zn^{2+} et un Mg^{2+}) dans le site actif sont essentiels pour l'activité enzymatique. Cependant, ces ions métalliques

contribuent également et de manière substantielle à la conformation du monomère PAL et régule donc indirectement les interactions entre les sous-unités [11]. Ces glycoprotéines métallo-phosphatases, largement distribuées dans la nature, y compris chez les procaryotes et eucaryotes supérieurs [12-14], à l'exception de certaines plantes [15]. Elles sont présentes dans de nombreux tissus de tous les êtres vivants : les ostéoblastes, les hépatocytes, le rein, la rate, le placenta, la prostate, les leucocytes et l'intestin grêle [16].

3.3. Les iso enzymes de la phosphatase alcaline et leur distribution

Chez les mammifères, on peut distinguer quatre iso-formes ou iso-enzymes de la phosphatase alcaline [17] en fonction de leur spécificité d'expression tissulaire : appelé phosphatase alcaline placentaire (PALP ou isozyme de Regan), phosphatase alcaline intestinale (PALI), phosphatase alcaline du foie / os / rein (ALP L / B / K), ALP de cellules germinales (ALPCG ou iso-enzyme de NAGAO) [18]. Les produits enzymatiques d'au moins trois locus de gènes PAL (placentaire, intestinal et L / B / K) [19-21] se distinguent chez l'homme par leur variabilité structurelle et par leurs propriétés biochimiques et immunologiques [22-24].

3.3.1. Phosphatase alcaline placentaire (PALP)

C'est une enzyme thermostable présente à des niveaux élevés dans le placenta et considérée comme iso-enzyme à spécificité tissulaire. Des traces de cette isoenzyme peuvent être détectées dans des sérums normaux [25] dont une partie provient des neutrophiles. Le gène PAL placentaire humain a été cartographié sur le chromosome 2 [26] et une homologie de 87% est trouvée avec le gène codant pour la forme intestinale (PALI). Il existe cependant des différences au niveau de leur extrémité carboxyle terminale [27]. Le gène PAL placentaire qui peut être ré-exprimé par les cellules cancéreuses comme l'isoenzyme de Regan, est une enzyme polymorphe avec jusqu'à 18 alléozymes résultant de mutations ponctuelles, contrairement aux autres isoenzymes de la PAL [28].

3.3.2. Phosphatase alcaline intestinale (PALI)

C'est une forme partiellement thermostable, présente à hauts niveaux dans le tissu intestinal et elle est considérée comme iso-enzyme à spécificité tissulaire. Contrairement aux autres

ALP isoenzymes, les chaînes latérales glucidiques de la PALI ne sont pas terminées par l'acide sialique [29]. Différentes PALI peuvent être isolées du tissu intestinal chez l'adulte comme chez le fœtus. Cependant, la PALI iso-enzyme isolée chez le fœtus est sialylée contrairement à celle trouvée chez l'adulte. De même, des différences notables dans le fragment protéique lui-même suggèrent qu'un locus du gène PAL distinct peut exister chez l'homme au cours du développement du fœtus. Ainsi, ce gène embryonnaire qui peut être ré-exprimé (sous une forme modifiée) par les cellules cancéreuses est désigné comme isoenzyme de Kasahara [30]. Le gène codant pour la PALI fait partie de la famille des gènes mappant le bras long du chromosome 2 [31].

3.3.3. Phosphatase alcaline de cellules germinales (PALCG)

Le gène codant pour la PAL des cellules germinales (PALCG, analogue au placenta like PAL) a également été cartographié sur le chromosome 2 [32]. C'est un iso-enzyme thermostable présent à de faibles concentrations dans les cellules germinales [17], tissus embryonnaires et certains tissus néoplasiques [33,34]. Le gène peut être exprimé dans les testicules / thymus et peut être exprimé à faible concentration dans le placenta [34]. Dans les testicules la PALCG semble être localisée dans la membrane des cellules germinales immatures et, comme les autres isoenzymes, elle est attachée à la membrane cellulaire par la phosphatidyl-inositol-glycane. la PALCG, comme le gène PAL placentaire, peut être ré-exprimé par les cellules cancéreuses (ou isoenzyme NAGAO) [36].

3.3.4. Phosphatase alcaline foie / os / rein ou tissu non spécifique (PALTNS)

C'est une iso-enzyme thermolabile, présente dans le foie / os / rein ou sous forme de tissu non spécifique (PALTNS) [3,17]. Elle est exprimée dans tout le corps et est particulièrement abondante dans le tissu hépatique (L), squelettique (os, B) et rénal (K). Une légère différence en mobilité électro-phorétique et thermo-stabilité entre les formes L / B / K a pu être observée puis attribuée aux modifications post-traductionnelle. Cependant, il est possible que leurs fragments protéiques soient codés par des gènes apparentés [24]. Cette phosphatase alcaline non spécifique hépatique / osseuse / rénale ou tissu non spécifique est codée en tant que locus génétique unique, mappé sur le bras court du chromosome 1 [37,38]. Il a été postulé que le

rôle physiologique des fragments de sucres dans les PAL serait la protection de ces enzymes contre leur élimination rapide de la circulation, suggérant l'implication des récepteurs asialoglycoprotéines du foie [29].

3.3.5. Gènes des phosphatases alcalines

Les phosphatases alcalines sont des métallo-enzymes qui sont liées à la membrane. Chaque isoenzyme est une glycoprotéine codée par différents locus géniques [39]. Il est probable que les gènes humains de la PAL ont évolué à partir d'un seul gène ancestral (Figure ci-dessous 15) [40].

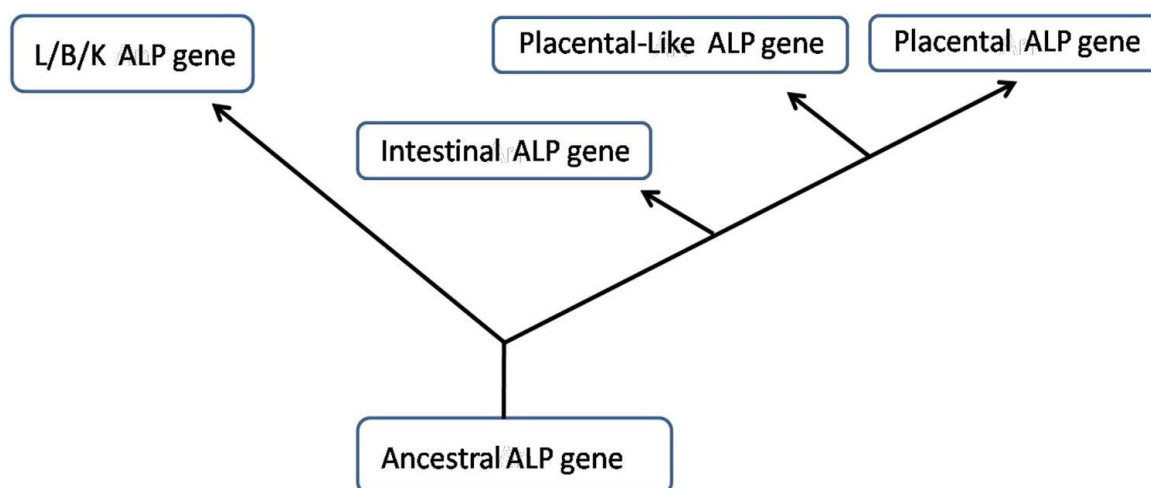


Figure 15. Illustration des relations évolutives postulées entre les gènes du foie, des os, des reins, de l'intestin et du placenta.

Trois gènes PAL situés sur les chromosomes 2q34 à 37 sont exprimés essentiellement dans des tissus spécifiques et produisent des isoenzymes de type placentaire, like placentaire et intestinale (PALP, PALLP et PALI, respectivement). Le quatrième gène codant pour les PAL, foie (L) / os (B) / reins (K), est localisé dans le bras court du chromosome humain 1, les bandes p34 – p36.1 codant pour une famille de protéines (Tableau V) [8, 39,41]. Une glycosylation différentielle de PALTNS donne lieu à des isoformes spécifiques à chaque tissu et différents les uns des autres uniquement par modification post-traductionnelle. Ces isoenzymes secondaires de la PAL sont présentes partout dans le corps, mais individuellement sont plus abondants dans le foie, tissu osseux et rénal [6]. En conséquence, ils sont

collectivement appelé foie (L) / os (B) / rein (K) ou tissu-non spécifique PAL (PALTNS) [13]. Le gène L / B / K semble être au moins cinq fois plus long que chacun des trois autres gènes. La différence de longueur globale est due à des introns beaucoup plus longs dans le gène L / B / K. Les introns dans les gènes intestinaux, placentaires et de type placentaires sont tous assez petits (74 à 425 pb). La séquence complète de cADN de la PAL L / B / K est connue et le gène consiste en 12 exons, comparés à 11 dans chacun des autres gènes (Figure 16).

Tableau V : Nomenclature des isozymes et des gènes humains de la PAL, localisation chromosomique, taille du gène et les numéros d'accèsion.

Gene	Protein name	Common name	Chromosomal location	Accession no
ALPL	TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNSALP; liver/bone/kidney type AP	Chr1: 21581174–21650208	NM_000478
ALPP	PLAP	Placental alkaline phosphatase; PLALP	Chr2: 233068964–233073097	NM_001632
ALPI	IAP	Intestinal alkaline phosphatase; IALP	Chr2: 233146369–233150245	NM_001631
ALPP2	GCAP	Germ cell alkaline phosphatase; GCALP	Chr2: 233097057–233100922	NM_003131



Figure 16. Relation entre l'organisation des exons et la structure polypeptidique du gène PAL L / B / K. Les exons 1 à 12 du gène PAL L / B / K sont représentés par les grands rectangles. Les régions non traduites sont indiquées par la couleur verte. Le peptide signal à l'extrémité N (amine) terminal et l'étirement hydrophobe des acides aminés à l'extrémité C (carboxyle) terminal dans les exons 2 et 12, respectivement, sont indiqués en jaune. Les régions qui comprennent la poche active sont conservées dans la PAL intestinale, la PAL placentaire et la PAL de l'*E. coli* sont montrés comme suit: les petits rectangles au-dessus des exons indiquent les unités conservées de la séquence d'acides aminés qui existent sous forme d'unités discrètes de structure secondaire dans *E. coli* PAL (noir et feuilles, blanc

pour α -hélices); les cercles ouverts indiquent les ligands métalliques et les cercles fermés les résidus qui interagissent directement avec le substrat entrant.

3.3.6. *Stabilité des phosphatases alcalines*

Les phosphatases alcaline ont un comportement différentiel vis-à-vis de la température. En effet, Les PAL intestinales et les formes L / B / K sont rapidement inactivées à la température 65 °C, bien que la PAL intestinale est un peu plus thermostable que les PAL L / B / K. En revanche, les PAL placentaire et like-placentaire peuvent être chauffées pendant une heure à 65 °C sans perte d'activité et elles sont donc sont qualifiées thermostables [42].

3.3.7. *Sensibilité aux inhibiteurs*

Les PAL L / B / K sont plus sensibles à l'inhibition par la L-homoarginine que par la L-phénylalanine. En revanche, les PAL placentaire, like-placentaire ou intestinale sont environ 30 fois plus sensibles à l'inhibition par la L-phénylalanine (Phe) que les PAL L / B / K. La phénylalanyl-glycyl-glycine (Pgg) provoque une inhibition différentielle entre les PAL placentaire, like-placentaire, intestinale et L / B / K. La L-leucine (Leu) inhibe plus fortement la PAL placentaire que les autres PAL. Le lévamisole (Leva) est un inhibiteur particulièrement puissant de la PAL L / B / K, mais il a peu d'effet inhibiteur sur les autres ALP [42].

3.3.8. *Études immunologiques*

Les études immunologiques ont montré que certains déterminants antigéniques détectés sur la PAL placentaire, mais pas tous, sont également présents sur la PAL intestinale. De même, la forme placentaire et like-placentaire sont immunologiquement très similaires. En effet, les antisérums fabriqués chez le lapin contre PAL placentaire purifiée réagissent de manière croisée avec la forme like- placentaire et PAL intestinale, mais pas avec les formes L / B / K. Le manque de spécificité étroite des anticorps rend leur utilisation moins évidente dans la discrimination entre les différentes formes des PAL [40].

La combinaison de ces différentes techniques biochimiques et immunologiques a été utilisée pour mettre au point des méthodes fournissant des informations analytiques précises sur les quantités de chacune des PAL lorsqu'elles sont présentes ensemble dans un extrait tissulaire ou un liquide organique tel que le sérum ou le liquide amniotique.

3.3.9. Formes fonctionnelles des phosphatases alcalines

a/ forme membranaire : c'est une protéine membranaire ancrée sur la couche externe de la membrane plasmique de la cellule par une glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'utilisation de la phosphatidylinositol-phospholipase C, montre que 60 à 80% de la phosphatase alcaline membranaire est liée à la membrane par une glycosylphosphatidylinositol [43].

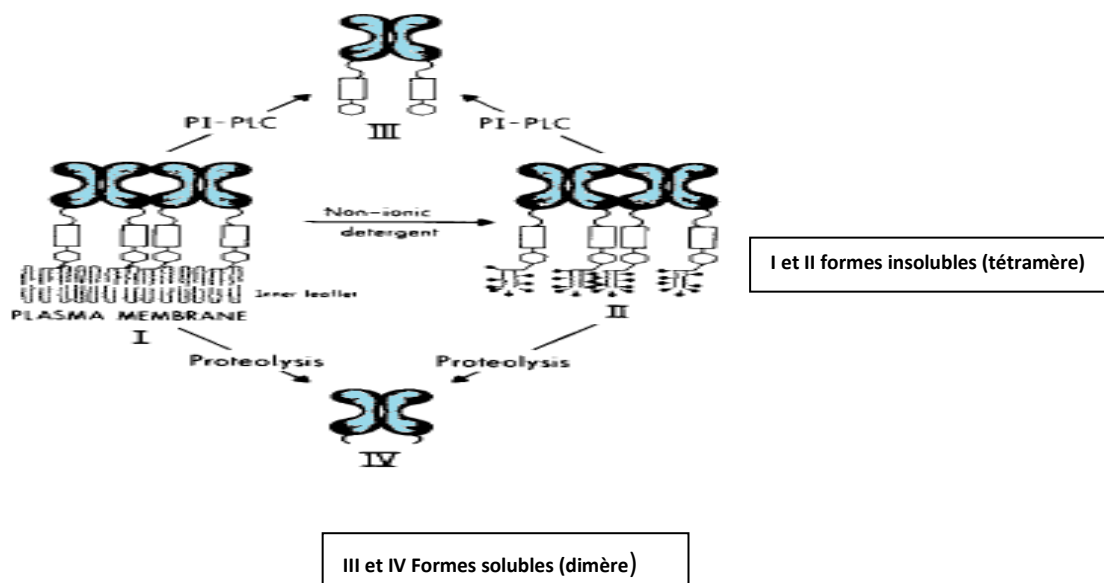


Figure 17. Formes solubles et insolubles de la phosphatases alcalines

b/ forme soluble résulte de la libération de la forme membranaire (protéine-GPI) pour engendrer la forme soluble de l'enzyme par différents 'stimuli', physiologique, chimique et physique.

3.3.10. La phosphatase alcaline est un marqueur de tumeur:

L'élévation de l'activité sérique des phosphatases alcalines est observée dans les cholestases qu'elles soient extra hépatiques ou intra hépatiques. Une véritable sécrétion paranéoplasique des phosphatases alcalines a été décrite dans différents types de cancers comme le cancer du poumon, de l'ovaire, séminome du testicule et le carcinome hépatocellulaire [44-49]. Dans ces observations, les isoenzymes des phosphatases alcalines responsables de l'élévation des taux sériques de l'activité phosphatase alcaline sont de type placentaire ou intestinal. Nous rapportons l'observation d'une élévation isolée des phosphatases alcalines sanguines de type hépatique secondaire qui est due à un volumineux adénome hépatique et ne comprimant pas les voies biliaires. L'expression aberrante des gènes PAL dans le cancer a conduit à la suggestion que les isoenzymes PAL pourraient être impliqués dans la tumorigenèse [10, 14,50]. Une élévation de l'enzyme en cas de carcinome de la prostate est habituellement due à la sécrétion par l'os ou le foie, ou les deux [51].

3.3.11. Fonctions physiologiques de la PAL

Depuis sa première description par Suzuki et ses collègues en 1907 [2], la phosphatase alcaline (PAL) a été étudiée continuellement et largement. Mais on sait peu de choses sur la fonction physiologique des PAL. Cependant, mis à part son rôle dans la minéralisation des os normaux, les autres fonctions restent obscures à la fois dans les conditions physiologiques et néoplasiques.

Une carence en PALTNS (PAL tissu non spécifique) conduit à une hypophosphatasie (HPP) due à un désordre métabolique (erreur innée) caractérisé par des crises d'épilepsie dans les cas les plus graves. Cette anomalie est causée par un métabolisme anormal du pyridoxal-5'-phosphate (vitamine B6) et par une hypo-minéralisation du squelette et des dents (le rachitisme et la perte précoce de dents chez les enfants) ou ostéomalacie et problèmes dentaires chez les adultes causés par l'accumulation de pyrophosphate inorganique (PPi) [52]. Les cas les plus graves sont mortels en bas âge avec pratiquement l'absence complète de la PAL dans tous les tissus [53]. Des formes sévères de maladies sont transmises sous forme autosomique récessif et une identification d'une mutation faux-sens dans le gène PALTNS,

dans un cas typique de crise périnatale grave d'hypophosphatasie (létale), a établi ce lien entre la PALTNS et la minéralisation squelettique [54,55].

Références chapitre III

- [1]. Vincent, J. B., Crowder, M. W. & Averill, B. A. Hydrolysis of phosphate monoesters: A biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.* 1992; 17, 105-10.
- [2]. Suzuki U, Yoshimura K, Takashi M. Uber ein enzyme-phytasek das anhydro-oxy-methylen-diphosphorsaure spaltet. *Bull Coll Agri Tokyo Imp Univ.* 1907; 7: 503–12.
- [3]. McComb RB, Bowers GN, Posen S. Alkaline phosphatase. *New York: Plenum Publishing Corp;* 1979.
- [4]. Fauman, E. B. & Saper, M. A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 4137.
- [5]. Barford, D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 1996, 21, 407-12.
- [6]. Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem.* 1992; 38: 2486–92.
- [7]. Benham F, Cottell DC, Franks M, Wilson PD. Alkaline phosphatase activity in human bladder tumor cell lines. *J Histochem Cytochem.* 1977; 25: 266–74.
- [8]. Mornet E, Stura E, Lia-Baldin AS, Stigbrand T, Menez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue non specific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem.* 2001; 276: 31171–8.
- [9]. Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83: 7182–6.
- [10]. Sharma U, Singh SK, Pal D, Khajuria R, Mandal AK, Prasad R. Implication of BBM lipid composition and fluidity in mitigated alkaline phosphatase activity in renal cell carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2012; 369: 287–93.
- [11]. Hoylaerts MF, Manes T, Millan JL. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem.* 1997; 272: 22781–7.
- [12]. Chang TC, Wang JK, Hung MW, Chiao CH, Tsai LC, Chang GG. Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line. *Biochem J.* 1994; 303:199-205.
- [13]. Whyte MP, Landt M, Ryan LM, Mulivor RA, Henthorn PS, Fedde KN, Mahuren JD, Coburn SP. Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5-0-phosphate substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1440-5.
- [14]. Sadeghirishi A, Yazdanparast R. Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an anti-proliferative agent from *Dendrostellera lessertii*. *Acta Biochim Polonia.* 2007; 54: 323–9.

- [15]. Shigenari A, Ando A, Baba R, Vaniamoti T, Katsuoka Y, Inoko H. Characterization of alkaline phosphatase genes expressed in seminoma by cDNA cloning. *Cancer Res.* 1998;58:5079–82.
- [16]. Akcakaya H, aroymak, Gokce S Istanbul university,Istanbul faculty of medicine, department of biophysics,34390 capa-istanbul, turkey. 2007 Feb; 31(2):186-90.
- [17]. Tsai LC, Hung MW, Chen YH, Su WC, Chang GG, Chang TC. Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 1330–9.
- [18]. Sligbrand T. Present status and future trends of human alkaline phosphatases. *Prog Clin Biol Res.* 1984; 166:3–14.
- [19]. Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lefferty MA, Whyte MP. Different missense mutations at the tissue nonspecific alkaline phosphatase *Proc Natl Acad Sci* genes locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia.. 1992; 89:9924–8.
- [20]. Millan JL, Fishman WH. Biology of human alkaline phosphatase with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1995; 32: 1–39.
- [21]. Muller H, Yamazaki M, Michigami T, Kageyama T, Chonau E, Schneider P, Ozono K. Asp361Val mutant of alkaline phosphatase found in patients with dominantly inherited hypophosphatasia inhibits the activity of the wild-type enzyme. *J Clinical Endocrinol Metabolism.* 2000; 85: 743–7.
- [22]. Mulivor RA, Plotkin LI, Harris H. Developmental change in human intestinal alkaline phosphatase. *Ann Hum Genet.* 1978; 42:1–13.
- [23]. McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. structural evidence for three protein classes. *Biochem J.* 1979; 181: 67–73.
- [24]. Harris H. The harvey lectures: series 76. New York: Academic; 1986. p. 95–123.
- [25]. Vergote IB, Abeler VM, Borner OP, et al. CA125 and placental alkaline phosphatase as serum tumor markers in epithelial ovarian carcinoma. *Tumor Biol.* 1992; 13: 168–74.
- [26]. Raimondi E, Talarico D, Moro L, et al. Regional mapping of the human placental alkaline phosphatase gene (ALP) to 2q37 by in situ hybridization. *Cyrogenet Cell Genet.* 1988; 47: 98–9.
- [27]. Henthorn PS, Raducha M, Hadesch T, et al. Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem.* 1988; 263: 12011–9.
- [28]. Fishman WH, Inglis NR, Green S, et al. Immunology and biochemistry of regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. *Nature.* 1968; 219: 697–9.
- [29]. Komoda T, Sakagishi Y. The function of the carbohydrate moiety and alteration of carbohydrate composition in human alkaline phosphatase isoenzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 523: 395–406.
- [30]. Higashino K, Muratani K, Hade T, et al. Gene structure of alkaline phosphatases: purification and some properties of the fast migrating alkaline phosphatase in FL- amnion cells (the Kasahara isoenzyme) and its cDNA cloning. *Clin Chim Acta.* 1989; 186:151–64.

- [31]. Griffin CA, Smith M, Henthorn PS, et al. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34–q37. *Am J Hum Genet.* 1987; 41: 1025–34.
- [32]. Millan JL. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem.* 1986; 261: 3112–5.
- [33]. Millan JL, Manes R. Seminoma-derived nagao isozyme is encoded by a germ cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85: 3024–8.
- [34]. Hofmann MC, Jeltsch W, Brecher J, Walt H. Alkaline phosphatase isozymes in human testicular germ cell tumors, precancerous stage, and three related cell lines. *Cancer Res.* 1989; 49: 4696–700.
- [35]. Povinelli CM, Knoll BJ. Trace expression of the germ-cell alkaline phosphatase gene in human placenta. *Placenta.* 1991; 12(663): 8.
- [36]. Fishman WH. Clinical and biological significance of an isoenzyme tumor marker-PLAP. *Clin Biochem.* 1987; 20:387–92.
- [37]. Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, et al. Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1 p36.1–p34. *Genomics.* 1988; 2: 139-43.
- [38]. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010; 77: 4–12.
- [39]. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem.* 1988; 263: 12002–10.
- [40]. Ujjawal Sharma,Deeksha Pal • Rajendra Prasad. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Ind J Clin Biochem.* 2013
- [41]. Du MHL, Milla JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* 2002; 277:49808–14.
- [42]. Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta.* 1990; 186:133–50.
- [43]. Feldbush TL, Lafrenz D. Harry S. Truman Hôpital mémorial des anciens combattants, Columbia, Missouri. *J immunol.*1991 Dec 1; 147(11) :3690-5
- [44]. Vergote I, Onsrud M, Nustad K. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker in ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1987; 69: 228-32.
- [45]. De Broe M, Pollet DE. Multicenter evaluation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. *Clin Chem.* 1988; 34 : 1995-9.
- [46]. Warnock M, Reisman R. Variant alkaline phosphatase in human hepatocellular cancers. *Clin Chim Acta* 1969; 24 : 5-11.
- [47]. Tokushima K, Ikeda T, Kobayashi F, Kurosaki M, Tozuka S, Sakamoto S, et al. A variant alkaline phosphatase-producing gastric carcinoma with super bone scan. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 66-73.

- [48]. Murakami M, Yoshioka S, Kuratsu J, Nakamura H, Ushio Y. High serum alkaline phosphatase level of meningioma cell origin : case report and review of the literature. *Neurosurgery* 1992; 30: 624-7.
- [49]. Coulton LA, Ingleton PM, Preston CJ, Brocklehurst D, Martin TJ. Production of alkaline phosphatase by a rat osteogenic sarcoma in vivo and in vitro. *Biochem Soc Trans.* 1978; 6 : 239-41.
- [50]. Prasad R, Lambe S, Kaler P, Pathania S, Kumar S, Attari S, Singh SK. Ectopic expression of alkaline phosphatase in proximal tubular brush border membrane of human renal cell carcinoma. *Biochim et Biophys Acta.* 2005; 1741: 240–5.
- [51]. Abdul-Mohsen, E O Kehinde, E Loutfi, Y Ali, O O Roberts. *African Journal of Urology.* 2007, Vol. 13 (1) : 45-49
- [52]. Buchet R, Millaín JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol.* 2013; 1053:27–51.
- [53]. Mueller HD, Stinson RA, Mohyuddin F, Milne JK. Isoenzymes of alkaline phosphatase in infantile hypophosphatasia. *J Lab Clin Med.* 1983; 102: 24–30.
- [54]. Sultana S, Al-Shawafi HA, Makita S, Sohda M, Amizuka N, Takagi R, Oda K. An asparagine at position 417 of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is essential for its structure and function as revealed by analysis of the N417S mutation associated with severe hypophosphatasia. *Mol Genet Metab.* 2013; 109: 282–8.
- [55]. Chang KC, Lin PH, Su YN, Peng SS, Lee NC, Chou HC, Chen CY, Hsieh WS, Tsao PN. Novel heterozygous tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) gene mutations causing lethal perinatal hypophosphatasia. *J Bone Miner Metab.* 2012; 30:109–13.

Partie II

Chapitre IV: Matériel et Méthodes

Chapitre V : - Résultats

- Discussion Générale et Conclusion

- Perspectives

Matériel et Méthodes

4.1. La culture cellulaire

4.2. Comptage cellulaire

4.3. Préparation et traitement des PBMC

4.4. Mesure de la cytotoxicité cellulaire

a/ Méthode MTT

b/ Méthode DCPIP, nouvellement développée

4.5. Détermination de l'activité phosphatase alcaline.

4.6. Effet antioxydant: méthode DPPH

4.1. La culture cellulaire

Les lignées tumorales adhérentes et non adhérentes ont été utilisées pour tester les effets du carvacrol sur l'activité phosphatase alcaline. Il s'agit de la lignée non adhérente **P815** qui est un mastocytome murin immunogène mais très agressif, développé à partir des mastocytes, cellules ayant un rôle dans l'immunité. Les lignées adhérentes: - **MCF7** est un cancer du sein - **MDA-mb468** est un cancer du sein triple négatif et - **BSR** est un Adénocarcinome d'hamster. Les lignées cellulaires ont été cultivées en routine dans du milieu complet RPMI 1640 additionné de 5% de sérum fœtal bovin (Gibco BRL, Serigny Pontoise, France), 1% de pénicilline-streptomycine et 2% de L-glutamine.

Les cellules (10^5 cellules par ml) ont étéensemencées en triplicate dans des boîtes de culture (volume final 6 ml) et incubées à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO₂. Le carvacrol, pokeweed mitogène et la cisplatine ou la vincristine ont été donnés aux cellules aux concentrations indiquées. Le carvacrol (60 µl) a été mélangé d'abord avec 60 µl de DMSO puis le mélange a été dilué davantage dans du milieu de culture RPMI aux concentrations appropriées. La viabilité cellulaire et leur morphologie ont été examinées par microscopie optique et après le nombre de cellules a été quantifié en utilisant une lame de Malassez pour chaque expérience.

4.2. Comptage cellulaire

A 20 µl de la suspension cellulaire, on ajoute 160 µl de milieu de culture et 20 µl d'une solution de bleu de trypan. Ce dernier colore les cellules mortes pour ne pas les compter. On prend une goutte de ce mélange qu'on met sur une lame de Neubauer (ou de Malassez). Ensuite, on compte au microscope et on calcule le nombre de cellules par ml de suspension.

4.3. Préparation et traitement des PBMC

Des échantillons de sang ont été prélevés chez de jeunes donneurs sains (volontaires). Les cellules mononucléaires du sang périphérique ont été isolées par centrifugation en utilisant un gradient de densité à base de Ficoll [1]. La fraction de couche blanche a été transférée et lavée deux fois avec une solution tamponnée au phosphate (PBS) et ensuite la cytotoxicité du

Carvacrol sur les cellules lymphocytaires a été réalisée en utilisant un dosage colorimétrique MTT comme décrit ci-dessous.

4.4. Mesure de la cytotoxicité cellulaire

a/ Méthode MTT

Le test au méthylthiazole tétrazolium (MTT) a été utilisé pour déterminer l'effet du Carvacrol sur la croissance de la lignée cellulaire de mastocytome murin (P815) et des PBMC [2]. Brièvement, les cellules P815 ou PBMC ont été lavées deux fois avec du PBS puis incubées dans 100 µl de milieu complet à une densité de 10^5 cellules / ml dans des plaques de microtitrage à 96 puits à fond plat (Bioster, Bastia di Rovolon, Italie). Des dilutions appropriées du Carvacrol ont d'abord été réalisées dans 100 µl de milieu complet puis ajoutées à la culture cellulaire. Après 48 h d'incubation dans une atmosphère humidifiée à 37 ° C, 5% de CO₂, 100 µl de milieu ont été soigneusement retirés de chaque puits et remplacés par 20 µl de solution de MTT (5 mg / ml de PBS). Après 4 h d'incubation dans les mêmes conditions, le clivage du MTT en formazan par des cellules métaboliquement actives a été quantifié à 540 et 630 nm en utilisant un spectrophotomètre multi-scan. La moyenne de trois essais indépendants a été déterminée pour analyser l'effet des drogues sur la croissance des cellules PBMC et P815. Le pourcentage d'inhibition de la croissance a été évalué en pourcentage par rapport aux contrôles négatifs comme suit:

$$[(A_{\text{control}} - A) / A_{\text{control}}] \times 100.$$

La vincristine ou le cisplatine ont été utilisés comme contrôle positif.

b/ Méthode DCPIP (nouvellement développée)

Les cellules non adhérentes P815 ont été lavées deux fois avec du PBS puis incubées dans 100 µl de milieu complet à une densité de 10^5 cellules / ml dans des plaques de microtitrage à 96 puits à fond plat (Bioster, Bastia di Rovolon, Italie). Des dilutions appropriées des drogues ont été réalisées dans 100 µl de milieu complet puis ajoutées à la microculture cellulaire.

Les cellules adhérentes sont préincubées dans le milieu de culture complet à la densité de 10^4 cellules / ml pendant 24 h afin que les cellules adhèrent à la plaque. Puis 200 μ l des différentes drogues, à la dilution appropriée, sont ajoutés à la microculture cellulaire.

Après 48 h d'incubation dans une atmosphère humidifiée à 37 ° C, 5% de CO₂, 100 μ l de la solution DCPIP (200 mM tampon phosphate, pH 6.8, containing 10 mM succinate et 3% TX-100) sont additionnés puis les microcultures sont maintenues à 37 °C pendant 3h. La réduction de DCPIP, exprimée comme $\Delta DO_{\lambda 600nm}$, par des enzymes actives est quantifiée par spectrophotométrie multi-scan (ELISA). La moyenne de trois essais indépendants a été déterminée pour analyser l'effet des drogues sur la croissance des cellules adhérentes MCF7 et MDA-mb468 et des cellules non adhérentes P815. Le pourcentage d'inhibition de la croissance a été évalué en pourcentage par rapport aux contrôles négatifs comme suit: $(\Delta DO_{control} - \Delta DO_{experiment}) / \Delta DO_{control}) \times 100$.

4.5. Détermination de l'activité phosphatase alcaline (APAL).

Les enzymes ALP ont été solubilisées comme décrit précédemment [3]. Brièvement, les cellules de chaque boîte de culture ont été lavées avec du PBS en utilisant la centrifugation à 7000 x g pendant 15 minutes. Les cellules ont été mélangées avec 0,5 ml du tampon (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM pH 8) et remise en suspension puis solubilisées en ajoutant du triton X-100 à une concentration finale de 1%. Au bout de 20 minutes, le surnageant acellulaire a été obtenu par centrifugation à 12 000 x g pendant 15 minutes. L'activité PAL a été réalisée en utilisant du p-nitrophényle phosphate 5 mM dans du tampon bicarbonate (HCO₃- 50 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 10) dans un volume total de 1 ml [4]. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2 heures à 37 ° C puis la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de NaOH 0,4 M. L'activité de la PAL a été exprimée en micromoles de p-nitrophénol produites par minute pour 10^6 cellules ou en pourcentage par rapport au contrôle.

La stabilité de l'enzyme solubilisée à 56 ° C a été surveillée en incubant des aliquotes de chaque échantillon (20 μ l) dans un bain d'eau à température constante, pendant différents intervalles de temps. Les échantillons ont été refroidis sur de la glace et les activités de la PAL résiduelles ont été examinées comme décrit ci-dessus.

L'activité phosphatase alcaline dans les PBMC a été déterminée en incubant les cellules dans 100 µl de milieu complet à une densité de 10^5 cellules / ml dans des plaques de 96 puits à fond plat (Bioster, Bastia di Rovolon, Italie). Des dilutions appropriées du Carvacrol ont d'abord été réalisées dans 100 µl de milieu complet puis ajoutées à la culture cellulaire. Après 48 heures d'incubation dans une atmosphère humidifiée à 37 ° C, 5% de CO₂, 100 µl de milieu ont été soigneusement retirés de chaque puits et la solubilisation cellulaire a été réalisée en ajoutant du triton X-100 à une concentration finale de 1%. Au bout de 20 minutes, l'activité de ALP a été mesurée en utilisant du p-nitrophényle phosphate 5 mM dans du tampon bicarbonate (HCO₃- 50 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 10) dans un volume total de 200 µl. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2 heures à 37 ° C. La réaction a été arrêtée en ajoutant 150 µl de NaOH 0,4 M au mélange réactionnel, puis l'absorbance a été mesurée à 405 nm, dans un lecteur ELISA Multimode Detector. L'activité de l'ALP a été exprimée en pourcentage de contrôle.

4.6. Effet antioxydant : méthode DPPH

Cette méthode est basée sur l'évaluation de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH•). En présence d'un composé doué d'activité antioxydante, le DPPH est réduit à la forme hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. Cette transformation s'accompagne d'une diminution de l'absorption ($DO_{\lambda 517 \text{ nm}}$) et permet donc une quantification du pouvoir antioxydant de chaque produit [5]. Les expériences sont réalisées dans des plaques de 96 puits et les produits sont solubilisés dans du DMSO de façon à ce que la concentration soit de 20mg/ml. Pour certains produits une dilution préalable de 1/30^e dans du DMSO était nécessaire à cause de leur fort effet antioxydant. Dans un volume final de 200 µl, 16 µl de chaque produit solubilisé sont additionnés au méthanol. Parallèlement 10 µl de la vitamine C (contrôle positif de référence) à la concentration 1 mg/ml sont mélangés au méthanol (volume final 200 µl). En suite 100µl est transféré dans le puits suivant contenant déjà 100 µl du méthanol (dilution 1/2). La même procédure est répétée pour réaliser les dilutions en cascade 1/4^e, 1/8^e, 1/16^e, 1/32^e, 1/64^e et 1/128^e. La réaction est enclenchée par l'ajout de 150 µL du DPPH (1mg/25 ml méthanol). Après une incubation de 30 minutes dans l'obscurité à 37°C, l'absorbance à 517 nm est mesurée dans un spectrophotomètre (ELISA). Le blanc est réalisé avec du méthanol, DMSO

et le réactif DPPH dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés comme étant le pourcentage de l'Activité Anti-Radicalaire (AAR) selon la formule :

$$\% \text{ AAR} = (\text{D.O contrôle} - \text{D.O échantillon} / \text{D.O contrôle}) \times 100.$$

On peut également déterminer à partir des courbes la concentration nécessaire pour réduire de 50% la concentration de DPPH (40µg/ml) utilisée (IC₅₀). Les IC₅₀ sont calculés graphiquement.

Référenes

- [1]. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, and Zola H: Isolation of whole Mononuclear cells from Peripheral Blood and Cord Blood. *Current Protocols in Immunology* 2009, 7.1.1-7.1.8
- [2]. Septisetyani E.P., RatihAsmanaNingrum, YulaikaRomadhani, PopiHadiWisnuwardhani, AdiSantoso. Optimization of sodium dodecyl sulphate as a formazansolvaent and comparison 3-(4,-5dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with WST-1 assay in MCF-7 cells. *Indonesian J. Pharm.* 2014, Vol. 25 No. 4 : 245 – 254
- [3]. Chang TC, Wang JK, Hung MW, Chen UH, Chiao CH, Tsai LC, Chang GG: Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line. *Biochem J* 1994, 303: 199-205.
- [4]. Koyama I, Sakagishi Y, Komoda T: Different lectin affinities in rat alkaline phosphatase isoenzymes: multiple forms of iso-enzymes isolated by heterogeneities of sugar moieties. *J Chromatogr* 1986, 374: 51-59.
- [5]. Sanchez-Moreno, Larrauri J. A., Saura-Calixto F. *Journal of the Science Food and Agriculture.* 1998, 76 (2), 270-276

Chapitre V

RESULTATS,

DISCUSSION GENERALE

et CONCLUSION

RESULTATS

Axe de recherche 1 : valorisation des substances naturelles

- 5.1. Effet cytotoxique des huiles essentielles de Thym et des extraits de Nigelle sur les cellules cancéreuses P815 et BSR. Corrélation avec l'expression de la phosphatase alcaline

[Cytotoxic effect of thyme essential oil and Nigella saliva L extract on P815 and BSR cancer cells: Correlation with alkaline phosphatase expression]

(Article publié, voir ci-dessous)

- 5.2. Effet biphasique du carvacrol sur la croissance des cellules cancéreuses P815 (mastocytome murin) et son effet modérateur négatif sur la phosphatase alcaline

[Biphasic effect of Carvacrol on cell growth of murine mastocytoma cancer cells (P815) and its negative modulation on alkaline phosphatase activity]

(Article soumis, voir ci dessous)

- 5.3. Nouvelle méthode d'évaluation in vitro de l'effet cytotoxique des extraits et drogues sur les cellules cancéreuses: Méthode rapide, efficace et moins chère que celle préconisée actuellement (MTT teste).

[Rapid and simple chemosensitivity assay for both adherent and non adherent cancer cell lines by using 2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol (DCPIP)]

(Article soumis, voir ci dessous)

5.1. Effet cytotoxique des huiles essentielles de Thym et des extraits de Nigelle sur les cellules cancéreuses P815 et BSR. Corrélation avec l'expression de la phosphatase alcaline

Les plantes aromatiques et médicinales et particulièrement leurs huiles essentielles ont fait l'objet de plusieurs recherches. Le genre *Thymus* largement répandu dans la région méditerranéenne (215 espèces) [1] possède un spectre d'activités pharmacologiques très large incluant l'effet antispasmodique [2], antimicrobien [3-5], expectorant [6], antioxydant [1] et anti-inflammatoire [7]. Précédemment, nous avons montré qu'un extrait brut (huile essentielle) de thym et un de ses composants majeurs, le carvacrol, sont capables de réduire les taux de prolifération *in vitro* des lignées cancéreuses humaines, adénocarcinome ovarien sensible ou résistant à la chimiothérapie [8], MCF7, et la lignée cellulaire de mastocytome murin (P815) [9]. De plus, nous avons également montré que l'huile essentielle de thym ainsi que le carvacrol inhibent efficacement la croissance tumorale et retardent la mortalité de modèles de souris DBA2 (H2d) portant des tumeurs [8,9].

Des données récentes suggèrent fortement que de nombreux produits naturels inhibent préférentiellement la croissance des cellules tumorales en ciblant une ou plusieurs cascades de signalisation conduisant à l'induction de l'apoptose [10]. Puisque le déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose est corrélé avec la progression du cancer, alors l'identification des agents prolifératifs ou chimio-préventifs est d'une grande importance. Très récemment, il a été rapporté que le carvacrol posséderait un potentiel thérapeutique pour le traitement du cancer de la prostate et cela impliquerait une inhibition des canaux TRPM7 et la suppression des voies de signalisation PI3K / Akt et MAPK [11]. Cependant, dans les cellules cancéreuses leucémiques (cellules HL-60 et Jurkat), le carvacrol semble induire l'apoptose par voie mitochondriale grâce à l'implication de la caspase-3 [12].

L'expression de l'activité phosphatase alcaline (APAL) serait associée à une grande variété de cancer humain et une telle expression aberrante de cette activité enzymatique dans les cellules cancéreuses a suggéré son implication probable dans le développement des tumeurs [13]. Dans les lymphocytes B, l'expression de l'activité phosphatase alcaline est considérée comme marqueur intrinsèque des cellules B activées alors que cette activité enzymatique est absente dans les cellules T [14]. Une augmentation de l'APAL lors de la multiplication des cellules cancéreuses (MCF-7 cells, human breast cancer) traitées par du

dexaméthasone, acide rétinolique ou du phorbol 12-myristate 13-acétate est également constatée [15]. De manière générale, lorsque les cellules cancéreuses sont stressées par la présence des drogues cytotoxiques, APAL augmente [16]. Les hormones stéroïdiennes comme les glucocorticoïdes sont également des régulateurs de l'APAL [17-19]. En revanche aucune diminution de l'activité APA n'a pu être détectée ou signalée en réponse à une stimulation ou inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales dans la littérature, à notre connaissance. Les premières expériences préliminaires entreprises au sein de notre laboratoire permettent d'établir une première évaluation de la corrélation entre l'effet antiprolifératif (ou prolifératif) des différents extraits et/ou drogues pures et la modulation de l'APAL dans deux lignées tumorales, P815 et BSR.

Bien que les extraits (éthanolique, d'acétate d'éthyle et l'huile essentielle) obtenus à partir des plantes médicinales marocaines (*graines de Nigelle* et le *Thym*) aient montré des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales, leur mécanisme d'action comme leur cible pharmacologique restent à déterminer.

L'approche expérimentale dans le présent travail est basée sur l'incubation des cellules tumorales pendant 48h (cycle cellulaire) en présence des différents extraits et/ou drogues, utilisés à la concentration proche de leur concentration permettant de réduire la prolifération cellulaire de 50% (IC_{50}) (Tableau VI, ci après). Après les cellules sont comptées, lysées puis l'activité PAL est dosée sur l'extrait cellulaire brut par spectrophotométrie (405 nm) en présence du substrat para-nitrophénol-phosphate (PNPP). Parallèlement, l'effet direct des différentes drogues ou extraits est évalué sur l'extrait enzymatique PAL, préparé à partir des cellules témoins.

Tableau VI. Effet cytotoxique, exprimé en IC₅₀, des extraits éthanoliques et/ou d'acétate d'éthyle des graines de Nigelle, du thym ainsi que la vincristine et le Carvacrol sur les lignées P815 et BSR. IC₅₀ correspond à la concentration permettant la réduction de 50% la prolifération des cellules cancéreuses.

Cell line	Nigella extract (mg/ml)	Thyme Essential Oil (mg/ml)	Vincristine (μM)	Carvacrol (μM)
P815	9.5 ± 0.45	11 ± 0.4	4 ± 0.2	200 ± 10
BSR	4.5 ± 0.2	4 ± 0.23	7 ± 0.25	–

Les premiers résultats obtenus montrent clairement que l'incubation des cellules tumorales P815 pendant 48h en présence de la vincristine, de l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de Nigelle, huile essentielle du thym ou Carvacrol pur induisent une inhibition de la prolifération cellulaire autour de 50% (Tableau VI).

Le dosage de l'activité phosphatase alcaline (APAL) après 48h d'incubation révèle que la vincristine comme l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de Nigelle engendre une augmentation de l'APAL cellulaire avec une augmentation de +66 ± 8 pour la vincristine et +46 ± 5% pour la Nigelle (Tableau VII). La même activité phosphatase alcaline est fortement réprimée par le Carvacrol et l'huile essentiel du thym atteignant -60% et -40% de réduction, respectivement (Tableau VII). L'effet direct des différentes drogues ou extraits sur l'activité phosphatase alcaline ne révèle pas d'effet significatif. Ceci monte clairement que l'effet répressif de l'APAL observé, après 48h d'incubation en présence du Carvacrol, ne peut pas être du à une inhibition directe de l'activité enzymatique phosphatase alcaline dosée sur les extraits bruts des cellules P815.

Ces résultats suggèrent fortement une probable corrélation entre la répression de l'activité PAL et la prolifération des cellules tumorales P815. Cependant l'augmentation de l'activité PA sous influence des agents cytotoxiques (stresse cellulaire) est largement évoquée dans la littérature [13, 15,16]

Tableau VII : Effet de différentes drogues sur l'activité phosphatase alcaline, exprimé en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux témoins.

P815 cell line % of control	Vincristine (7 μ M)	Nigella extract (9.5 mg/ml)	Thyme Essential Oil (11 mg/ml)	Carvacrol (200 μ M)
Cell number	-45 \pm 4	-52 \pm 7	-48 \pm 5	-55 \pm 5
ALP activity After 48 h	+66 \pm 8	+46 \pm 5	-40 \pm 5	-60 \pm 7
Direct effect on ALP activity	-4 \pm 2	-3 \pm 2.5	+2 \pm 0.5	+4 \pm 2

Les mêmes expériences ont été entreprises sur la lignée BSR dans les mêmes conditions expérimentales. Tableau VIII, montre que les extraits comme les produits purs, utilisés à la concentration IC₅₀, réduisent la prolifération des cellules BSR de ~50% comme prévu. Concernant l'effet sur l'activité phosphatase alcaline après 48 h d'incubation, on constate qu'il y a une augmentation de +45 \pm 4% pour la vincristine et de +36 \pm 5 pour l'extrait de Nigelle. En revanche, l'huile essentielle de thym ou Carvacrol réduisent l'APAL de -15 \pm 4% et de -35 \pm 5%, respectivement. Cette répression de l'activité PAL semble moins importante dans les cellules cancéreuses BSR que dans les cellules cancéreuses P815.

Tableau VIII : Effet de différentes drogues sur l'activité phosphatase alcaline, exprimé en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux témoins

BSR cell line % of control	Vincristine (7 μ M)	Nigella extract (9.5 mg/ml)	Thyme essential oil (11 mg/ml)	Carvacrol (200 μ M)
Cell number	-51 \pm 5	-47 \pm 7	-52 \pm 5	-55 \pm 5
ALP activity After 48 h	+45 \pm 4	+36 \pm 5	-15 \pm 4	-35 \pm 5
Direct effect on ALP activity	+5 \pm 2	+3 \pm 1	-2 \pm 0.5	+3 \pm 1.5

La modulation de l'APAL dans les cellules tumorales par la présence des extraits et/ou drogues cytotoxiques utilisés dans le présent travail apparaît comme certaine. Ceci est particulièrement vrai pour l'extrait de Nigelle et de la vincristine qui montrent une corrélation entre l'effet antiprolifératif et la stimulation de l'APAL intracellulaire dans les deux lignées tumorales P815 et BSR utilisées (Tableau VII et VIII). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui évoquent que lorsque les cellules cancéreuses sont stressées par la présence des drogues cytotoxiques, l'APAL intracellulaire augmente [13, 15,16]. En revanche, l'effet répresseur du Carvacrol comme celui de l'huile essentielle de thym sur l'APA intracellulaire est un résultat nouveau, jamais détecté ou signalé auparavant lors de la stimulation ou l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales. La possibilité de l'implication de cette enzyme dans le contrôle prolifératif/antiprolifératif des cellules tumorales, soulève une fois de plus le rôle central que pourrait jouer cette activité phosphatase alcaline dans le développement du cancer.

Références

- [1]. Hazzit M., A. Baaliouamer, A.R. Verissimo, M.L. Faleiro & M.G. Miguel. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.* 2009.
- [2]. Meister A., G. Bernhardt, V. Christoffel & A. Buschauer. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.* 1999, 65, 512-516.
- [3]. Essawi T. & M. Srour. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2000, 70, 343-349.
- [4]. Amarti F., B. Satrani, A. Aafi, M. Ghanmi, A. Farah, M. Aberchane, M. El Ajjouri, S. El Antry & A. Chaouch. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, 2008, 6, 342-347.
- [5]. Amarti F., B. Satrani, M. Ghanmi, A. Farah, A. Aafi, A. Lotfi, M. El Ajjouri & A. Chaouch. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et *Thymus ciliatus* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010, 14 (1), 141-148.
- [6]. Brasseur T. Études botaniques, phytochimiques et pharmacologiques consacrées au thym. *J. Pharm. Belg.*, 1983, 38, 123-143.
- [7]. Ismaili H., S. Tortora, S. Sosa, S. Fkih-Tetouani, A. Iidirisi, R. Della Loggia, A. Tubaro & R. Aquino. Topical anti-inflammatory activity of *Thymus wilddenowii*. *J. Pharma. Pharmacol.*, 2001, 53, 1645-1652.
- [8]. Ait M'Barek L, H. Ait Mouse, A. Jaafari, R. Aboufatima, A. Benharref, M ; Kamal, J. Benard, N. Elabbadi, M. Bensalah, A. Gamouh, A. Chait, A. Dalal and A. Zyad. Cytotoxic effect of essential

- oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* . 2007, 40: 1537-1544.
- [9]. Jaafari A, Ait Mouse H, Ait M'Barek L, Tilaoui M, Elhansali M, Lepoivre M, Aboufatima R, Melhaoui A, Chat A, Zyad A: Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonettii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction. *Herba polonica* 2009, 55: 36-50.
- [10]. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* 2007, 28: 233-239.
- [11]. Yun Luo, Wu JY, Lu MH, Shi Z, Na N, Di JM. Carvacrol Alleviates Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration, And Invasion through Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 5: 1-11.
- [12]. Elango B, Natarajan S, Dornadula S, Kannan K, Sivanesan SD, Palanisamy R, Kunka M R: Carvacrol induced mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *European Journal of Pharmacology* 2016, 772: 92-98.
- [13]. Tsai LC, Hung MW, Chen UH, Su WC, Chang GG, Chang TC. Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Biochem*. 2000, 267: 1330-1339.
- [14]. Feldbush TL, Lafrenz D. Harry S. Truman Hôpital mémorial des anciens combattants, Columbia, Missouri. *J immunol*.1991 Dec 1; 147(11):3690-5
- [15]. Chang TC, Wang JK, Hung MW, Chen UH, Chiao CH, Tsai LC, Chang GG: Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line. *Biochem J*. 1994, 303: 199-205.
- [16]. Sadeghirizi A, Yazdanparast R: Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from *Dendrostellera lessertii*. *Acta Biochimica Polonia* 2007, 54: 323-329.
- [17]. Yamamoto, KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet*. 1985, 19: 209-252.
- [18]. Majeska, RJ, Nair, BC and Rodan, GA. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology* (Baltimore) 1985; 116, 170-179
- [19]. Chou, JY, and Takahashi S. Control of placenta alkaline phosphatase expression in HeLa cells: induction of synthesis by prednisolone and sodium butyrate. *Biochemistry*. 1987; 26: 3596-3602.

**Cytotoxic effect of thyme essential oil and *Nigella saliva* L extract on P815 and BSR cancer cells:
Correlation with alkaline phosphatase expression**

Article juin 2018

Cytotoxic effect of thyme essential oil and *Nigella saliva* L extract on P815 and BSR cancer cells: Correlation with alkaline phosphatase expression

Houda AYAD and Nouredine ELABBADI¹.

Abstract— The anti-tumour effect of thyme (*Thymus broussonetii*) essential oil and black-seed (*Nigella saliva* L) ethyl acetate extract were first investigated *in vitro* using P815 and BSR cancer cell lines. The IC₅₀ values ranging from 4 - 5 mg/ml for BSR cells and from 9 - 11 mg/ml for P815 cells, showed a slight sensitivity of the BSR cell line to the extracts. Carvacrol exhibited IC₅₀ value of 200 ± 10 µM for P815 while vincristine (positive control) showed values IC₅₀ = 4 ± 0.2 µM and 7 ± 0.25 µM for P815 and BSR cell lines, respectively. Analysis of ALP activity shows a clear increasing of this enzyme expression when the cancer cells (BSR and P815) were treated by vincristine or by *Nigella* extract. Conversely, thyme essential oil and carvacrol substantially reduced the expression of ALP activity. Therefore, our findings highly suggest that the repression of ALP activity by thyme essential oil and carvacrol, one of its major components, could be responsible for the regulation of P815 and BSR cancer cell growth. This study supplies new information on the possible mechanistic and a target by which thyme essential oil and pure carvacrol exert their effect on P815 and BSR cancer cells.

Keywords: *Nigella* extract, Thyme essential oil, P815, BSR, carvacrol; anti-proliferative, alkaline phosphatase, modulation

1 INTRODUCTION

In last decade, the investigation in medicinal plants and their pharmacological active derivatives has increased, in order to find new safe and potent drugs against cancer which continue to be a worldwide killer. Plant derived substances have recently become of great interest owing to their versatile applications [1], [2].

Plants *Thymus broussonetti* and *Nigella saliva* L. (Ranunculaceae family) has been employed for thousands years in traditional medicine. The pharmacological investigations of *Nigella saliva* L (black-seed or black cummin) extracts reveal a broad spectrum of activities including immunopotentiality, anti-histaminic, antidiabetic, anti-hypertensive, anti-inflammatory, and antimicrobial [3], [4], [5], [6]. Many of these activities have been attributed to the quinone constituents of the black-seed [7], [8]. Antitumor activity of some crude and purified components of *N. sativa* on Erlich ascites carcinoma, Dalton's ascites lymphoma and sarcoma 180 cells *in vitro* and *in vivo* has been reported previously [9], [10], [11]. Purified components from black-seed, thymoquinone and dithymoquinone, were cytotoxic to all cell lines, including parental and multidrug-resistant phenotype-expressing cells [9], and their action on the cell death in human colorectal cancer cells seems to be correlated with G1 phase arrest of the cell cycle, leading to apoptosis process [12].

The essential oil of thyme has also a wide spectrum of pharmacological properties, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antispasmodic and antioxidant activities [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20]. We have previously shown that a crude extract (essential oil) of thyme and one of its major component, carvacrol, are capable of reducing the *in vitro* proliferation rates of human cancer lines, ovarian adenocarcinoma cell sensitive or resistant to chemotherapy [21], MCF7, and

murine mastocytoma cell line (P815) [22]. Furthermore, we have also shown that black-seed extract, thyme essential oil as well as carvacrol, were effective inhibiting tumour growth and delaying mortality of tumour-bearing animal DBA2 (H2d) mice model [11], [21], [22].

The aberrant expression of Alkaline Phosphatase (ALP) activities in cancer cells has led to the suggestion that ALP isoenzymes may be involved in tumour development [23]. In general, the level of ALP activities in drug treated cancer cells was enormously enhanced with a concomitant reducing the proliferation rates [24], [25].

Based on provided information, the aim of this investigation is to evaluate whether these natural product extracts as well as carvacrol (one of major component of thyme essential oil) have anticancer activity and whether this activity is correlated to the modulation of ALP activity in tumour cell lines (P815 and BSR) used in the present study.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), and penicillin-neomycin were purchased from Sigma Chemical Co., Saint Quentin, France. The non adherent murine mastocytoma cell line (P815) as well as the adherent kidney carcinoma cell line of hamsters (BSR) were kindly provided by Prof. G. Lemaire, Institute of Biochemistry, University of Paris XI, France.

2.2 Preparation of plant extracts [11], [21].

Nigella ethyl acetate extract: (One kilogram *N. sativa* L. seeds was washed, dried, and crushed to a powder with an electric micronizer. The powder was exhaustively extracted with 90% ethanol at room temperature and the extract was centrifuged at 10,000 g for 15 min to remove residual solid debris. The clear supernatant was then concentrated under reduced pressure. The concentrated extract was partitioned between 10% methanol-water and n-hexane. After removing the n-hexane fraction, the aqueous layer was partitioned again with ethyl acetate.

Thyme essential oil extract: *Thymus broussonetti* was freshly collected in Akrach (the region of Rabat-Zeir, Morocco). The volatile essential oil of thyme (EOT) was prepared from dried leaves and stems using the hydro-distillation method. The essential oil was then collected after evaporation of the solvent (petroleum ether) under vacuum and stored at 4°C.

2.3 Cell lines

Cell lines were routinely cultured in complete medium RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Sergy Pontoise, France), 1% penicillin-neomycin and 2% L-glutamine (complete medium). The cell viability and their morphology were examined by optic microscopy and then after the cell number were quantified by using Malassez lame for each experiment. BSR adherent cell line was first trypsinized before counting cell number.

2.4 Cellular chemosensitivity measurement

MTT assay [26]: Adherent cells (BSR) were plated out in 100 µl of complete medium at a concentration of 10⁴ cells per ml and allowed to attach and grow for 24 h. 100 µl of medium containing vincristine, extracts or pure carvacrol at appropriate concentrations were then added to the cell culture. After 48 h incubation in a humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, 100 µl of medium was carefully removed from each well and replaced with 20 µl MTT solution (5 mg/ml PBS). After 4 h incubation under the same conditions, the cleavage of MTT to formazan by metabolically active cells was quantified by scanning the plates at 540 and 630 nm using multi-scan apparatus. The means of three independent assays was determined to analyze the effect of drug on cancer cell line (BSR) growth. The growth inhibition rate was evaluated as percentage of parallel negative controls as follows: [(Acontrol - Aexperiment)/Acontrol] × 100.

For the non adherent cell line, 100 µl of cultured cells (5 × 10⁴ cells per ml) were plated out in flat-bottomed 96-well microtiter plates. 100 µl of medium containing vincristine, extracts or pure carvacrol at appropriate concentrations were then added immediately and plates were incubated for 48 h. Then 100 µl of medium was carefully removed from each well and replaced with 20 µl MTT solution (5 mg/ml PBS). After 4 h incubation under the same conditions, the cleavage of MTT to formazan by metabolically active cells was quantified by scanning the plates at 540 and 630 nm using multi-scan appa-

ratus.

2.5 Determination of alkaline phosphatase (ALP) activity.

The cells (10⁵ cells per ml) were seeded in triplicate into culture dishes (final volume 6 ml) and incubated for 48 h in the presence of extracts or compounds at indicated concentrations. The ALP enzymes were solubilised as described previously [Chang et 1994] [24]. Briefly, the cells from each culture dishes (6 ml final volume) were washed with PBS by using centrifugation technique at 7000 × g for 15 min. The cells were mixed with 0.5 ml of the re-suspension buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl pH 8) and then solubilised by adding triton X-100 to a final concentration of 1%. After 20 min, the cell-free supernatant was obtained by centrifugation at 12000 × g for 15 min. The ALP activity was carried out by using 5 mM p-nitrophenyl phosphate in bicarbonate buffer (50 mM HCO₃⁻, 0.5 mM MgCl₂, pH 10) in total volume of 1 ml [27]. The reaction mixture was incubated for 2 h at 37°C and then stopped by adding 1 ml of 0.4 M NaOH. ALP activity was expressed as micromoles of p-nitrophenol produced per minute per 10⁶ cells or as percentage of control.

3 RESULTS

3.1 *In vitro* cytotoxicity

The effect of ethyl acetate extract, thyme essential oil and carvacrol was first evaluated against two cancer cell lines: adherent tumour cells BSR and non adherent tumour cells P815, by MTT assay. Vincristine was used as positive control. As shown in fig. 1(a,b), a dose dependent decrease in the growth of P815 as well as BSR was obtained with increasing concentrations of extracts. The concentrations of *Nigella* ethyl acetate extract (Figure 1) leading to 50% of the lytic activity (IC₅₀) were evaluated to be 9.5 ± 0.45 mg/ml and 4.5 ± 0.2 mg/ml for P815 and BSR, respectively. Also the thyme essential oil showed similar cytotoxicity (IC₅₀) which was evaluated to be 11 ± 0.4 mg/ml and 4 ± 0.23 mg/ml for P815 and BSR, respectively. Parallel, The anti-proliferative activity of vincristine on both P815 and BSR, as well as that of carvacrol on P815, were also evaluated by MTT assay in similar conditions. The IC₅₀ was evaluated to be 200 ± 10 µM for carvacrol on P815 cancer cell line, which is in agreement with those found previously on chronic myeloid leukemia K562 cells [28]. As control positive, the IC₅₀ for vincristine was found to be 4 ± 0.2 µM as previously reported for leukemic cell lines, CEM, HL60, U937 and K562 [29].

In order to determine whether there is a relationship between the observed cytotoxic effect and the expression of ALP activity, we used extracts and carvacrol as well as vincristine at the IC₅₀ concentrations shown in (Table 1).

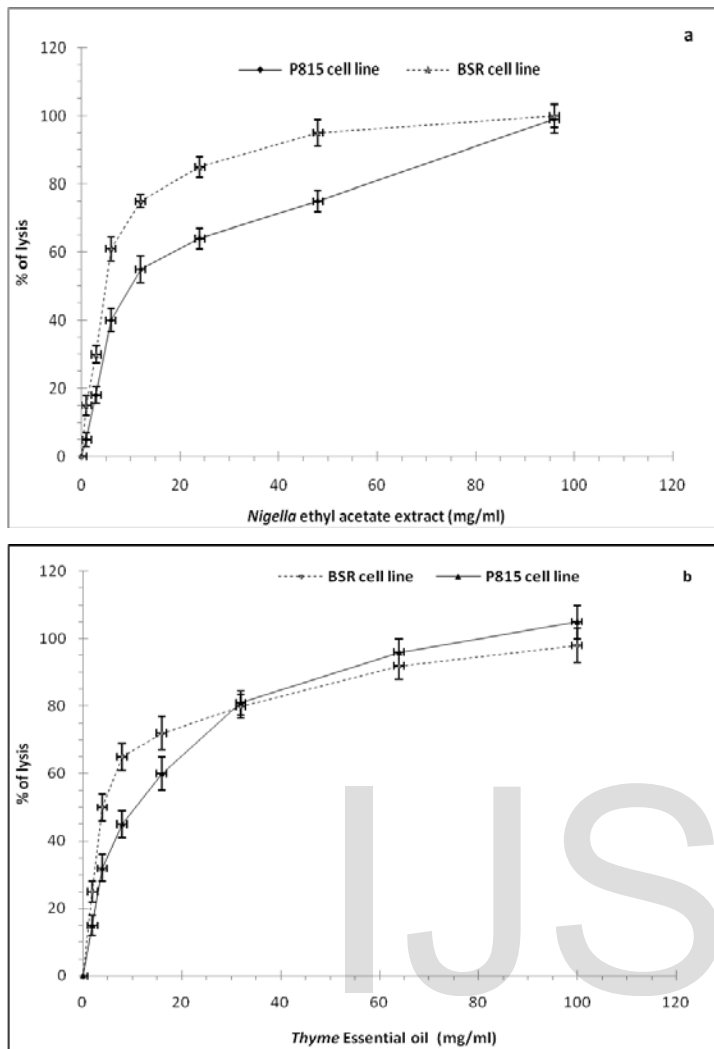


Fig 1. Effect of carvacrol on both BSR and P815 cancer cell growth. Cell lines (10^4 cells/ml) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of Nigella ethyl acetate extract (a) or Thyme essential oil (b) at various concentrations. Then the cell growth was evaluated by using the MTT assay as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

Table 1. Cytotoxic activity of extracts and compounds on different cell lines expressed as the concentration providing 50% inhibition (IC_{50}).

Cell lines	Nigella extract (mg/ml)	Thyme essential oil (mg/ml)	Vincristine (μ M)	Carvacrol (μ M)
P815	9.5 ± 0.45	11 ± 0.4	4 ± 0.2	200 ± 10
BSR	4.5 ± 0.2	4 ± 0.23	7 ± 0.25	-

3.2 Effect on both cell growth and intracellular ALP activity.

Experiments were carried out by incubation cells (P815 or BSR) in 6-well culture plates (final volume of 6 ml, 10^5 cells/ml) for 48 h in the presence of different compounds or extracts at concentrations corresponding to their IC_{50} (see Methods section). The cell viability and their morphology were examined by optic microscopy and then after the cell number were quantified by using Malassez lame for each experiment. Then the solubilised cell extract was prepared and the ALP activity was determined as described in the methods section. By using cell counting by optic microscopy, the IC_{50} previously determined by the MTT assay (Table 1) give almost the same percentage inhibition of cancer cell lines (Table 2).

Table 2. Effect of extracts and compounds on both P815 cell viability and intracellular ALP activity. P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 6-well culture plates for 24 h. The cells were then treated with extracts or compounds at the indicated concentrations for 48 h. The cells were collected, counted and washed with PBS. Then the solubilised extract was prepared and the enzyme activities were determined as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D

P815 % of control	Vincristine (7 μ M)	Nigella extract (9.5 mg/ml)	Thyme essential oil (11 mg/ml)	Carvacrol (200 μ M)
Cell number	-45 ± 4	-52 ± 7	-48 ± 5	-55 ± 5
ALP activity After 48 h	$+66 \pm 8$	$+46 \pm 5$	-40 ± 5	-60 ± 7
Direct effect on ALP activity	-4 ± 2	-3 ± 2.5	$+2 \pm 0.5$	$+4 \pm 2$

Analysis of intracellular solubilised ALP activity shows clearly that this enzyme activity was enhanced significantly when the cells were treated by vincristine (+66%) or by Nigella extract (+46%), and at the same time, cell proliferation is inhibited. The abnormal increasing proportion of ALP was thought to be resulting from P815 cell stress reaction as reported previously [24], [25], [30]. Conversely, both thyme essential oil and one of its major component carvacrol were able to reduce the P815 growth cells and substantially reduced the expression of ALP activity by 40% and 60%, respectively. These results clearly indicate that the inhibition of P815 cell growth by thyme essential oil as well as by carvacrol (at IC_{50}) was not correlated to the high expression of ALP activity in response to the toxic effects as usually reported for many anticancer agents [24], [25], [30]. There was not significant direct effect on ALP (Table 2). Similar experiments were carried out on the adherent cancer cell line (BSR). All extracts and pure compounds used at their IC_{50} were able to reduce significantly the cell growth (Table 3). This decrease in cell proliferation is accompanied by an increase in intracellular ALP activity in the case of Nigella ethyl acetate extract and vincristine treatment. On the other hand, thyme essential oil and carvacrol shows a slight nega-

tive effect, but significant, on intracellular ALP activity, as for P815 cell line determined above. Also there was not direct effect on the solubilised ALP activity (Table 3).

Table 3. Effect of extracts and compounds on both BSR cell viability and intracellular alkaline phosphatase activity. BSR cells (10^5 /ml) were cultured in 6-well culture plates for 24 h. The cells were then treated with extracts or compounds at the indicated concentrations for 48 h. The cells were trypsinized, collected, counted and washed with PBS. Then the solubilised extract was prepared and the enzyme activities were determined as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D

BSR % of control	Vincristine (7 μ M)	Nigella extract (9.5 mg/ml)	Thyme essential oil (11 mg/ml)	Carvacrol (200 μ M)
Cell number	-51 \pm 5	-47 \pm 7	-52 \pm 5	-55 \pm 5
ALP activity After 48 h	+45 \pm 4	+36 \pm 5	-15 \pm 4	-35 \pm 5
Direct effect on ALP activity	+5 \pm 2	+3 \pm 1	-2 \pm 0.5	+3 \pm 1.5

4 DISCUSSION

Based on our previous investigation, the *in vitro* effect of essential oil of *Thymus broussonetti* as well as extracts of *N. sativa* L. seeds were found to exert a significant degree of cytotoxicity against various tumor cell lines. Furthermore, we have also shown that these extracts were able to reduce significantly the tumour growth and delaying mortality of tumour-bearing animal DBA2 (H2d) mice model [11], [21]. It was proposed, owing to their lipophilic nature, that plant oil volatile appears to accumulate in the microbe cell membrane and increase their permeability, resulting in leakage (outflow) of enzymes and metabolites [31], [32]. Recent study suggests that tumour-derived ALP regulates tumour growth in advanced prostate cancer [33]. Nevertheless, the coupling mechanism between proliferative or anti-proliferative effects of thyme essential oil as well as ethyl-acetate Nigella extract and the intracellular target is not known and may differ in different cell lines. Thus, we investigate the effect of these extracts and carvacrol, one of the major components of plant *Thymus broussonetti* essential oil, on the growth pattern of P815 and BSR cells and the intracellular ALP expression.

All extract fractions used here exhibited a significant cytotoxic effect against the tumour cell lines (P815 and BSR) confirmed by both methods, MTT test and by cell count (Table 1 and 2). Our results agree with previous research in which the Nigella ethyl acetate fraction as well as thyme essential oil were found to exhibit a strong growth inhibitory effect on all malignant cells tested [11], [21].

Interestingly, we report here for the first time, that the cytotox-

ic effect of these extracts and pure compounds used is related not only to the intracellular ALP expression but also to the nature of the tumour cell lines. In fact, The intracellular ALP activity was enhanced when the P815 as well as BSR cells were treated by vincristine (positive control) and Nigella ethyl acetate extract and this enhancement was accompanied by a significant decrease in the cell number, which is in full agreement with the literature data concerning the induction of ALP expression correlates well with the growth inhibition pattern of cancer cells under the influence of different cytotoxic agents [24], [25], [29]. On the other hand, The intracellular ALP activity behaved differently when the P815 and BSR cells were treated by thyme essential oil and pure carvacrol, showing a significant repression of intracellular ALP activity with a concomitant high decreasing cell number (Table 2 and 3). Therefore, our findings highly suggest that the repression of ALP activity by thyme essential oil and carvacrol, one of its major components, could be responsible for the regulation of P815 and BSR cancer cell growth. It has been reported that carvacrol showed an anti-cancer effect, mainly by inducing apoptosis phenomenon [22], [34], [35], [36] and in that regard it would be of great interest to know whether ALP activity is involved in the modulation of cancer cell growth.

5 CONCLUSION

In the present study, we found out, that thyme essential oil and one of its major components, carvacrol, have an anti-proliferative effect resulting in inhibition of P815 and BSR cell growth. Furthermore, this inhibition of cell growth seems to be correlated to the negative modulation of ALP activity. This study supplies new information on the possible mechanistic and a target by which thyme essential oil and pure carvacrol exert their effect on P815 and BSR cancer cells.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof. Geneviève le Lemaire (University of Paris XI, Orsay, France) for her gift of the P815 and BSR cell lines.

7 REFERENCES

- [1] O. Baris, M. Gulluce, F. Sahin, H. Ozer, H. Kilic, H. Ozkan, M. Sokmen and T. Ozbek, "Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* afan (Asteraceae)", Turkish Journal of Biology, vol. 30, pp.65-73, 2006.
- [2] A. Khan, A. Ahmad, N. Manzoor and L. A. Khan, "Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules", Natural Product Communications, vol. 5, no. 2, pp. 345-349, 2010.
- [3] R. Medinica, S. Mukerjee, T. Huschart and W. Corbitt W, "Immunomodulatory and anticancer activity of *Nigella sativa* plant extract in humans", Proceedings

- of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, pp. A2865, 1994.
- [4] A. Al-Hader, M. Aqel and Z. Hassan, "Hypoglycaemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa*", *Int. J. Pharmacognosy*, vol. 31, pp. 96-100, 1993.
- [5] K. E. El Tahir, M. M. Ashour and M. M. al-Harbi, "The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action", *Gen. Pharmacol.*; vol. 24, pp. 1123-1131, 1993.
- [6] P. J. Houghton, R. Zarka, B. de las Heras and J. R. Hoult, "Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation", *Planta Med.*, vol 61, pp. 33-36, 1995.
- [7] M. Mahfouz and M. El-Dakhkhny, "The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds", *Pharm. Sci. United Arab Rep.*, vol. 1, pp. 19, 1960.
- [8] B. H. Ali and G. Blunden, "Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*", *Phytother. Res.*, vol. 17, pp. 299-305, 2003.
- [9] M. J. Salomi, S. C. Nair and K. R. Panikkar, "Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice", *Nutr. Cancer*, vol. 16, pp. 67-72, 1991.
- [10] S. M. K. Swamy and B. K. H. Tan, "Extraction, isolation and characterization of anti-tumor principle, alpha-Hederin, from the seeds of *Nigella sativa*", *Planta Medica*, vol. 67, pp. 29-32, 2001.
- [11] L. Ait M'Barek, H. Ait Mouse, N. ElAbbadi, M. Bensalah, A. Gamouh, R. Aboufatima, A. Benharref, A. Chait, M. Kamal, A. Dalal and A. Ziad, "Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, pp. 839-847, 2007.
- [12] H. Gali-Muhtasib, M. Diab-Assaf, C. Boltze, J. Al-Hmaira, R. Hartig, A. Roessner, and R. Schneider-Stock, "Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism" *Int. J. Oncol.*; vol. 25, no. 4, pp. 857-866, 2004.
- [13] K. G. Lee and T. Shibamoto, "Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices", *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 50, pp. 4947-4952, 2002.
- [14] M. M Gottesman and I. Pastan, "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter", *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 62, pp. 385-427, 1993.
- [15] N. Thuille, M. Fille and M. Nagl, "Bactericidal activity of herbal extracts", *Int. J. Hyg. Environ. Health*; vol. 206, pp. 217-221, 2003.
- [16] M. Valero and M. C. Salmeron, "Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth", *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 85, pp. 73-81, 2003.
- [17] S. Dragland, H. Senoo, K. Wake, K. Holte and R. Blomhoff, "Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants" *J. Nutr.*, vol. 133, pp. 1286-1290, 2003.
- [18] D. Kalemba and A. Kunicka, "Antibacterial and antifungal properties of essential oils", *Curr. Med. Chem.*, vol. 10, pp. 813-829, 2003.
- [19] S. A. Burt and R. D. Reinders, "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7", *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 36, pp. 162-167, 2003.
- [20] M. Fan and J. Chen, "Studies on antimicrobial activity of extracts from thyme", *Wei Sheng Wu Xue Bao*, vol. 41, pp. 499-504, 2001.
- [21] L. Ait M'Barek, H. Ait Mouse, A. Jaafari, R. Aboufatima, A. Benharref, M. Kamal, J. Benard, N. Elabbadi, M. Bensalah, A. Gamouh, A. Chait, A. Dalal and A. Ziad, "Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, pp. 1537-1544, 2007.
- [22] A. Jaafari, H. Ait Mouse, L. Ait M'Barek, M. Tilaoui, M. Elhansali, M. Lepoivre, R. Aboufatima, A. Melhaoui, A. Chat and A. Ziad, "Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonettii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction", *Herba polonica*, vol. 55, pp. 36-50, 2009.
- [23] L. C. Tsai, M. W. Hung, U. H. Chen, W. C. Su, G. G. Chang GG and T. C. Chang TC, "Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells", *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, pp. 1330-1339, 2000.
- [24] T. C. Chang, J. K. Wang, M. W. Hung, U. H. Chen, C. H. Chiao, L. C. Tsai and G. G. Chang, "Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line", *Biochem. J.*, vol. 303, pp. 199-205, 1994.
- [25] A. Sadeghirizi and R. Yazdanparast, "Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from *Dendrostellera lessertii*", *Acta Biochimica Polonia*, vol. 54, pp. 323-329, 2007.
- [26] J. A. Plumb, R. Milroy, S. B. Kaye, "Effects of pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay", *Cancer Research*, vol. 49, pp. 4435-4440, 1989.
- [27] I. Koyama, Y. Sakagishi and T. Komoda, "Different lectin affinities in rat alkaline phosphatase isoenzymes: multiple forms of iso-enzymes isolated by heterogeneities of sugar moieties", *J. Chromatogr.*, vol. 374, pp. 51-59, 1986.
- [28] A. Ravi, M. Alvala, V. Sama, A. M. Kalle, V. K. Irlapati and B. M. Reddy, "Anticancer activity of *Pupalia lappacea* on chronic myeloid leukemia K562 cells", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 20, pp. 86, 2012.
- [29] W. C. Su, S. L. Chang, T. Y. Chen, J. S. Chen and C. J. Tsao, "Comparison of In Vitro Growth-inhibitory Ac-

- tivity of Carboplatin and Cisplatin on Leukemic Cells and Hematopoietic Progenitors: the Myelosuppressive Activity of Carboplatin May Be Greater Than Its Antileukemic Effect", *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 30, pp. 562-567, 2000.
- [30] H. Sadeghi and R. Yazdanparast, "Effect of *Dendrostellera lessertii* on the intracellular alkaline phosphatase activity of four human cancer cell lines" *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 86, pp. 11-14, 2003.
- [31] M. Bard, M. R. Albrecht, N. Gupta, C. J. Guynn and W. Stillwell, "Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*", *Lipids*; vol. 23, pp. 534-538, 1988.
- [32] J. Sikkema, J. A. de Boont, B. Poolman, "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons", *Microbiol. Rev.*, vol. 59, pp. 201-222, 1995.
- [33] S. R. Rao, A. E. Snaith, D. Marino, X. Cheng, S. T. Lwin, I. R. Orriss, F. C. Hamdy, C. M. Edwards, "Tumour-derived alkaline phosphates regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer", *British Journal of Cancer*, vol. 116, pp. 227-236, 2017.
- [34] A. T. Kopalal and M. Zeytinoglu, "Effects of carvacrol on a human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cell line, A549", *Cytotechnology*, vol. 43, pp. 149-154, 2003.
- [35] Q. H. Yin, F. X. Yan, X. Y. Zu, Y. H. Wu, X. P. Wu, M. C. Liao, S. W. Deng, L. L. Yin and Y. Z. Zhuang, "Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2", *Cytotechnology*, vol. 64, no. 1, pp. 43-51, 2011.
- [36] B. Elango, S. Natarajan, S. Dornadula, K. Kannan, S. D. Sivanesan, R. Palanisamy and M. Runka, "Carvacrol induced mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells", *European Journal of Pharmacology*, vol. 772, pp. 92-98, 2016.

AUTHOR DETAILS:

Corresponding author:

Professor Nouredine ELABBADI¹
Laboratory of Natural Substances,
Cellular and Molecular Immunopharmacology
Sultan Moulay Slimane University
Faculty of Sciences and Technologies
Box 523, Beni-Mellal, Morocco
E-mail: noureddineelabbadifst@yahoo.com
Mob. :00 212 602041124

First author Houda AYAD, PhD student
Laboratory of Natural Substances,
Cellular and Molecular Immunopharmacology
Sultan Moulay Slimane University
Faculty of Sciences and Technologies
Box 523, Beni-Mellal, Morocco
E-mail: houdaayadfst@yahoo.com

IJSER

5.2. Effet prolifératif et antiprolifératif du Carvacrol, composé majoritaire de l'huile essentielle de thym : Corrélation avec l'expression intracellulaire de la phosphatase alcaline.

Biphasic effect of carvacrol on cell growth of murine mastocytoma cancer cells (P815) and its negative modulation on alkaline phosphatase activity

(Article soumis, voir ci dessous)

(Communications orales et par affiches, voir ci-après)

L'inhibition de l'activité phosphatase alcaline (APAL) par le Carvacrol, à faible concentration, est corrélée avec la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses P815 Tableau IX et Figure 18 [AYAD H *et al.* 2016 *ci-après*].

Table IX. Effect of carvacrol on both P815 cell viability and intracellular alkaline phosphatase activity. P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 6-well culture plates for 24 h. The cells were then treated with carvacrol at the indicated concentrations or with cisplatin (2 μ M) for 48 h. The cells were collected, counted, washed with PBS. Then the solubilised extract was prepared and the enzyme activities were determined as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

	Cisplatin (2 μM)	Carvacrol	
		(200 μM)	(2 μM)
Cell number variation (% of control)	- 45 \pm 9	- 59 \pm 6	+ 140 \pm 5
Alkaline phosphatase activity (% of control)	+ 165 \pm 12	- 68 \pm 5	- 60 \pm 7

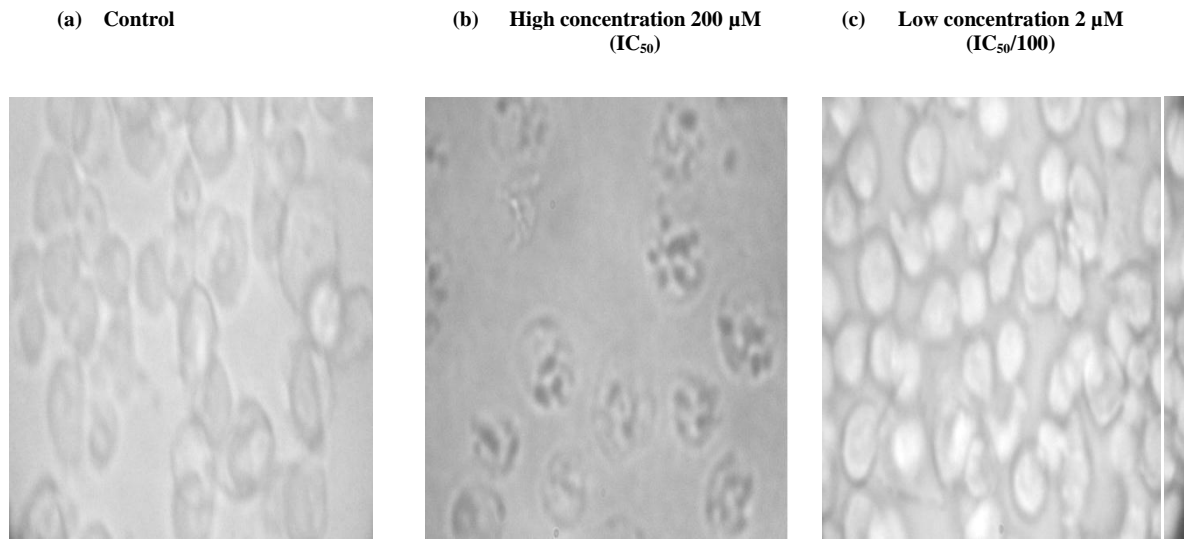


Figure 18 Effect of carvacrol at various concentration on P815 cell viability and morphology after 48 hours of incubation. Murine mastocytoma cell line (10^5 cells/ml) were incubated in 6-well culture plates in the presence of carvacrol at high concentration 200 μ M (b) and low concentration 2 μ M (c). After 48 h, the morphology of the cells was examined using a light microscope. The results represent a typical experiment.

Le même phénomène a pu être observé dans les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (PBMC) avec une sensibilité moindre (7 fois moins sensible) (Figure 19).

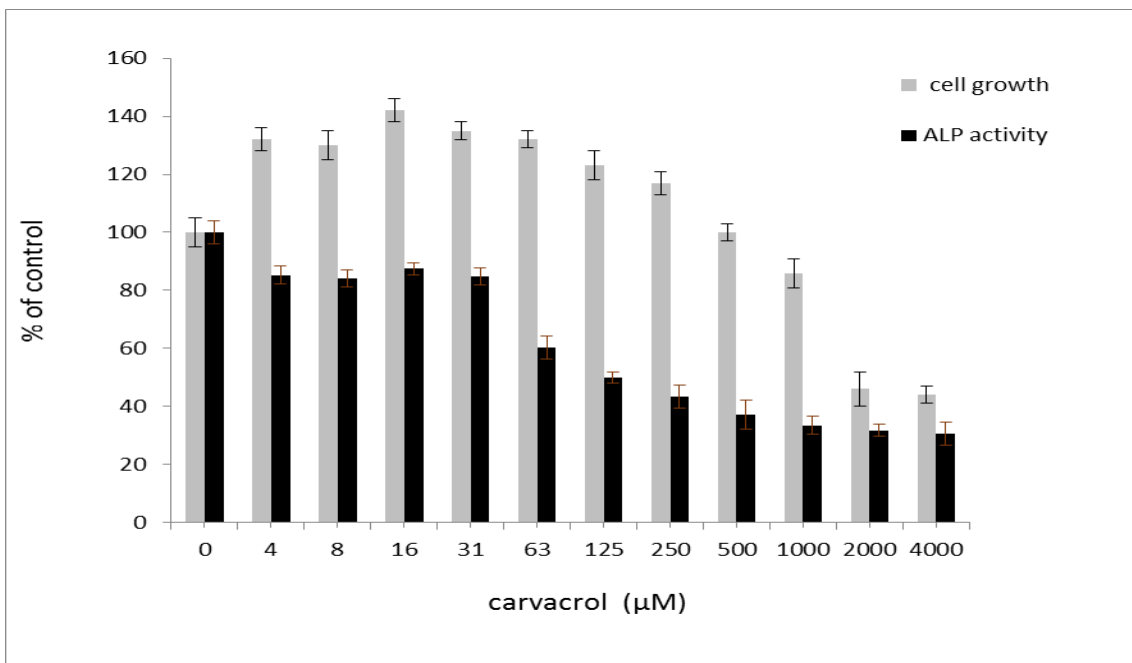


Figure 19. Effect of carvacrol on both cell growth and intracellular alkaline phosphatase activities in PBMC. PBMC cells (10^5 /ml) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of carvacrol at various concentrations. Then the cell growth and the intracellular ALP activities were measured by using the MTT assay and ALP assay, respectively, as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

Les effets observés après 24 à 48h d'incubation, cycle cellulaire, suggère fortement une régulation/inhibition au niveau de la transcription des gènes codant pour la ou les phosphatases alcalines (PAL) dans les cellules cancéreuses P815. Pas d'effet inhibiteur direct du Carvacrol sur l'APAL préparée à partir des cellules P815. Cet effet prolifératif observé du Carvacrol sur la lignée P815 avec la baisse considérable (-70%) de l'APA intracellulaire est un résultat nouveau, jamais détecté ou signalé auparavant lors de la stimulation ou l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales. Cet effet prolifératif qui apparaît concomitant à l'effet répressur du Carvacrol sur l'APAL, suggère que lorsque cette activité enzymatique est réprimée les cellules tumorales P815 prolifèrent mieux. Contrairement aux extraits ou drogues cytotoxiques qui montrent une corrélation entre l'effet antiprolifératif et l'augmentation de l'APAL

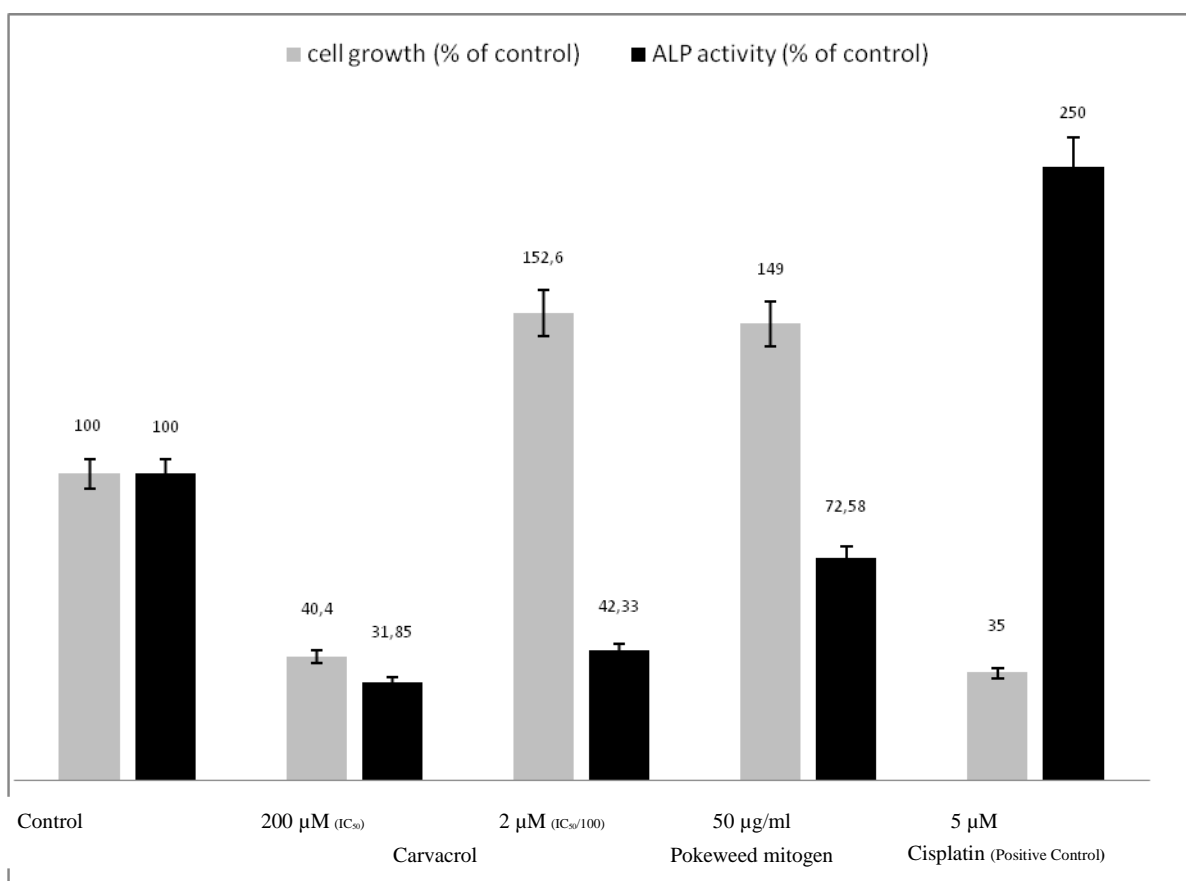


Figure 20. Effect of carvacrol and pokeweed mitogen on P815 cell growth and intracellular alkaline phosphatase activity. P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 6-well culture plates for 24 h. The cells were then exposed to carvacrol, pokeweed growth factor or cisplatin at the indicated concentrations for 48 h. The cells were collected, counted and washed with PBS. Then the ALP activity was determined in the TX-100 solubilised fraction as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

De plus, l'effet du Carvacrol à faible dose apparait similaire à celui obtenu par action de l'agent mitogène pookweed (facteur de croissance) utilisé dans le présent travail. En effet, le pookweed stimule la prolifération des cellules cancéreuses P815 et au même temps réprime l'APA exactement comme le Carvacrol (Figure 20).

Le fait que le Carvacrol posséderait cette propriété mitogen-like, renforce notre approche expérimentale de base, et pourrait nous ouvrir une autre voie différente et nouvelle pour contrer ce fléau « cancer » qui ne cesse de proliférer. La caractérisation de la cible phosphatase alcaline, notamment l'isoforme concerné, et son implication probable dans le contrôle de la croissance cellulaire serait d'un atout considérable pour le développement de cette nouvelle approche thérapeutique.

**The 2nd Edition of the International Congress on Cancer in Beni Mellal (ICCBM'2),
May 19-21, 2016; Beni Mellal**

Communication orale

Modulation of Alkaline Phosphatase Activity in cancer cell line P815 by Carvacrol

H AYAD and all.

Laboratory of Biological Engineering team of Natural Substances and cellular & Molecular Immunopharmacology. Faculty of Sciences and Technologies, University Sultan Moulay Slimane, Postal Box 523, 23000 Beni-Mellal, Morocco

Abstract

The effect of pure Carvacrol, one of the major components of plant *Thymus broussonetti* essential oil, on the growth and alkaline phosphatase activities were examined in cultures of Mastocytome Murrin Immunogenic (P815) cell line. Using Carvacrol at low concentration (IC₅₀/100) reduce significantly the intracellular alkaline phosphatase activities with a concomitant increase in the P815 cell number up to +140%. However, Carvacrol at cytotoxic concentration 0.004v/v (IC₅₀) reduced significantly the cell growth by 60% as well as the intracellular alkaline phosphatase activities by 68%, indicating that the inhibition of cell growth by Carvacrol do not seem to involve ALP activity as usually observed for many cytotoxic agents. In addition, inhibitory effects of Carvacrol at lower concentration on the intracellular ALP activity with concomitant stimulation of cell proliferation also resembles to the effect of growth factor Pok], pointing out the major role of ALP in cell biology. The ALP activity was reduced gradually with increasing time of heat inactivation at 56°C, reaching a plateau after 10 min treatment, indicating the presence of at least two different isoenzymes in the solubilised cells, one heat-labile representing 60% of total ALP activity and the other more heat stable (40% of total ALP activity). The inactivation rate constant for Carvacrol-treated, Pok-treated, Cisplatin-treated and untreated P815 cells were found to be 0,175, 0,174, 0,087 and 0,175 min⁻¹, respectively. This may emphasize that the relationship between the enhancement growth P815 cells induced by both Carvacrol and growth factor Pok could mainly due to the repression of labile ALP form, pointing out the possible interest role of thermo-sensitive instable form ALP in P815 growth cells. Interestingly, the proportion of the ALP heat stable form was become higher in cisplatin treated cells than

those in untreated or Carvacrol- and Pok-treated cells. Therefore, the abnormal increasing proportion of thermo-stable ALP isoenzyme was thought to be resulting from stress reaction. In that regard, these criteria could be used as diagnostic tools for following the medical treatment of specific or general cancer cases

Keywords: *intracellular alkaline phosphatase, Carvacrol, P815, cancer cell, proliferative, regulation.*

**Biphasic effect of Carvacrol on cell growth of murine mastocytoma cancer cells (P815)
and its negative modulation on alkaline phosphatase activity**

Houda AYAD and all.

(Article soumis, voir ci-dessus)

Biphasic effect of carvacrol on cell growth of murine mastocytoma cancer cells (P815) and its negative modulation on alkaline phosphatase activity

Houda AYAD and all.

¹Laboratory of Natural Substances, Cellular and Molecular Immunopharmacology
Sultan Moulay Slimane University, Faculty of Sciences and Technologies
Box 523, Beni-Mellal, Morocco

Abstract

Background: Essential oils including carvacrol are becoming popular as naturally occurring bioactive agents. Despite many advances in research, not many literatures have explored the pharmacological effects of carvacrol on the stimulation of cancer cell growth. Here we find out, for the first time, that carvacrol induced proliferation of murine mastocytoma cancer cells (P815) as well as peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Methods: Proliferative and antiproliferative activity of carvacrol was determined by MTT assay using cisplatin as a positive control. The cell viability and their morphology were examined by optic microscopy and the cell number was quantified by using Malassez lame for each experiment. Phosphatase alkaline activity was measured by using p-nitrophenyl phosphate as substrat.

Results: Carvacrol stimulated the growth of P815 cancer cells (+ 160 %) at low concentrations (2 μ M) whereas at higher concentration (200 μ M) cell growth was inhibited. The stimulation of P815 by carvacrol at lower concentration was similar to that of pokeweed mitogen (PWM) and these proliferative effects seem to be correlated to the repression of intracellular ALP activity. However, the inhibition of P815 cell growth by carvacrol was not correlated to the high expression of ALP activity in response to the toxic effects as usually found for many anticancer agents. The observed effects were not specific for cancer P815 cells, since carvacrol similarly induced proliferation at low concentrations (\leq 250 μ M) and suppressed proliferation at higher concentrations (\geq 500 μ M) in cultured PBMC.

Conclusion: Present study demonstrates a clear biphasic effect of carvacrol on P815 cancer cells as well as on PBMC. Its tumour stimulation effect seems to be correlated to the negative modulation of alkaline phosphatase, contrary to its cytotoxic effect which is by means of apoptosis phenomenon.

Keywords: P815 cancer cells; PBMC, carvacrol, proliferation, biphasic effect, alkaline phosphatase



1 INTRODUCTION

Essential oils including a monoterpenoid phenolic phytochemical carvacrol (2-methyl-5-(1-methylehyl)-phenol) and their components are becoming popular as naturally occurring bioactive agents. Carvacrol which is abundant in the oil of thyme, oregano and peppermint [1] has been known to possess diverse medicinal values like antioxidant [2,3], anti-microbial effects [4-6], antifungal [7,8], analgesic, anti-inflammatory, antiviral, anti-angiogenic, anti-oxydant, anti-elastase, insecticidal, and anti-tumor activity [9-11]. It is also used as flavour agent in cosmetic and food productions.

Cytotoxic effect of carvacrol against cancer has been studied on various cell lines such as non-small cell lung cancer cells [12], hepato-

cellular carcinoma cells [13], human metastatic breast cancer cells [14] and chronic myeloid leukemia cells [15]. We have previously shown that a crude extract (essential oil) of thyme and one of its major component, carvacrol, are capable of reducing the *in vitro* proliferation rates of human cancer lines, ovarian adenocarcinoma cell sensitive or resistant to chemotherapy [16], MCF7, and murine mastocytoma cell line (P815) [17]. Furthermore, we have also shown that the thyme essential oil as well as carvacrol were effective inhibiting tumour growth and delaying mortality of tumour-bearing animal DBA2 (H₂^d) mice model [16,17].

Recent evidence highly suggests that many natural products prefer-

entially inhibit the growth of tumour cells by targeting one or more signalling cascades leading to induction of apoptosis [18]. Since the imbalance between cell proliferation and apoptosis are correlated with cancer progression, identifying proliferative or chemopreventive agents is of great importance. Besides, carvacrol was reported to have therapeutic potential for the treatment of prostate cancer through its inhibition of TRPM7 channels and suppression of PI3K/Akt and MAPK signalling pathways [19]. However, in leukemic cancer cells (HL-60 and Jurkat cells) carvacrol seems to induce apoptosis by mitochondria-mediated pathway through the involvement of caspase-3 [20].

The aberrant expression of Alkaline Phosphatase, [(ALP), orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.13.1.] activities in cancer cells has led to the suggestion that ALP isoenzymes may be involved in tumour development [21] and their expression can be modulated by steroid hormones [21-24] as well as a variety of agents: paclitaxel [25], cyclosporine A, octreotide, daunomycin, verapamil [26], dexamethasone, retinoic acid and phorbol 12-myristate 13 acetate [27]. Studying the regulation of the affected ALP activities may disclosed the mechanism of expression of these isoenzymes and their roles in cellular functions such as proliferation and anti-proliferation process. In general, the level of ALP activities in drug treated cancer cells was enormously enhanced with a concomitant reducing the proliferation rates [27,28]. ALP isoenzymes are widely distributed in prokaryote and eukaryote cells. Two forms of these enzymes exists: the insoluble membrane anchored proteins form, the glycosylphosphatidylinositol-linked membrane proteins, and the soluble form which believed to be released from the membrane in response to various physiological, chemical and physical stimuli. In humans, at least four distinct ALP isoenzymes were identified by genetic and biochemical analysis [21, 29]. The isoenzymes from placenta or intestine are relatively thermo-stable and specific in terms of their tissue expression. The thermo-labile isoenzyme characteristic for liver, bone and kidney is considerate as non specific-tissue and present in most cell types. The fourth isoenzyme is also heat-stable (placental-like form) and present at low levels in adult germ cells. The placental isoenzyme is of particular interest because of its increased incidence of ectopic or enhanced expression associated with some human cancers, malignant neoplasia such as a lung tumour, ovary tumour, seminoma, or hepatic tumour [21,30]. Recent study suggests that tumour-derived ALP regulates tumour growth in advanced prostate cancer [31].

Despite many advances in research, greater understandings of the pharmacological effects of carvacrol on the proliferation process of cancer cells have not yet been investigated. Therefore, we examined the effect of pure carvacrol on cell growth and on the intracellular ALP activity of P815. We find out, for the first time, that carvacrol, depending to its concentration, exerts differential effects on this cancer cell line. At low concentration (2 μM), carvacrol repression effect on intracellular ALP activities was associated with proliferative effect on cell growth. However, high carvacrol concentration (200 μM) inhibits P815 cell growth by mechanism that seems to involve apoptosis process but not through ALP activities. This study supplies new information on the possible mechanistic and a target by which carvacrol exert its biphasic effect on both P815 cancer cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

2. METHODS

Chemicals

Carvacrol, dimethylsulfoxide (DMSO), para-nitrophenylphosphate (PNPP), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), penicillin-neomycin and pokeweed mitogen were purchased from Sigma Chemical Co., Saint Quentin, France. The murine mastocytoma cell line (P815) was kindly provided by Prof. G. Lemaire, Institute of Biochemistry, University of Paris XI, France.

Cell culture and treatment

Cell lines were routinely cultured in complete medium RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Sergy Pontoise, France), 1% penicillin-neomycin and 2% L-glutamine. The cells (10^5 cells per ml) were seeded in triplicate into culture dishes (final volume 6 ml) and incubated at 37°C in an incubator with 5% CO₂. After 2 h, carvacrol, pokeweed mitogen or cisplatin at indicated concentrations was given to the cells for 48 h. Carvacrol (60 μl) was mixed first with 60 μl DMSO and then the vortex-mix was diluted further in RPMI culture medium to appropriate concentrations. The cell viability and their morphology were examined by optic microscopy and then after le cell number were quantified by using Malassez lame for each experiment.

PBMC preparation and treatment

Blood samples were collected from healthy young donors (volunteers). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation using Ficoll-based density gradient [32]. The white layer frac-

tion was transferred and washed twice with phosphate buffered solution (PBS) and then cytotoxicity of carvacrol on lymphocyte cells was carried out using MTT colorimetric assay as described below.

Measurement of cellular cytotoxicity

The methyl thiazole tetrazolium (MTT) test was used to determine the effect of the carvacrol on the growth of the murine mastocytoma cell line (P815) and PBMC [33]. Briefly, P815 cells or PBMC were washed twice with PBS and then incubated in 100 μ l of complete medium at a density of 10^5 cells/ml in flat-bottomed 96-well microtiter plates (Bioster, Bastia di Rovolon, Italy). Appropriate dilutions of carvacrol were first performed in 100 μ l of complete medium and then added to the cell culture. After 48 h incubation in a humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, 100 μ l of medium was carefully removed from each well and replaced with 20 μ l MTT solution (5 mg/ml PBS). After 4 h incubation under the same conditions, the cleavage of MTT to formazan by metabolically active cells was quantified by scanning the plates at 540 and 630 nm using multi-scan apparatus. The means of three independent assays was determined to analyze the effect of drug on PBMC and P815 cell growth. The growth inhibition rate was evaluated as percentage of parallel negative controls as follows: $[(A_{control} - A_{experiment})/A_{control}] \times 100$. Cisplatin was used as positive control.

Determination of alkaline phosphatase activities.

The ALP enzymes were solubilised as described previously [27]. Briefly, the cells from each culture dishes were washed with PBS by using centrifugation technique at 7000 x g for 15 min. The cells were mixed with 0.5 ml of the re-suspension buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl pH 8) and then solubilised by adding triton X-100 to a final concentration of 1%. After 20 min, the cell-free supernatant was obtained by centrifugation at 12000 x g for 15 min. The ALP activity was carried out by using 5 mM *p*-nitrophenyl phosphate in bicarbonate buffer (50mM HCO₃⁻, 0.5mM MgCl₂, pH 10) in total volume of 1 ml [34]. The reaction mixture was incubated for 2 h at 37°C and then stopped by adding 1 ml of 0.4 M NaOH. ALP activity was expressed as micromoles of *p*-nitrophenol produced per minute per 10⁶ cells or as percentage of control.

The stability of the solubilised enzyme at 56°C was monitored by incubating aliquots of each sample (20 μ l) in constant temperature water bath, for different time intervals. The samples were cooled and the residual ALP activities were examined as described above.

Alkaline phosphatase activities in PBMC were determined by incubating cells in 100 μ l of complete medium at a density of 10^5 cells/ml in flat-bottomed 96-well microtiter plates (Bioster, Bastia di Rovolon, Italy). Appropriate dilutions of carvacrol were first performed in 100 μ l of complete medium, as described above, and then added to the cell culture. After 48 h incubation in a humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, 100 μ l of medium was carefully removed from each well and cell solubilisation was carried out by adding triton X-100 to a final concentration of 1%. After 20 min, ALP activity was measured by using 5 mM *p*-nitrophenyl phosphate in bicarbonate buffer (50mM HCO₃⁻, 0.5mM MgCl₂, pH 10) in total volume of 200 μ l. The reaction mixture was incubated for 2 h at 37°C. The reaction was stopped by adding 150 μ l of 0.4 M NaOH to the reaction mixture and then the absorbance was measured at 405 nm in ELISA reader Multimode Detector. ALP activity was expressed as percentage of control.

3. RESULTS

Effect of carvacrol on both P815 cell growth and intracellular ALP activities.

The anti-proliferative activity of carvacrol as well as that of cisplatin on P815 cancer cells was first evaluated by MTT assay. As shown in figure 1(a,b), a dose dependent decrease in the growth of P815 was obtained with increasing concentrations of carvacrol or cisplatin. The IC₅₀ was evaluated to be 200 ± 10 μ M for carvacrol, which is in agreement with those found previously on chronic myeloid leukemia K562 cells [Ravi 2012] [35]. As control positive, the IC₅₀ for cisplatin was found to be 2 ± 0.1 μ M as previously reported for leukemic cell lines, CEM, HL60, U937 and K562 [36]. Then experiments were carried out by incubating cancer cell line P815, for 48 h, in the presence of cisplatin 2 μ M or carvacrol 200 μ M corresponding to their IC₅₀ concentrations. All were able to reduce significantly the cell growth (Table 1). Carvacrol at 200 μ M reduced the cell P815 growth by 59 %, but lower carvacrol concentration (2 μ M)

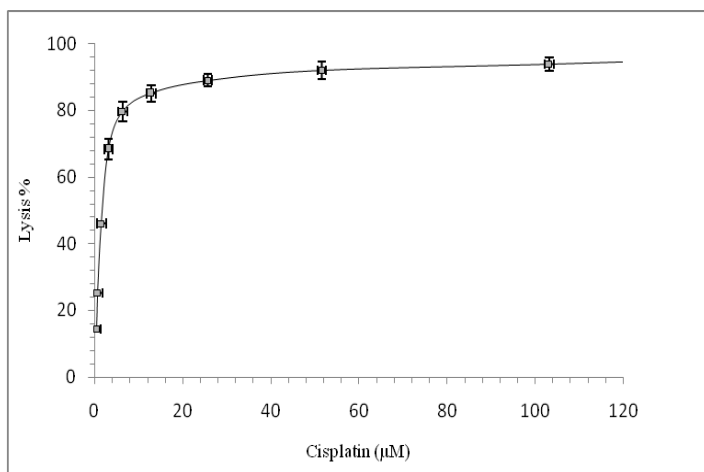
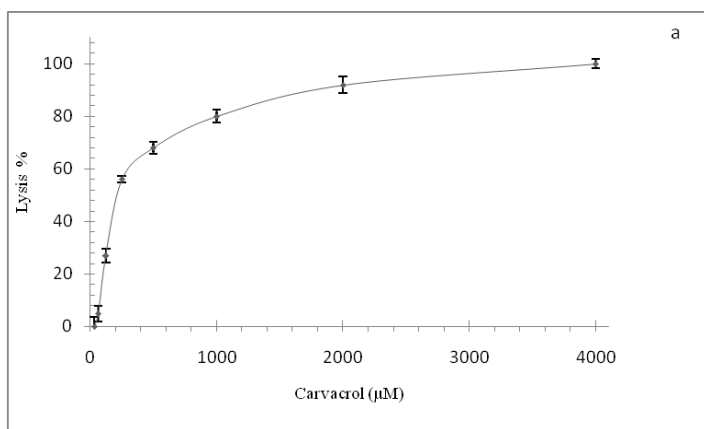


Figure 1 Effect of carvacrol on P815 cell growth. P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of carvacrol (a) or (b) cisplatin at various concentrations. Then the cell growth was evaluated by using the MTT assay as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

induced a clear proliferative effect on the cell growth (+ 140%). The cell morphology of P815 in the absence or the presence of carvacrol at low concentrations showed no significant difference except that the number of cells became higher (Figure 2 a,c). However, when carvacrol was used at cytotoxic concentrations, the treated cells after 48 h of exposure showed typical morphology of death cell via apoptotic phenomenon (Figure 2b).

Paralleled, alteration of intracellular ALP activity was measured for P815 cells. Cultures were grown in the presence or absence of various concentrations of carvacrol and solubilised after 48h for the assay of ALP activity as indicated in methods section. As shown in Table I, the activity of ALP was enhanced significantly when the cells were treated by cisplatin (+ 165%). Conversely, carvacrol at high concentration (IC_{50}) and lower concentration ($IC_{50}/100$) substantially reduced the expression of ALP activity by 68% and 60%, respectively.

Table I. Effect of carvacrol on both P815 cell viability and intracel-

ular alkaline phosphatase activity.

P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 6-well culture plates for 24 h. The cells were then treated with carvacrol at the indicated concentrations or with cisplatin ($2 \mu\text{M}$) for 48 h. The cells were collected, counted, washed with PBS. Then the solubilised extract was prepared and the enzyme activities were determined as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

	Cisplatin ($2 \mu\text{M}$)	Carvacrol ($200 \mu\text{M}$) ($2 \mu\text{M}$)	
Cell number variation (% of control)	- 45 \pm 9	- 59 \pm 6	+ 140 \pm 5
Alkaline phosphatase activity (% of control)	+ 165 \pm 12	- 68 \pm 5	- 60 \pm 7

These results clearly indicate that the inhibition of P815 cell growth by carvacrol (at IC_{50}) was not correlated to the high expression of ALP activity in response to the toxic effects. However, lower carvacrol concentration ($2 \mu\text{M}$) caused 1.4-fold increase in P815 cell number accompanied by a 60% decrease in ALP activity. The mean values of the cells growth and the ALP activity in carvacrol-treated cells were always significantly different from those of the untreated controls after 48 h incubation.

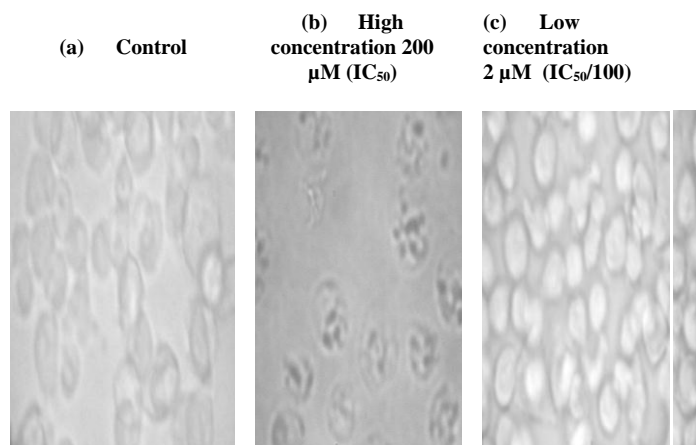


Figure 2 Effect of carvacrol at various concentration on P815 cell viability and morphology after 48 hours of incubation. Murine mastocytoma cell line (10^5 cells/ml) were incubated in 6-well culture plates in the presence of carvacrol at high concentration $200 \mu\text{M}$ (b) and low concentration $2 \mu\text{M}$ (c). After 48 h, the morphology of the cells was examined using a light microscope. The results represent a typical experiment.

Regarding the fact that carvacrol did not show any significant direct inhibitory effect on the ALP activity (result not shown), we investi-

gated the intracellular ALP activity behaves after carvacrol-treated in paralleled to the growth factor PWM-treated P815 cells. As shown in Figure 3, the single dose treatment of the P815 cells with carvacrol (2 μ M) or PWM (50 μ g/ml) [37] increased significantly the cell number up to an average of 150% when compared to the untreated cells, while the total solubilised ALP activity of treated cells decreased by 57% and 27%, respectively. But elevation of carvacrol concentration to 200 μ M (IC_{50}) reduced significantly the cell growth by 60% (Figure 3), and the growth was further reduced by higher concentrations compared to the control cells (not shown). At this inhibitory carvacrol concentration, the intracellular ALP activity was also reduced by 68%, indicating that the inhibition of cell growth by carvacrol do not seem to involve ALP activity as observed for many cytotoxic agents [27,28]. However, the intracellular ALP activity behaved differently when the cells were treated by 5 μ M of cisplatin (positive control). As shown in (Figure 3), the intracellular ALP activity enhanced to 250% in P815 cells with a concomitant high decreased cell number (-65%) under the effect of cisplatin.

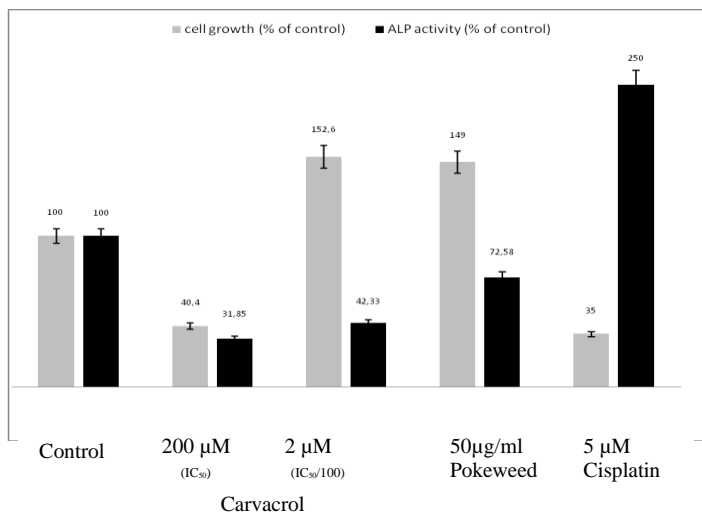


Figure 3 Effect of carvacrol and pokeweed mitogen on P815 cell growth and intracellular alkaline phosphatase activity. P815 cells (105/ml) were cultured in 6-well culture plates for 24 h. The cells were then exposed to carvacrol, pokeweed growth factor or cisplatin at the indicated concentrations for 48 h. The cells were collected, counted and washed with PBS. Then the ALP activity was determined in the TX-100 solubilised fraction as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

Temperature effect on alkaline phosphatase expressed in P815 cells

In order to find out the relationship between a specific isoenzymes ALP expression or repression and their probable involvement on cell growth, several biochemical methods, including thermo-stability of

the enzyme were used to differentiate the various isoenzymes of ALP [27]. As shown in Figure 4, the ALP activities from carvacrol-treated as well as PWM-treated and untreated P815 cells progressively inactivated when the solubilised enzyme fraction was pre-incubated at 56°C, reaching more than 85% loss of the enzyme activity after 40 min of pre-incubation.

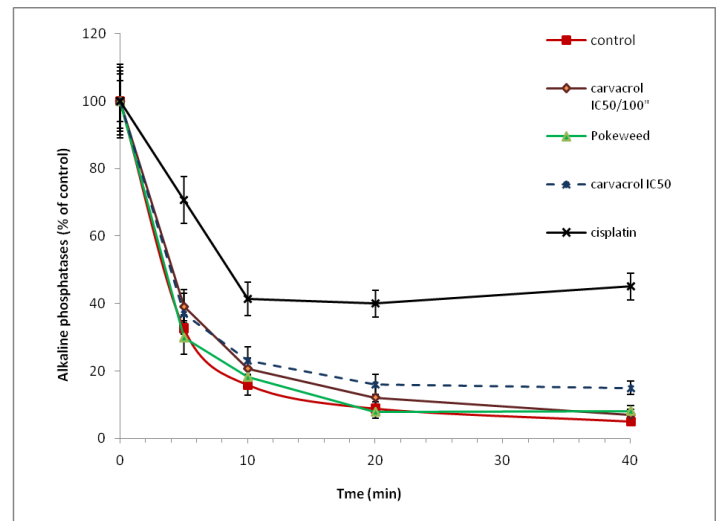


Figure 4 Effect of heating time on solubilised alkaline phosphatase activity in the treated and untreated P815 cells. P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 6-well culture plates for 48 h in the absence or presence of carvacrol at high concentration 200 μ M and low concentration 2 μ M, pokeweed growth factor (50 μ g/ml) or cisplatin (5 μ M). The solubilised cells free extracts were prepared from both control and treated cells. Then the thermo-stability of ALP of each pre-incubated sample (20 μ l) at 56°C was assayed for the enzyme activities as described in the methods section. All data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

These results highly suggest that the majority of ALP from P815 cells behaves more like the thermo-sensitive instable form or intestinal-like form. It seems clearly that both carvacrol, at least at lower concentration, and growth factor PWM have similar effect, regarding their inhibitory effects on intracellular ALP activity which is associated with increasing P815 cell growth and the thermo-sensitivity profile of ALP activity when we compared the inactivation rate of the enzyme activity loss at 56°C. However, in cisplatin-treated cells, an abnormal proportion of heat stable ALP form was expressed when compared with untreated cells (Figure 4). Indeed, The ALP activity was reduced gradually with increasing time of heat inactivation at 56°C, reaching a plateau after 10 min treatment, indicating the presence of at least two different isoenzymes in the solubilised cells, one heat-labile representing 60% of total ALP activity and the other more heat stable (40% of total ALP activity). The inactivation rate constant, for carvacrol-treated, PWM-treated, cisplatin-treated and un-

treated P815 cells, was found to be 0,175, 0,174, 0,087 and 0,175 min^{-1} , respectively. This may emphasise that the enhancement growth of P815 cells induced by both carvacrol and PWM could mainly due to the repression of labile ALP form, pointing out the possible interest role of thermo-sensitive instable ALP isoenzyme in P815 growth cells. By contrast, the proportion of the ALP heat stable form was become higher in cisplatin treated cells than those in untreated or carvacrol- and PWM-treated cells. Therefore, the abnormal increasing proportion of thermo-stable ALP isoenzyme was thought to be resulting from stress reaction.

Effect of carvacrol on PBMC growth.

PBMC were obtained from human blood as described previously [32]. The cells were exposed to various carvacrol concentrations and the percentage cell viability after 48 h incubation was monitored by MTT test as described in methods section. As shown in Figure 5, biphasic effect of carvacrol on PBMC growth cells was also obtained. Carvacrol at high concentrations around IC_{50} concentrations (1500 μM) caused a significant inhibition of the PBMC cell growth by 55%, and the inhibition growth was reduced progressively by lower carvacrol concentrations, reaching control level (100%) at around 500 μM . But lower carvacrol concentrations from 4 μM to 250 μM enhanced cell growth by as much as 146%. Furthermore, the anti-proliferative effect of carvacrol was shifted toward the higher concentrations when compared to that found for P815 cells under the same conditions (not shown) as observed previously [16]. Indeed, the dose inducing a slight human PBMC proliferation (250 μM) exhibited a high cytotoxic effect on tumour P815 cell line. Paralleled, a dose-dependent decrease in intracellular ALP activity was also obtained with increasing concentration of carvacrol, reaching -70% at 2000 μM (Figure 5). These results also suggest that carvacrol could be involved in inducing both proliferative and anti-proliferative of lymphocyte since PBMC are composed with 80% lymphocytes and 20% monocytes. Regarding the pattern inhibition profile of carvacrol on P815 cancer cells and PBMC growth, it seems clearly that carvacrol exerts differential effects depending to its concentration in the medium.

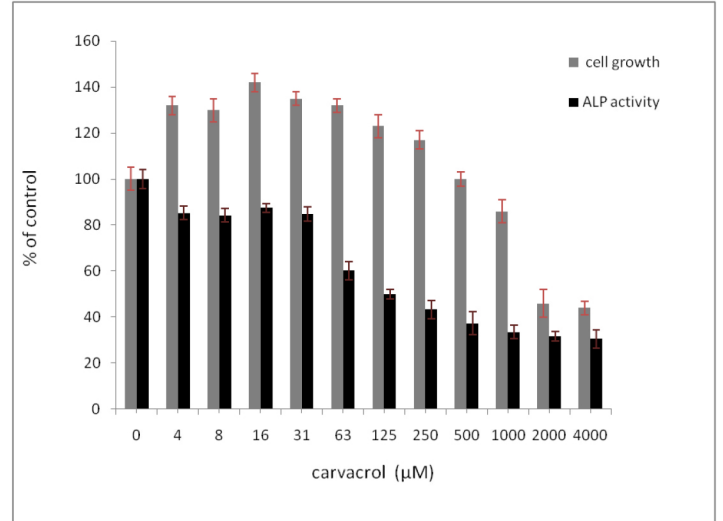


Figure 5 Effect of carvacrol on both cell growth and intracellular alkaline phosphatase activities in PBMC. P815 cells ($10^5/\text{ml}$) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of carvacrol at various concentrations. Then the cell growth and the intracellular ALP activities were measured by using the MTT assay and ALP assay, respectively, as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

4. DISCUSSION

The natural isopropyl cresol, carvacrol, which is the main component of thyme, oregano and pepperwort essential oils, is known to penetrate deeply into most tissues [38] and is credited with a series of pharmacological [1-11]. It has been reported that carvacrol showed an anti-cancer effect mainly by inducing apoptosis phenomenon [12,13,17,20]. However, the effect and the mechanism by which carvacrol induce cell proliferation in P815 cancer cells as well as PBMC have not been investigated. Hence, in this study, we first investigate the effect of pure carvacrol on the growth pattern of P815 cancer cells and the intracellular ALP expression. We demonstrate clearly that carvacrol, at low concentration ($\text{IC}_{50}/100$), reduces significantly the intracellular ALP activities with a concomitant increase in the P815 cell number up to +160%. More interestingly, the stimulation of P815 cell growth by carvacrol at lower concentration was similar to that of PWM and these proliferative effects seem to be correlated to the repression of intracellular ALP activity, pointing out the major role of ALP in cell biology. The proliferative effects of PWM on cells were mediated *via* mitogens trigger signal transduction pathways, in which mitogen-activated protein kinase (MAPK) is involved, leading to mitosis. Although, the coupling mechanism observed here between proliferation effect and repression of ALP activity is not know, our result highly suggest a regulatory role of car-

treated P815 cells, was found to be 0,175, 0,174, 0,087 and 0,175 min^{-1} , respectively. This may emphasise that the enhancement growth of P815 cells induced by both carvacrol and PWM could mainly due to the repression of labile ALP form, pointing out the possible interest role of thermo-sensitive instable ALP isoenzyme in P815 growth cells. By contrast, the proportion of the ALP heat stable form was become higher in cisplatin treated cells than those in untreated or carvacrol- and PWM-treated cells. Therefore, the abnormal increasing proportion of thermo-stable ALP isoenzyme was thought to be resulting from stress reaction.

Effect of carvacrol on PBMC growth.

PBMC were obtained from human blood as described previously [32]. The cells were exposed to various carvacrol concentrations and the percentage cell viability after 48 h incubation was monitored by MTT test as described in methods section. As shown in Figure 5, biphasic effect of carvacrol on PBMC growth cells was also obtained. Carvacrol at high concentrations around IC_{50} concentrations (1500 μM) caused a significant inhibition of the PBMC cell growth by 55%, and the inhibition growth was reduced progressively by lower carvacrol concentrations, reaching control level (100%) at around 500 μM . But lower carvacrol concentrations from 4 μM to 250 μM enhanced cell growth by as much as 146%. Furthermore, the anti-proliferative effect of carvacrol was shifted toward the higher concentrations when compared to that found for P815 cells under the same conditions (not shown) as observed previously [16]. Indeed, the dose inducing a slight human PBMC proliferation (250 μM) exhibited a high cytotoxic effect on tumour P815 cell line. Paralleled, a dose-dependent decrease in intracellular ALP activity was also obtained with increasing concentration of carvacrol, reaching -70% at 2000 μM (Figure 5). These results also suggest that carvacrol could be involved in inducing both proliferative and anti-proliferative of lymphocyte since PBMC are composed with 80% lymphocytes and 20% monocytes. Regarding the pattern inhibition profile of carvacrol on P815 cancer cells and PBMC growth, it seems clearly that carvacrol exerts differential effects depending to its concentration in the medium.

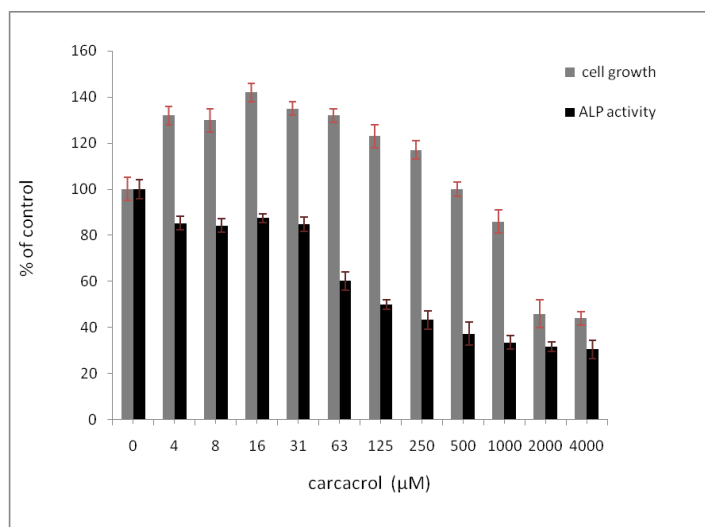


Figure 5 Effect of carvacrol on both cell growth and intracellular alkaline phosphatase activities in PBMC. P815 cells ($10^5/\text{ml}$) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of carvacrol at various concentrations. Then the cell growth and the intracellular ALP activities were measured by using the MTT assay and ALP assay, respectively, as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

4. DISCUSSION

The natural isopropyl cresol, carvacrol, which is the main component of thyme, oregano and pepperwort essential oils, is known to penetrate deeply into most tissues [38] and is credited with a series of pharmacological [1-11]. It has been reported that carvacrol showed an anti-cancer effect mainly by inducing apoptosis phenomenon [12,13,17,20]. However, the effect and the mechanism by which carvacrol induce cell proliferation in P815 cancer cells as well as PBMC have not been investigated. Hence, in this study, we first investigate the effect of pure carvacrol on the growth pattern of P815 cancer cells and the intracellular ALP expression. We demonstrate clearly that carvacrol, at low concentration ($\text{IC}_{50}/100$), reduces significantly the intracellular ALP activities with a concomitant increase in the P815 cell number up to +160%. More interestingly, the stimulation of P815 cell growth by carvacrol at lower concentration was similar to that of PWM and these proliferative effects seem to be correlated to the repression of intracellular ALP activity, pointing out the major role of ALP in cell biology. The proliferative effects of PWM on cells were mediated *via* mitogens trigger signal transduction pathways, in which mitogen-activated protein kinase (MAPK) is involved, leading to mitosis. Although, the coupling mechanism observed here between proliferation effect and repression of ALP activity is not know, our result highly suggest a regulatory role of car-

vacrol as well as that of PWM on the intracellular ALP activity. As a result, the growth effect of carvacrol on P815 cells may be through transduction signal, at least at lower concentrations. Conversely, using carvacrol at cytotoxic concentration, 200 μ M, reduced significantly the cell growth by 60% as well as the intracellular ALP activity by 68%, indicating that the inhibition of P815 cell growth by carvacrol do not seem to involve ALP activity as usually observed for many cytotoxic [27,28,39]. Furthermore carvacrol, at high concentration (IC_{50}), is capable of reducing the proliferation rate of P815, arresting the cells at S phase of the cycle and underwent apoptosis (result not shown), confirming the previously finding [17]. The present result shows clearly that carvacrol exerts multiple effects on P815 cancer cells *in vitro*, and these opposite actions depend on carvacrol concentrations. Lower carvacrol concentration (2 μ M) stimulates cell proliferation and decrease ALP activity. Higher carvacrol concentration (200 μ M) inhibits cell growth and also decreases ALP activity. Biphasic hormone effects on ALP activity in osteoblastic osteosarcoma cells has been reported previously and both inhibitory and stimulatory effects on ALP activity are associated with opposite effects on cell growth [40].

The intracellular ALP activity behaved differently when the P815 cells were treated by cisplatin (positive control), showing an enormous enhancement of intracellular ALP activity up to 250% (Figure 3) with a concomitant high decreasing cell number (- 65%). This result is in full agreement with the literature data concerning the induction of ALP expression correlates well with the growth inhibition pattern of MCF-7 under the influence of different cytotoxic agents such as retic acid (RA), dexamethason (Dex) and 3-HK [27,28]. Interestingly, the proportion of the ALP heat stable form was become higher in cisplatin treated cells than those in untreated or carvacrol- and pokeweed-treated P815 cells (Figure 4). The abnormal increasing proportion of thermo-stable ALP isoenzyme was thought to be resulting from P815 cell stress reaction and in that regard, these criteria could be used as diagnostic tools for following the efficiency medical treatment of specific or general cancer cases. Therefore, our findings highly suggest that the repression of ALP activity by carvacrol, particularly the heat-labile form, could be responsible for the proliferative activity of P815 cancer cells. However, the anti-proliferative effect of higher carvacrol concentrations could be mediated *via* apoptosis process as reported previously [17] and confirmed in the present work.

The liver, bone, kidney-type alkaline phosphatase (L/B/K-ALP) is

the product of one of the ALP genes, which contain two leader exons, 1A and 1B, and produce two alternatively spliced mRNAs, differing only in their 5' untranslated region [41]. In general, the expression of the two mRNAs is mutually exclusive in the various tissues and cell lines so far investigated. The factors involved in the tissue-specific expression, as well as the possible endogenous and exogenous regulators of the levels of two transcripts, are not yet clearly established. It would be of great interest to know whether forms of alkaline phosphatase repressed by carvacrol represent novel or already described molecular species.

Biphasic effect of carvacrol on PBMC growth cells was also obtained (Figure 5), suggesting that carvacrol could be involved in inducing both proliferative and anti-proliferative of lymphocyte cells. Regarding the pattern inhibition profile of carvacrol on P815 and PBMC cell growth, it seems clearly that carvacrol exerts differential effects depending to its concentrations in the medium.

Dietary supplementation with thyme oil maintained significantly higher superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities and total antioxidant status [2, 42]. Furthermore, it has been reported previously that non toxic concentrations of thyme extract are capable to reduce considerably the DNA-damage with the possibility of enhancement of error-free DNA repair [43]. The thyme extract has also been shown to induce a considerable stimulation of leucopoiesis, provoke an elevation of the thrombocyte count in the blood [44] and active proliferation of pulpal fibroblast [45]. Her, we observed a significant increase in the number of murine mastocytoma cell line (P815) as well as human PBMC cultured *in vitro* in the presence of carvacrol at low concentrations and such effects can lead to the cancer improvement. Besides, essential oils are becoming increasingly popular as naturally occurring bioactive agents [Durson N 2003] [46], particularly the thyme's essential oil in which carvacrol constitute one of its major component. Regarding the fact that essential oil can be used as aroma additives in food, pharmaceuticals and cosmetics, the results found out in the present work highly suggest that the cancer patients should avoid using the essential oil containing carvacrol. In that regard, quick and intensively research should be mind to clarify this critical situation in using essential oil carvacrol.

5. CONCLUSION

In the present study, we found out that carvacrol has a biphasic effect on PBMC and tumour P815 cell growth depending to its concentra-

tions in the medium. At higher concentrations, carvacrol appears to have an anti-proliferative effect resulting in inhibition of cell growth. However, at low concentrations, carvacrol appears to have growth factor-like effects by stimulating the growth of P815 cancer cells as well as PBMC. Furthermore, this stimulation of cell proliferation seems to be correlated to the negative modulation of alkaline phosphatase by carvacrol.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Geneviève le Lemaire (University of Paris XI, Orsay, France) for her gift of the P815 cell line

REFERENCES.

- De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M : **Constituents of aromatic plants : carvacrol.** *Fitoterapia* 2004, **75** : 801-804.
- Youdim K A, Deans SG. **Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain.** *Br J Nutr* 2000, **83**: 87-93.
- Suganthi RU, Manpal S: **Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: an updated review.** *Word Journal of Phamacy and Pharmaceutical Sciences* 2013, **2**(5): 3581-3595.
- Lattaoui N, Tantaoui-Elaraki A: **Comparative kinetics of microbial destruction by essential oils of *Thymus broussonetii*, *Thymus zygist* and *Thymus satureioides*.** *J Essen oil Res* 1994, **6**: 165-171.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. **Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents.** *J Appl Bacteriol* 1994, **76**: 626-631.
- Tabak M, Armon R, Potasman I: **In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme.** *J Appl Bacteriol* 1996, **80**: 667-672.
- El-maraghi SS: **Effect of some spices as preventatives for storage of lentil (*Lens esculenta* L.) seeds.** *Folia Microbio* 1995, **40**: 490-492.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG: **GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*.** *J Agric Food Chem* 2000, **48**: 2576-2581.
- Baser KH: **Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**: 3106-3119.
- Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat HA, Sahin F, Sokmen A: **In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum Acutidentis*.** *J. Agric. Food Chem* 2004, **52**: 3309-3312.
- Suntres ZE, Coccimiglio J, and Alipou M: **The bioactivity and toxicological actions of carvacrol.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015, **55** (3): 304-318.
- Koparal AT, Zeytinoglu, M: **Effects of carvacrol on a human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cell line, A549.** *Cytotechnology* 2003, **43**: 149-154.
- Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ: **Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2.** *Cytotechnology* 2011, **64**(1):43-51.
- Arunasree KM: **Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231.** *Phytomed.* *Int J Phytother Phytopharm* 2010, **17**: 581-588.
- Horvathova E, Turcaniova V, Slamenova D: **Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562.** *Neoplasma* 2007, **54**: 478-483.
- Ait M'Barek L, Ait Mouse H, Jaafari A, Aboufatima R, Benharref A, Kamal M, Benard J, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Chait A, Dalal A and Ziad A: **Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonetii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007, **40**: 1537-1544.
- Jaafari A, Ait Mouse H, Ait M'Barek L, Tilaoui M, Elhansali M, Lepoivre M, Aboufatima R, Melhaoui A, Chat A, Ziad A: **Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonetii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction.** *Herba polonica* 2009, **55**: 36-50.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. **Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth.** *Carcinogenesis* 2007, **28**: 233-239.
- Yun Luo, Wu JY, Lu MH, Shi Z, Na N, Di JM. **Carvacrol Alleviates Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion through Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, **5**: 1-11.
- Elango B, Natarajan S, Dornadula S, Kannan K, Sivanesan SD, Palanheisamy R, Kunka M R: **Carvacrol induced mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and**

- Jurkat T lymphoma cells.** *European Journal of Pharmacology* 2016, 772: 92-98.
21. Tsai LC, Hung MW, Cn UH, Su WC, Chang GG, Chang TC: **Expression and regulation of alkaline phosphatases in human breast cancer MCF-7 cells.** *Eur J Biochem* 2000, 267: 1330-1339.
 22. Ng KW, Manji SS, Young MF, Findlay DM: **Opposing influences of glucocorticoid and retinoic acid on transcriptional control in preosteoblasts.** *Molecular Endocrinology* 1989, 3: 2079-2085.
 23. Lorenzo DD, Albertini A, Zava D: **Progesterone regulation of alkaline phosphatase in the human breast cancer cell line T47D.** *Cancer Res* 1991, 51: 4470-4475.
 24. Scheibe RJ, Moeller-Runge I, Muller WH: **Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells.** *J Biol Chem* 1991, 266: 21300-21305.
 25. Bao R, Selvakumaran M, Hamilton TC: **Use of a surrogate marker (human secreted alkaline phosphatase) to monitor in vivo tumor growth and anticancer drug efficacy in ovarian cancer xenografts.** *Gynecologic Oncology* 2000, 78: 373-379
 26. Calhau C, Martel F, Hipolito-Reis C, Azevedo I: **Effect of P-glycoprotein modulators on alkaline phosphatase activity in cultured rat hepatocytes.** *Cellular Physiology and Biochemistry* 2000, 10: 195-202.
 27. Chang TC, Wang JK, Hung MW, Chen UH, Chiao CH, Tsai LC, Chang GG: **Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line.** *Biochem J* 1994, 303: 199-205.
 28. Sadeghirizi A, Yazdanparast R: **Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from *Dendrostellera lessertii*.** *Acta Biochimica Polonia* 2007, 54: 323-329.
 29. Chang GG, Shiao MS, Lee KR, Wu JJ: **Modification of human placental alkaline phosphatase by periodate-oxidized 1, N6-ethanoadenosine monophosphate.** *Biochemical Journal* 1990, 272: 683-690.
 30. Alon BA, Zion H, Herzel BH, Magda O, Ram D: **Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1999, 86: 69-71.
 31. Rao SR, Snaith AE, Marino D, Cheng X, Lwin ST, Orriss IR, Hamdy FC, Edwards CM: **Tumour-derived alkaline phosphates regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer.** *British Journal of Cancer* 2017, 116: 227-236.
 32. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, and Zola H: **Isolation of whole Mononuclear cells from Peripheral Blood and Cord Blood.** *Current Protocols in Immunology* 2009, 7.1.1-7.1.8
 33. Plumb JA, Milroy R, Kaye SB: **Effects of pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay.** *Cancer Research* 1989, 49: 4435-4440.
 34. Koyama I, Sakagishi Y, Komoda T: **Different lectin affinities in rat alkaline phosphatase isoenzymes: multiple forms of iso-enzymes isolated by heterogeneities of sugar moieties.** *J Chromatogr* 1986, 374: 51-59.
 35. Ravi A, Alvala M, Sama V, Kalle AM, Irlapati VK, Reddy BM: **Anticancer activity of *Pupalia lappacea* on chronic myeloid leukemia K562 cells.** *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 20: 86.
 36. Su WC, Chang SL, Chen TY, Chen JS, Tsao CJ: **Comparison of In Vitro Growth-inhibitory Activity of Carboplatin and Cisplatin on Leukemic Cells and Hematopoietic Progenitors: the Myelosuppressive Activity of Carboplatin May Be Greater Than Its Antileukemic Effect.** *Jpn J Clin Oncol* 2000, 30: 562-567.
 37. De Vries E, Lafeber GJM, Van Der Weij JP, Van Buijsen AC, Leijh PCJ, Cats A: **Pokeweed-mitogen induced lymphocyte proliferation: the effect of stimulation on mononuclear phagocytic cells.** *Immunology* 1980, 40: 177-182.
 38. Andersen A: **Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol.** *International Journal of Toxicology* 2006, 25 (suppl 1): 29-127.
 39. Sadeghi H, Yazdanparast R: **Effect of *Dendrostellera lessertii* on the intracellular alkaline phosphatase activity of four human cancer cell lines.** *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 86: 11-14.
 40. Majeska RJ and Rodan GA: **The Effect of 1,25(OH)2D3 on Alkaline Phosphatase in Osteoblastic Osteosarcoma Cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 1982, 257: 3362-3365.
 41. Gianni M, Terao M, Zozzani S, Garattini E: **Retinoid acid and cyclic AMP synergically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline gene in L929 fibroblastic cells.** *Biochem J* 1993, 296: 67-77.
 42. Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, HO SC: **Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary spices.** *Food Chem Toxicol* 2007, 45: 440-447.
 43. Vukovic-Gacic B, Simic D: **Identification of natural antimutagens with modulating effects on DNA repair.** *Basic Life Sci* 1993, 61: 269-277.

44. Von Ardenne M., Reitnauer PG: **The elevation of the leucocyte and thrombocyte counts produced by a thyme extract in the peripheral blood as compared to that caused by 2-cyanoethylurea.** Pharmazie 1981, 36: 703-705.
45. Tsukamoto Y, Fukutani S, Takeuchi S, Okamoto T, Mori M: **Some phenolic compounds stimulate the proliferation of human pulpal fibroblasts.** Japanese journal of oral biology 1989, 31: 357-362.
46. Dursun N, Liman N, Ozyazgan I, Gunes I, Saraymen R: **Role of thymus oil in bum wound healing.** J Bum Care Rehabil 2003, 24: 395-399.

5.3. Nouvelle méthode d'évaluation *in vitro* de l'effet cytotoxique des extraits et drogues sur les cellules cancéreuses et bactériennes : Méthode rapide, efficace et moins chère que celle préconisée actuellement (test MTT).

**Rapid and simple chemosensitivity assay for both adherent and non adherent cancer cell lines
by using 2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol (DCPIP)**

(Article soumis, voir ci dessous)

(Communications orales et par affiches, voir ci-après)

Plusieurs méthodes ont pu être développées pour l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro*, dont certaines sont applicables sur les cellules adhérentes et non adhérentes. Cependant aucune n'est universelle. De plus, sur les mêmes lignées tumorales, différentes méthodes d'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* peuvent donner des résultats différents [1]. D'autres méthodes d'évaluation de la viabilité cellulaire ou tests de dénombrement des cellules sont également utilisés :

- L'absorption du rouge neutre (NRU, neutral red uptake assay), repose sur l'accumulation intracellulaire du colorant dans les lysosomes cellulaires par transport actif [2].
- Réduction de la résazurine (RES, resazurin reduction assay) en résorufine fluorescent se produit principalement dans les mitochondries et la quantité de résorufine générée peut donc être utilisée comme indicateur de l'activité métabolique [3].
- Le dosage de la sulforhodamine B (SRB) qui au contraire mesure la teneur total en protéines cellulaires et ne repose pas sur la fonctionnalité cellulaire. C'est la méthode adoptée par l'Institut National du Cancer (NCI) aux Etats-Unis dans son programme de criblage de composés potentiellement actifs [4-6].

Le test MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] est devenu une référence pour la détermination de la viabilité et la prolifération cellulaire depuis son adoption par l'Institut Nationale de Cancer dans son programme de recherche de nouvelles drogues douées d'activité anti cancéreuse [7-9]. La méthode MTT est basée sur la conversion du tetrazolium en cristaux de formazan (forme insoluble) essentiellement par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes et non pas les cellules mortes [10,11]. Cependant, cette méthode présente un certain nombre d'inconvénients, comme l'élimination d'une partie du milieu de culture avant l'addition du réactif MTT, problème de linéarité, l'insolubilité du produit, ou encore le problème d'interférence métabolique.

Etant donné que le test DCPIP (2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol), nouvellement développé dans le présent travail, est réalisé avec des cellules homogénéisées en présence du détergent TX-100, la décoloration (réduction) de DCPIP est corrélée au potentiel réducteur d'enzymes déshydrogénases, y compris la succinate déshydrogénase, et leur quantité. Pour valider ce teste DCPIP, nous avons utilisé des cellules cancéreuses adhérentes, lignée MCF7 (human breast cancer cell line) et lignée MDAMB468 (human triple-negative breast cancer cell line), et des cellules cancéreuses non adhérentes, lignée P815 (murine mastocytoma cell line).

L'inhibition de la croissance cellulaire (chimio sensibilité) *in vitro* a été déterminée par la méthode DCPIP en parallèle avec la méthode MTT.

Cette nouvelle méthode d'évaluation de la cytotoxicité par le DCPIP donne les mêmes résultats que la méthode MTT, avec en plus des avantages indiscutables, à savoir :

- 1- La mise en route est plus simple que le teste MTT;
- 2- Il y a moins d'étapes à effectuer;
- 3- Il n'y a aucun problème de solubilisation du produit de la réaction, rencontré lors du test MTT;
- 4- Une très bonne corrélation entre la croissance cellulaire et l'absorption, comparable à celle déterminée par le test MTT;
- 5- La méthode peut facilement être standardisée et automatisée, contrairement au test MTT (semi-automatique);
- 6- Le produit utilisé est moins cher et donc à la porté de l'ensemble des chercheurs et notamment ceux des pays moins fortunés;
- 7- Méthode applicable aux microorganismes, bactéries, levures, parasites etc.

Références

- [1]. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, 288: 369-376.
- [2]. Goegan P, Johnson G, Vincent R. Effects of serum protein and colloid on the Alamar Blue assay in cell cultures. *Toxicol In Vitro*. 1995; 9(3):257-66.
- [3]. Zhang SZ, Lipsky MM, Trump BF, Hsu IC. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biol Toxicol*. 1990; 6(2):219-34.
- [4]. Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, et al. Comparison of in vitro anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumour cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82:1113-8.
- [5]. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006; 1:1112-6.
- [6]. National Cancer Institute Screening Services. NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screen. <http://www.cancer.gov> (2014). Accessed 5 January 2015.

- [7]. Carmichael J, DeGaff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., and Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987, 47:936-942.
- [8]. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbot B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., and Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 1988, 48:589-601.
- [9]. Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005; 31:757–68.
- [10]. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55–63.
- [11]. Berridge MV., Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives Biochem. Biophys.* 1993, 303:474-482.

**Rapid and simple chemosensitivity assay for both adherent and non adherent cancer cell lines
by using 2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol (DCPIP)**

Article soumis, voir ci dessous)

Rapid and simple chemosensitivity assay for both adherent and non adherent cancer cell lines by using 2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol (DCPIP)

By

Houda AYAD¹, Ahmed GAMOUH² and Nouredine ELABBADI^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Cell Biology, Sultan Moulay Slimane University, Faculty of Sciences and Technologies, Box 523, Beni-Mellal, Morocco

²Laboratory Applied Spectrochemistry and Environment, Sultan Moulay Slimane University, Faculty of Sciences and Technologies, Box 523, Beni-Mellal, Morocco

***Correspondence: noureddineelabbadifst@yahoo.com**

Abbreviations: DCPIP, 2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; MCF7, adherent human breast cancer cell line; MDA-mb 468, human triple-negative breast cancer cell line; P815, non adherent murine mastocytoma cell line; SDH, succinate dehydrogenase

¹Laboratory of Biochemistry and Cell Biology, Sultan Moulay Slimane University, Faculty of Sciences and Technologies, Box 523, Beni-Mellal, Morocco. Tel.: 212 5 23 48 51 12/22; Fax.: 212 5 23 48 52 01

E-mail address: noureddineelabbadifst@yahoo.com

ABSTRACT

2,6-Dichlorophenol-Indophenol assay (DCPIP assay) is an alternative method that we have developed to measure cancer cell viability. It is based on the conversion of coloured DCPIP (oxidized form) by dehydrogenase enzymes into discoloured form (reduced form). To validate DCPIP assay, the adherent MCF-7 and MDA-MB 468 as well as the non-adherent P815 cancer cell lines were used. When culture parameters and reaction mixture were carefully controlled, the discoloration of DCPIP was proportional to the number of cancer cells. It can be used from a wide range of cancer cells from 10^4 to 10^6 per ml. The cytotoxicity assessment was carried out by using DCPIP assay in comparison to the most used MTT assay. The antitumor effects (IC_{50}) obtained with cisplatin and carvacrol using DCPIP assay were very similar to those obtained with MTT assay. The use of DCPIP assay for *in vitro* anticancer drug screening is a good alternative to the MTT method. The major advantage of using DCPIP was it avoids the formazan crystal solubilisation steps, no interference with cellular metabolism, no washing steps are required, very inexpensive and easy to make up.

Key words: MCF-7 cells, P815 cells, MDA-MB 468 cells, MTT assay, DCPIP assay, cell viability.

1. Introduction

In vitro screening of anti-tumoral drugs or for determining the susceptibility of cancer cells to drugs constitutes one of the major steps in the possible development of novel potential drugs. There are a number of chemosensitivity assays suitable for use *in vitro*, few are applicable to all cell types, and there is no universally accepted assay.

The MTT assay which measures the ability of live but not dead cells to reduce MTT-formazan product, has been stimulated following the adoption of such an assay by the National Cancer Institute for use in its drug screening program (Carmichael et al., 1987; Alley et al., 1988). As indirect method, MTT assay had been developed based on conversion of yellow MTT substrate into dark blue formazan (Mosmann et al., 1983; Berridge and Tan, 1993). The blue formazan that formed is proportional to cell viability. In practical, removing the supernatant medium from cultured cells it's quit hazardous, particularly when the assay is used to evaluate drug sensitivity on non adherent cancer cell lines. Furthermore, many attempts to use the assay have failed to demonstrate a linear relationship between MTT-formazan product and cell number at high cell densities (Carmichael et al., 1987; Mosmann et al., 1983; Cole et al., 1986). This is particularly important, since the highest cell numbers occur in the control, untreated cells, and these are used to determine the parameters of sensitivity to the cytotoxic drug. The disadvantage of MTT assay is incompletely soluble formazan crystal in culture media so that solvent addition is needed to dissolve it. Recently it was proposed that SDS 0.01M HCl was the best formazan solvent for MTT assay (Septisetyani et al., 2014). Furthermore, interference between MTT assay and all the glycolysis inhibitors tested was observed (Ganapathy et al., 2010; Alet van Tonder et al., 2015) and in that regard, any chemosensitivity assays to be used to assess new potential drugs or combinations should be assessed for potential interference by compounds and suitability determined before starting the evaluation.

The use of DCPIP assay proposed in the present work is a good alternative and/or complementary to the method of MTT assay. Indeed, there is no dependence of the DCPIP assay on cell metabolic function which can influence results as reported for MTT assay (Ganapathy and Morgan, 2010; Alet van Tonder et al., 2015). As the DCPIP assay is carried out with homogenised cells, the discoloration (reduction) of DCPIP was correlated to both the reductive potential of dehydrogenase enzymes, including succinate dehydrogenase (SDH), and their quantity. To valid DCPIP assay, the adherent MCF-7 and MDAMB 468, and the non adherent P815 cancer cell lines were used and chemosensitivity assays were carried out by using DCPIP assay in paralleled to MTT assay. Here, we describe a rapid, inexpensive and simple chemosensitivity assay that gives results closely similar to those obtained by MTT assay, which can be used for both adherent and non adherent cancer cell lines.

2. Materials and methods

2.1. Materials

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), 2,6-dichlorophénol-indophénol and penicillin-neomycin, trypsin/EDTA were purchased from Sigma Chemical Co., Saint Quentin, France. The non adherent murine mastocytoma cell line (P815) was kindly provided by Prof. Michel LEPOIVRE (University of Paris Sud, Orsay, France). The adherent human breast cancer cell line (MCF7) and human triple-negative breast cancer cell line (MDA-mb 468) were kindly provided by Dr Thierry DUBOIS (Curie Institute, Paris, France)

2.2. Cell culture lines

Cell lines were routinely cultured in complete medium RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France), 1% penicillin-neomycin and

2% L-glutamine (complete medium). Cells were cultured in culture flasks in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. The adherent cells were harvested by trypsinizing the cell with 0.05% trypsin/EDTA and incubated at 37 °C for 5 min to obtain the complete cell detachment. The cell suspension was centrifuged at 300 rpm for 5 min and the cell pellets were re-suspended with complete medium. The cell viability and their morphology were examined by optic microscopy and then after the cell number were quantified by using Malassez lame for each experiment.

2.3. Determination of the optimal DCPIP concentration

2-6 DiChloroPhénol-IndoPhénol (DCPIP) concentration (25µg/ml) was dissolved in phosphate buffer (200 mM, pH 6.8), containing 10 mM succinate and TX-100 (3%) buffer A. In few row, 100 µl of dissolved DCPIP were mixed with 200 µl of RPMI (complete medium), only used to blank the plate reader, and the absorption was determined at wavelength 600 nm. The colourless DCPIP (reduced form) produced by mainly deshydrogenase enzymes was obtained by incubating TX-100 solubilised cells in the presence of the blue dye DCPIP for 3 h at 37°C. The degree of discoloration indicates the ability of intracellular deshydrogenase enzymes, mainly the succinate deshydrogenase (SDH), to reduce the water-soluble blue dye (DCPIP) to colourless water soluble form. The overload of DCPIP in the reaction mixture should be avoided. In that regard, cells were plated out in 100 µl of complete medium at concentration of 5×10^4 cells per flat-bottomed 96-well microtiter plates (Bioster, Bastia di Rovolon, Italy). Plates containing adherent cells were first incubated for 24 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, contrary to the non adherent cells which can be used directly without pre-incubation period. DCPIP (from 2.5 µM to 15 µM) was dissolved in buffer A and 100 µl were added to each well and the plates were scanned at 600 nm using multi-scan apparatus before a further 3h incubation at 37°C. The start absorption maxima must be below 1 unit of

optical density (DO) even at highest DCPIP concentrations. The reduction of DCPIP by metabolically active enzymes was expressed as DO variation ($\Delta DO_{\lambda 600\text{nm}}$) for each well.

2.4. Interference

Potential interference for each drug inhibitors was checked by diluting the assay dye DCPIP (25 $\mu\text{g/ml}$) as required in buffer A. Then 100 μl of dissolved DCPIP were mixed with 200 μl of RPMI (complete medium) containing drugs in 96-well micro-titre plate wells. The initial absorption reading of approximately 1 was obtained. After an incubation period of 3 h, the absorption was determined by spectrophotometer.

2.5. Relationship between the discoloration of DCPIP and cell number.

Non adherent cells were adjusted to 1.5×10^6 cells per ml and various volumes of this suspension (10 to 200 μl) were plated out in triplicate 96-well microtiter plates in final volume of 200 μl . Then 100 μl of DCPIP solution (buffer A) were added and the plate was incubated for 3 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 in air. Few rows which contained complete medium and DCPIP but not cells, were used to blank the plate reader. The reduction of DCPIP, expressed as $\Delta DO_{\lambda 600\text{nm}}$ for each well, by metabolically active enzymes was quantified by scanning the plates at 600 nm using multi-scan apparatus.

2.6. Cellular chemosensitivity measurement

The methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) test was used as control positive in parallel to DCPIP test to determine the effect of the cisplatin on the growth of non adherent P815 cell line as well as on the adherent MDA mb-468 and MCF 7 cell lines.

MTT assay (Septisetyani et al., 2014): briefly, adherent cells were plated out in 100 μl of complete medium at a concentration of 10^4 cells per ml and allowed to attach and grow for 24

h. 100 μ l of medium containing cisplatin or carvacrol at appropriate concentrations were then added to the cell culture. After 48 h incubation in a humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, 100 μ l of medium was carefully removed from each well and replaced with 20 μ l MTT solution (5 mg/ml PBS). After 4 h incubation under the same conditions, the cleavage of MTT to formazan by metabolically active cells was quantified by scanning the plates at 540 and 630 nm using multi-scan apparatus. The means of three independent assays was determined to analyze the effect of drug on P815 cell growth. The growth inhibition rate was evaluated as percentage of parallel negative controls as follows: $[(A_{control} - A_{experiment})/A_{control}] \times 100$. For the non adherent cell line, 100 μ l of cultured cells (5×10^4 cells per ml) were plated out in flat-bottomed 96-well micro-titre plates. 100 μ l of medium containing cisplatin, or carvacrol, at appropriate concentrations were then added immediately and plates were incubated for 48 h. Then, 100 μ l of medium was carefully removed from each well and replaced with 20 μ l MTT solution (5 mg/ml PBS). After 4 h incubation under the same conditions, the cleavage of MTT to formazan by metabolically active cells was quantified by scanning the plates at 540 and 630 nm using multi-scan apparatus.

DCPIP assay: The adherent cells were plated out in 100 μ l of complete medium at a concentration of 10^4 cells per ml and allowed to attach and grow for 24 h. 100 μ l of medium containing cisplatin, or carvacrol, at appropriate concentrations were then added to the cell culture. After 48 h incubation in a humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, 100 μ l of DCPIP solution (buffer A) were added and kept at 37 °C for 3h. The reduction of DCPIP, expressed as $\Delta DO_{\lambda 600nm}$ for each well, by metabolically active enzymes was quantified by scanning the plates at 600 nm using multi-scan apparatus as described above. For the non adherent cell lines, 100 μ l of cultured cells (5×10^4 cells per ml) were plated out in flat-bottomed 96-well microtiter plates. 100 μ l of medium containing cisplatin at appropriate concentrations were then added immediately and plates were incubated for 48 h. Then 100 μ l of DCPIP solution

(buffer A) were added and kept at 37 °C for 3h. The reduction of DCPIP, expressed as $\Delta DO_{\lambda 600nm}$ for each well, by metabolically active enzyme was quantified by scanning the plates at 600 nm using multi-scan apparatus as described above. The growth inhibition rate was evaluated as percentage of parallel negative controls as follows:

$$[(\Delta DO_{control} - \Delta DO_{experiment}) / \Delta DO_{control}] \times 100$$

$$\Delta DO_{control} = \text{Abs (medium without cells)} - \text{Abs (medium with cells)}$$

$$\Delta DO_{experiment} = \text{Abs (medium without cells)} - \text{Abs (medium with cells and drug)}$$

3. Results

Dehydrogenase enzymes through a series of artificial electron acceptors, such as the catalytic oxidation of succinate by DCPIP, and by colour change, this intermediate can be quantified by spectrophotometer. The DCPIP blue colour gradually fades to its reduced form, which is proportional to the dehydrogenase enzymes vitality, including SDH, can be used to estimate of surviving cell numbers. We have introduced Triton X-100 in order to break down the membrane structures and to solubilise dehydrogenase enzymes into homogenised reaction mixture. Furthermore, all preparations were made in phosphate buffer (200 mM; pH 6.8) to avoid any pH variation in the reaction mixture, which could influence DCPIP absorption. The initial DCPIP concentration used in the present study is always fixed at 25 µg/ml in order to maintain initial absorption ($DO_{\lambda=600\text{ nm}}$) less than 1 unit. The results obtained from this typical cytotoxicity assays indicate that discoloration of DCPIP, which is inversely proportional to the inhibition of P815 cells, was gradually decreased by decreasing cisplatin concentrations in the medium (Fig. 1 a, b). In the same experiment, the MTT formazan produced by survival cells was increased as the concentration of cisplatin decreased (Fig. 1a). Furthermore, the DCPIP absorptions (DO) obtain after 3 h incubation were always significantly lower than those observed in the blank (without cells). Thus, the reduction of DCPIP, expressed as absorption variation ($\Delta DO_{\lambda=600\text{ nm}}$) for each well, by metabolically active enzymes was quantified by scanning the plates at 600 nm using multi-scan apparatus. There was no interference between drug inhibitors used, cisplatin and carvacrol, and the DCPIP dye in a cell free system (not shown).

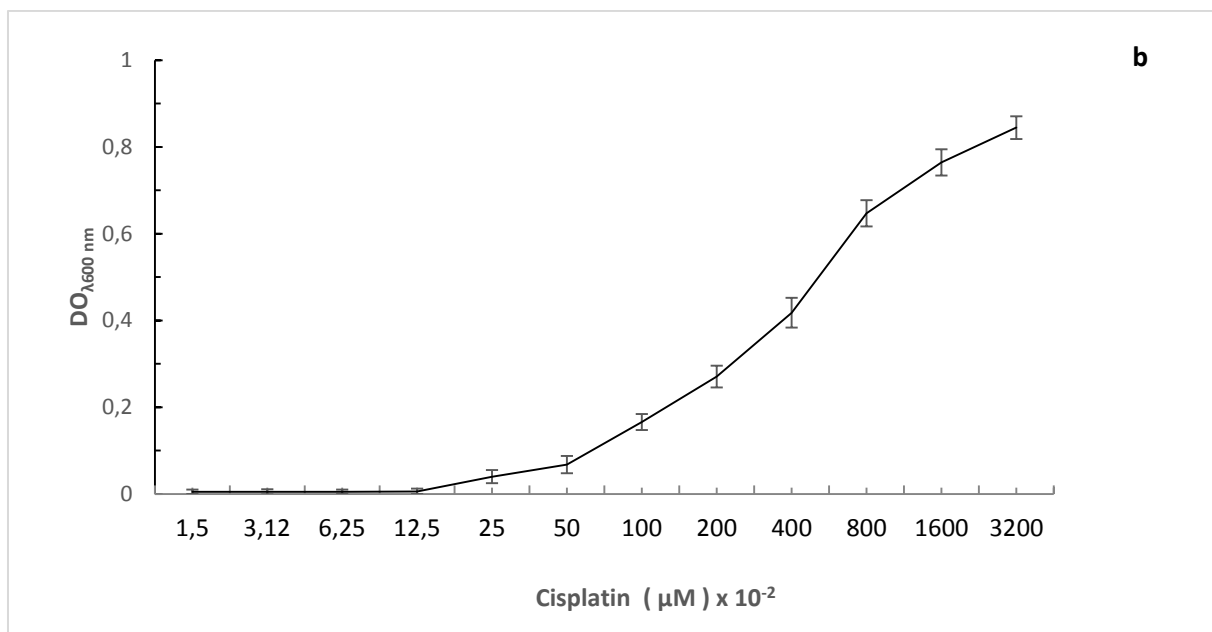
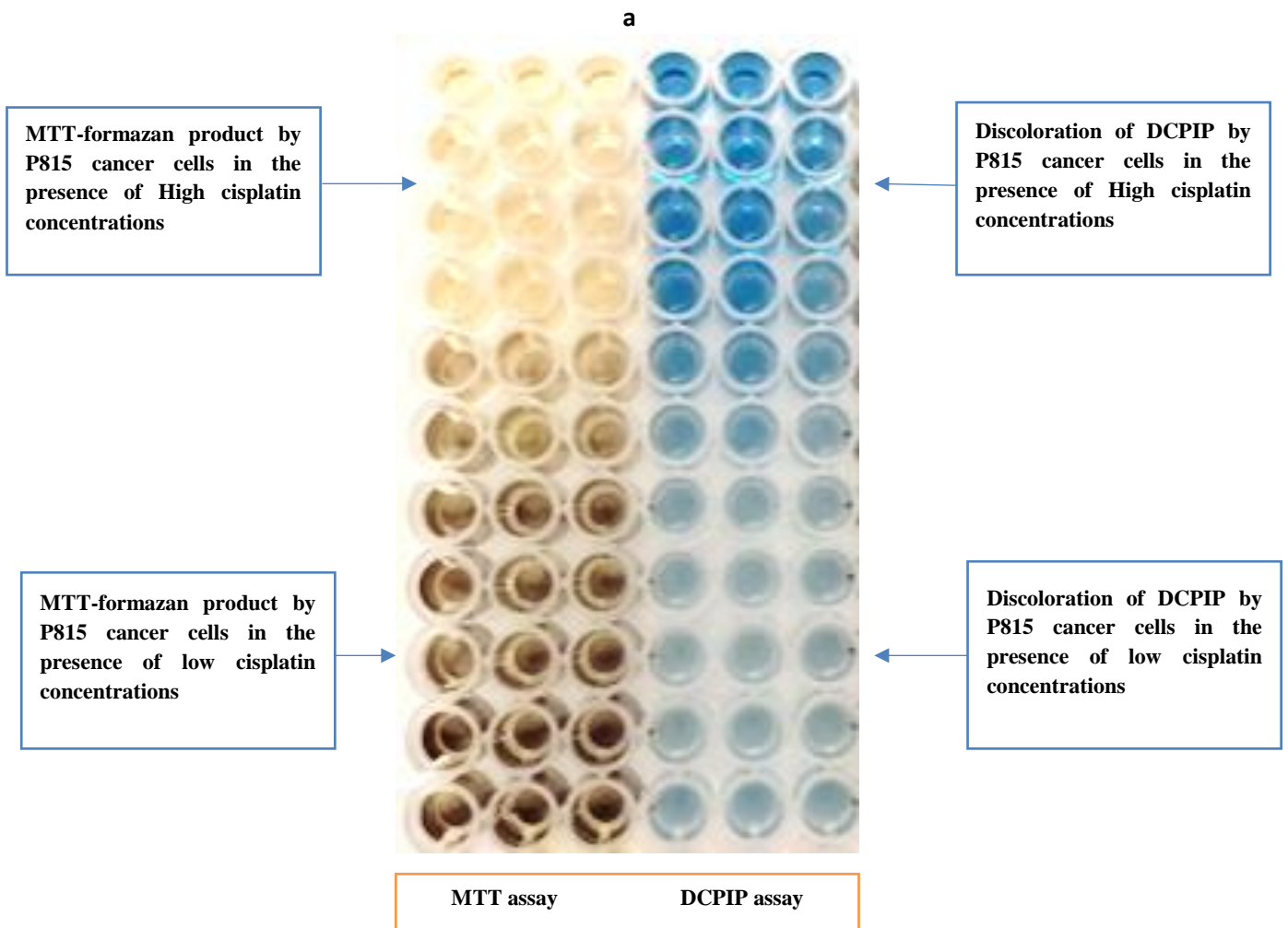


Fig. 1. P815 cells ($5 \times 10^4/\text{ml}$) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the presence of cisplatin at various concentrations. Then the cell growth was evaluated by using the DCPIP assay (a,b), which showing discoloration of DCPIP as the drug concentrations were decreased while MTT formazan product was increased (a). Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

We then investigated the possibility of using DCPIP assay in the assessment of cancer cell growth inhibition by cisplatin (antitumoral drug), as well as carvacrol drug. To valid DCPIP assay, the adherent MCF-7 and MDA-mb 468, and the non adherent P815 cancer cell lines were used and chemosensitivity assays were carried out by using DCPIP assay in paralleled to MTT assay.

3.1. Relationship between DCPIP discoloration and cell number.

We first studied the effect of a number of cells on the discoloration of DCPIP. Regardless of cancer cell lines used, the variation of DCPIP discoloration increased linearly as the number of cells increased (from about 10^4 to 10^6 cells / ml). The relationship between DCPIP discoloration and cell number for the cell lines P815 is shown in Fig. 2. There is a linear relationship up to a cell number of about 10^6 cells per ml. By using DCPIP discoloration as index, cell viability can be assessed over a wide range of cell levels, even at high level 10^6 cells per ml.

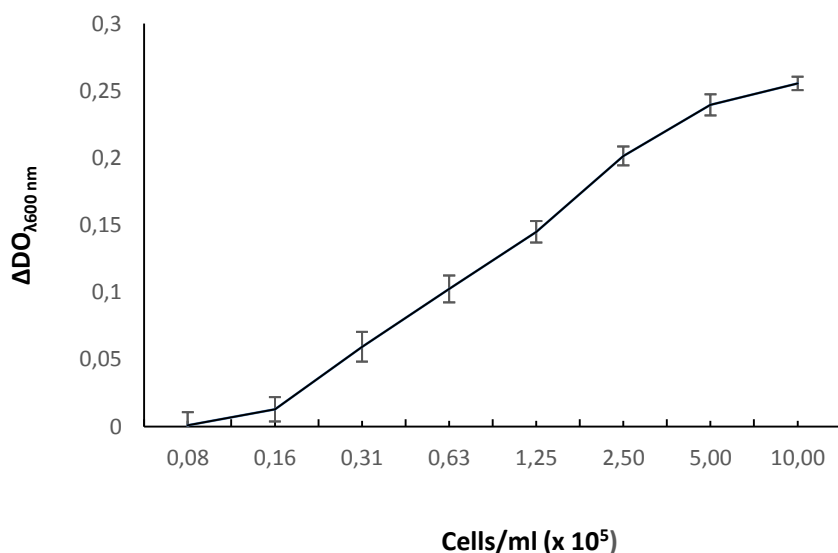


Fig. 2. Effect of cell number on the DCPIP discoloration. Cells (from 8 to 100 $\times 10^4$ cells/ml) were cultured in 96-well culture plates at 37°C for 3 h in the presence of DCPIP (25 $\mu\text{g/ml}$) and then the DO was measured as described in methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

3.2. Cytotoxicity effect of cisplatin and carvacrol on adherent cancer cell lines (MCF7 and MDA-mb468).

The DCPIP assay as well as MTT assay results showed that the dose dependence reduction in the viability of MCF 7 cells after 48 h incubation (Fig. 3a and b). The *in vitro* cytotoxicity effect (IC_{50}) of cisplatin was determined to be $45 \pm 3 \mu\text{M}$ and $95 \pm 4 \mu\text{M}$ by using DCPIP assay and MTT assay, respectively (Fig. 3a). The cytotoxicity trend of cisplatin evaluated by DCPIP assay was significantly correlated to that found with the MTT assay at 48 h incubation in the same conditions. Similarly, The IC_{50} of carvacrol on MCF 7 cancer cells (Fig. 3b) was determined to be $800 \pm 20 \mu\text{M}$ and $1750 \pm 30 \mu\text{M}$ by using DCPIP assay and MTT assay, respectively.

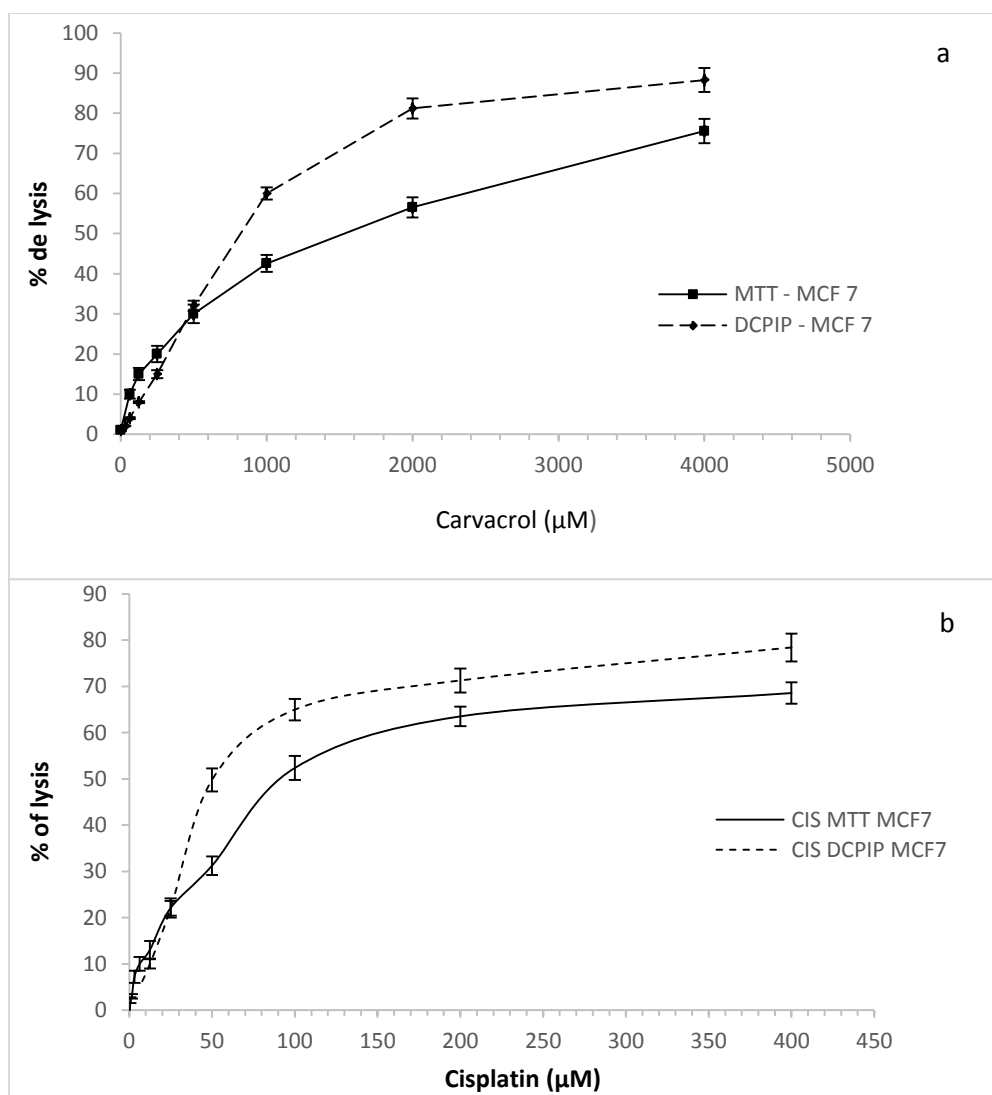


Fig. 3. Cytotoxicity effect of cisplatin (a) and carvacrol (b) on MCF 7 cell lines evaluated by DCPIP and MTT assays. Adherent MCF 7 cells were plated out in 100 μ l of complete medium (10^4 cells per ml) and allowed to attach and grow for 24 h in 96-well culture plates at 37°C. Then the cells were incubation for 48 h in the absence or presence of drugs at indicated concentrations. At the end, the cell viability was determined by DCPIP and MTT assays as described in the methods section .Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

A similar relationship is also observed for the non adherentMDA-mb468 cell line (Fig. 4). Indeed, the inhibition of MDAMB468 cell growth was gradually increased as the drug concentrations increased. This effect was evaluated regardless of whether method assays were used, DCPIP or MTT assay. The *in vitro* cytotoxicity effect (IC_{50}) of cisplatin was determined to be $1.3 \pm 0.08 \mu$ M and $4.3 \pm 0.2 \mu$ M by using DCPIP assay and MTT assay, respectively (Fig. 4a). In the same conditions, the IC_{50} of carvacrol on MDAMB468 cancer cells (Fig. 4b) was determined to be $1000 \pm 40 \mu$ M and $1000 \pm 47 \mu$ M by using DCPIP assay and MTT assay, respectively.

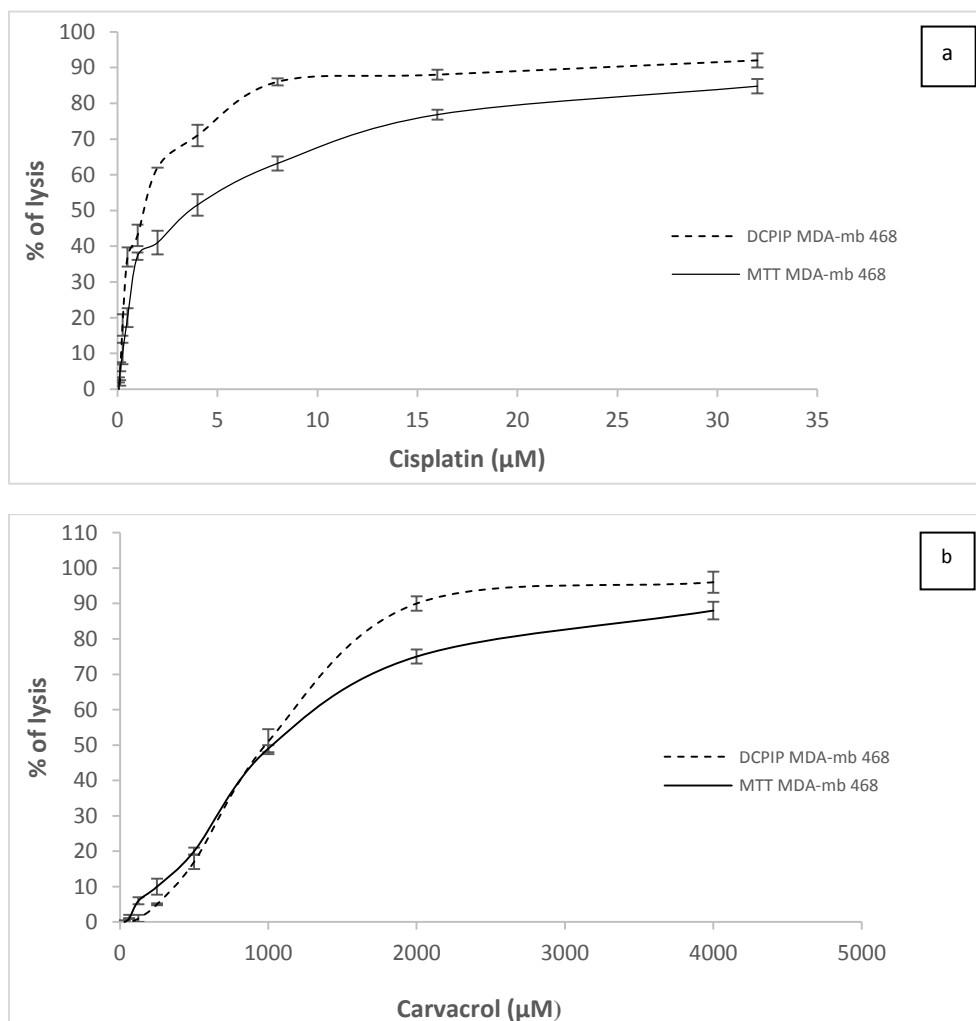


Fig. 4. Cytotoxicity effect of cisplatin (a) and carvacrol (b) on MDA-mb468 cell lines evaluated by DCPIP and MTT assays. MDA-mb468 cells were plated out in 100 µl of complete medium (10^4 cells per ml) and allowed to attach and grow for 24 h in 96-well culture plates at 37°C. Then the cells were incubation for 48 h in the absence or presence of drugs at indicated concentrations. At the end, the cell viability was determined by DCPIP and MTT assays as described in the methods section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

3.3. Cytotoxicity effect of cisplatin and carvacrol on non adherent P815 cell line

The anti-proliferative activity of cisplatin as well as that of carvacrol on P815 cancer cells was also evaluated by MTT and DCPIP assay. As shown in figure 5, a dose dependent decrease in the growth of P815 was obtained with increasing concentrations of carvacrol or cisplatin. As antitumoral drug, the IC_{50} for cisplatin was found to be $3.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ by using DCPIP assay and MTT assay, respectively (Fig.5a), as previously reported for leukemic cell lines, CEM, HL60, U937 and K562 (Su WC et al., 2000). Also, the *in vitro* cytotoxicity effect (IC_{50}) of carvacrol on P815 cell line was evaluated to be $200 \pm 10 \mu\text{M}$ and $300 \pm 25 \mu\text{M}$ by using DCPIP assay and MTT assay, respectively (Fig. 5b), which is in agreement with those found previously on chronic myeloid leukemia K562 cells (Ravi et al., 2012)

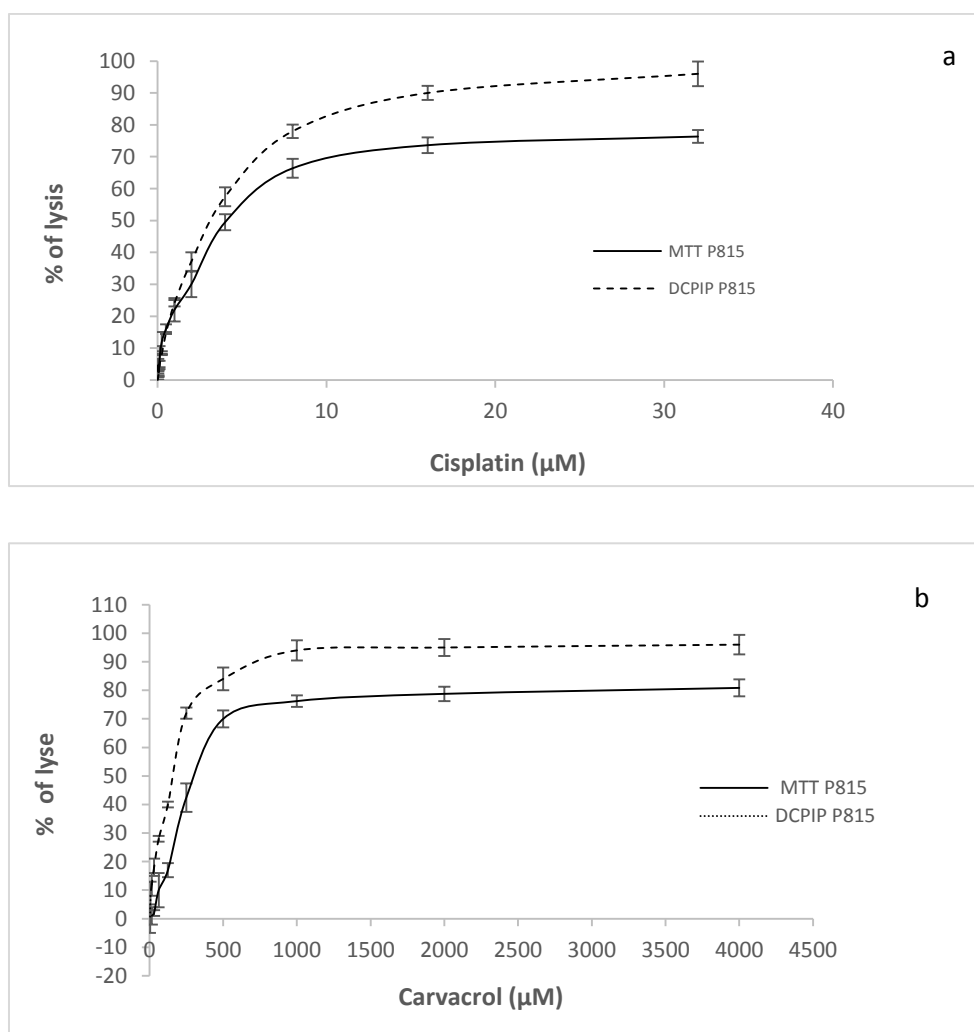


Fig. 5. Effect of Cisplatin (a) and carvacrol (b) on P815 cell growth. P815 cells (5×10^4 /ml) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of cisplatin at various concentrations. Then the cell growth was evaluated by using the DCPIP assay Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D.

The DCPIP method proposed here is based on the reduction of DCPIP by TX-100 solubilised dehydrogenase enzymes, whereas the MTT method is based on the enzymatic conversion of MTT in the mitochondria of survival cells. However, both cytotoxicity assays, carried out to assess drug toxicity screening *in vitro*, showed the similar results and can be used for both adherent and non adherent cell lines.

4. Discussion

Preclinical testing is vitally important to eliminate unsuitable candidates before the expense of clinical research is incurred. The use of cell culture for the initial preclinical screening of potential therapeutic compounds has become commonplace as cultured cells can be selected to represent the disease of interest or its associated biochemical anomalies (Allen et al., 2005). It is of vital importance to obtain accurate and reliable results from the *in vitro* cytotoxicity assays employed in the initial drug screening as this data may influence the success of a drug candidate to proceed into the development process. When considering a cell enumeration assay a number of variables must be taken into account, including potential interferences, linearity, sensitivity and reproducibility of the assay. Assays used in the initial screening of potential anticancer compounds must be sufficiently sensitive to detect small differences in cell number, yet robust enough to generate reproducible results under various controlled experimental conditions. Further advantages for an assay are a simple experimental procedure so that reliable data is obtained from the first experiment and the potential for automation. These characteristics would ensure that *in vitro* cytotoxicity data can be obtained in a time- and cost-effective manner.

In the present study, we describe a rapid, very cheap and simple chemo-sensitivity assay that gives results closely similar to those obtained by the most used MTT assay. It can be used for both adherent and non adherent cell lines. This may enhanced a large screening of pure substances or fractions originated from chemical synthesis or natural sources, particularly in poor countries.

Dehydrogenase enzymes through a series of artificial electron acceptors, such as DCPIP catalytic oxidation of succinate occur and by means of colour change, this intermediate can be quantified by spectrophotometer. The DCPIP blue colour gradually fades to its reduction form, which is proportional to the dehydrogenases vitality including SDH, can be used to

estimate inhibition cancer cell growth. As SDH is the inner mitochondrial membrane-bound enzyme, we have introduced Triton X-100 in order to break down the membrane structures and to solubilise dehydrogenase enzymes into homogenised reaction mixture. Furthermore, all preparations were made in phosphate buffer (200 mM; pH 6.8) to avoid any pH variation in the reaction mixture, which could influence DCPIP absorption. The initial DCPIP concentration used in the present study was always fixed at 25 µg/ml in order to maintain initial absorption ($DO_{\lambda=600\text{ nm}}$) less than 1 unit. Under these conditions, the discoloration (reduction) of DCPIP was always correlated to the number of cultured cancer cells as shown in Fig.2. To valid DCPIP assay as new method for evaluating cell viability, the adherent MCF-7 and MDA-mb 468 as well as non adherent P815 cancer cell lines were used and chemo-sensitivity assays were carried out by using DCPIP assay in paralleled to MTT assay. The tetrazolium-based MTT assay relies on enzymatic conversion of the dye to formazan crystals mainly in intact mitochondria, whereas the DCPIP assay is based on enzymatic reduction of DCPIP by solubilised dehydrogenases (including SDH). However, both chemo-sensitivity carried out to assess cytotoxicity *in vitro* of cisplatin and carvacrol showed similar dose dependence inhibition on cancer cells viability after 48 h incubation (Fig. 3, 4 and 5). It has been reported previously that different cytotoxicity tests may give different results depending on the test agent used and the cytotoxicity test used (Weyermann et al., 2005). However, in this study, the change in IC_{50} values assessed by both the MTT assay and DCPIP assay were not significant (less than 3-fold), regardless of the cells used (adherent or non-adherent) (Table I). Generally, all *in vitro* cytotoxicity effect (IC_{50}) evaluated here are in agreement with those found previously on breast cancer cells (Praseetha et al., 2013), on chronic myeloid leukemia K562 cells [Ravi et al., 2012], leukemic cell lines, CEM, HL60, U937 and K562 [Su WC et al., 2000].

Tableau I. IC₅₀ of cisplatin and carvacrol on adherent and non adherent cell lines determined by both DCPIP and MTT assays

Cell line	Cisplatin (μM)		Carvacrol (μM)	
	MTT assay	DCPIP assay	MTT assay	DCPIP assay
P815	4 ± 0,3	3,5 ± 0,2	300 ± 10	200 ± 15
MCF7	95 ± 4	45 ± 3	1750 ± 30	800 ± 20
MDA-mb 468	4,3 ± 0,2	1,3 ± 0,08	1000 ± 40	1000 ± 50

The use of DCPIP assay proposed in the present work is a good alternative and/or complementary to the method of MTT assay. Indeed, there is no dependence of the DCPIP assay on cell metabolic function which can influence results as reported for MTT assay (Van Tonder et al., 2015). As the DCPIP assay is carried out with homogenised cells, the discoloration (reduction) of DCPIP was correlated to the reductive potential of whole dehydrogenase enzymes, including SDH. As the enzyme quantity is closely related to the surviving cell number in the micro cultures, DCPIP method can be used to evaluate the *in vitro* inhibition cell growth. Furthermore, there is no need for washing and solubilisation steps, making this DCPIP method more accurate, most time- and cost-effective assay for preliminary cytotoxicity screening.

Conflict of interest

None declared

Acknowledgement

This work was supported by Soultan Moulay Slimane University (Morocco). The author's would like to acknowledge Pr. Michel LEPOIVRE (University of Paris Sud, Orsay, France) for her gift of the P815 cell line and Dr Thierry DUBOIS (Curie Institute, Paris, France) for her gift of the adherent human breast cancer cell line (MCF7) and human triple-negative breast cancer cell line (MDA-mb 468).

References

- Allen, D.D., Caviedes, R., Càrdenas, A.M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J., Caviedes, P.A., 2005. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31, 757–68.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbot, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589-601.
- Alet van Tonder, Annie, M., J., Cromarty, A, D., 2015. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-oyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMV. Research Notes.* 8, 47.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474-482.
- Carmichael, J., DeGaff, W.G., Gazdar, A.F., Minna J.D., and Mitchell, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- Septisetyani, E.P., Ningrum, R.A., Romadhani, Y., Wisnuwardhani, P.H., Santoso, A., 2014. Optimization of sodium dodecyl sulphate as a formazansolvent and comparison 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with WST-1 assay in MCF-7 cells. *Indonesian J. Pharm.* 25 (4), 245–254.
- Ganapathy-Kanniappan, S., Morgan, R.H., 2010. The pyruvic acid analogue 3-bromopyruvate interferes with the tetrazolium reagent MTS in the evaluation of cytotoxicity. *Assay Drug Dev Techn.* 8(2), 258–62.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55–63.
- Ravi, A., Alvala, M., Sama, V., Kalle, A.M., Irlapati, V.K., Reddy, B.M., 2012. Anticancer activity of Pupalialappacea on chronic myeloid leukemia K562 cells. *DARU J. Pharmaceutical Sciences.* 20, 86.
- Su, W.C., Chang, S.L., Chen, T.Y., Chen, J.S., Tsao, C.J., 2000. Comparison of In Vitro Growth-inhibitory Activity of Carboplatin and Cisplatin on Leukemic Cells and Hematopoietic Progenitors: the Myelo suppressive Activity of Carboplatin May Be Greater Than Its Antileukemic Effect. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 30, 562-567.
- Van Rensburg, C.E.J., Anderson, R., Jooné, G., Myer, M.S., O'Sullivan J.F., 1997. Novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines are potent inhibitors of P-glycoprotein activity in a multi drug resistant cancer cell line. *Anti-Cancer Drug.* 8, 708–13.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. I. *J. Pharmaceutics.* 288, 369-376.

Résultats

Axe de recherche II : Evaluation de l'effet cytotoxique sur les différentes lignées tumorales et l'effet antioxydant des différentes molécules nouvellement synthétisées, famille des dihydropyrimidinones, les dérivés Hydrazones et les Systèmes Hétérocycliques Nitré.

5.4. Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'effet anticancéreux et antibactérien des composés chimiques nouvellement synthétisés, famille des dihydropyrimidinones (DHPMs) (Article en préparation).

5.5. Synthèse et évaluation biologique des dérivés hydrazones en tant qu'agent cytotoxique et antioxydant

[Synthesis and Biological Evaluation of Some Hydrazones as Cytotoxic and Anti-antioxidant Agents].
(Article en préparation).

5.6. Etudes électrochimiques et pouvoir antioxydant des Systèmes Hétérocycliques Nitré. (Article en préparation)

Les résultats dans cette partie sont le fruit d'une collaboration apaisante et constructive avec le Professeur KHOUILI M1, le Professeur HAHID A1, et le Professeur CHTAINI A2.

1 Laboratoire de Chimie Organique et Analytique, FST Beni-Mellal

2 Laboratoire d'électrochimie moléculaire et matériaux inorganiques, FST Beni-Mellal

Les résultats obtenus sont très encourageants pour certaines molécules avec des effets anticancéreux (IC_{50}) aussi bien, si non mieux, que le cis-platine (anticancéreux de référence). Parallèlement, un effet antioxydant est systématiquement déterminé par le test DPPH. Certaines molécules possèdent des pouvoirs antioxydants comparable à celui de la vitamine C (contrôle positive). Cette collaboration avec les laboratoires de chimie de la FST Beni Mellal va nous permettre sans doute de sélectionner les molécules « tête de série » et d'envisager une relation structure activité afin d'orienter la synthèse chimique. Ces travaux déjà réalisés font l'objet de trois publications en préparation :

- 5.4. Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'effet anticancéreux et antibactérien des composés chimiques nouvellement synthétisés, famille des dihydropyrimidinones (DHPMs) (Article en préparation) ;
- 5.5. Synthèse et évaluation biologique des dérivés hydrazones en tant qu'agent cytotoxique et antioxydant. (Article en préparation);
- 5.6. Etudes électrochimiques et pouvoir antioxydant des systèmes Hétérocycliques Nitré. (Article en préparation).

5.4. Evaluation du pouvoir anti-oxydant et de l'effet anti-cancéreux et bactérien des composés chimiques nouvellement synthétisés, famille des dihydropyrimidinones (DHPMs)

(Article en préparation)

**Ces travaux font partie d'une thèse déjà soutenue le 12 Mai 2018
A la FST de Beni Mellal**

En collaboration avec le Professeur HAFID A. et le Professeur KHOULI M.
Laboratoire de Chimie Organique et Analytique, FST Beni-Mellal

Les dihydropyrimidinones (DHPMs) sont connues pour leur large spectre d'activités biologiques telles que les antihypertenseurs, anticancéreux, antibactériens, anti malaria, anti-inflammatoire, inhibiteur des canaux calciques, et antagoniste neuropeptide γ [1]. Ci-dessous quelques exemples de dihydropyrimidinones biologiquement actives.

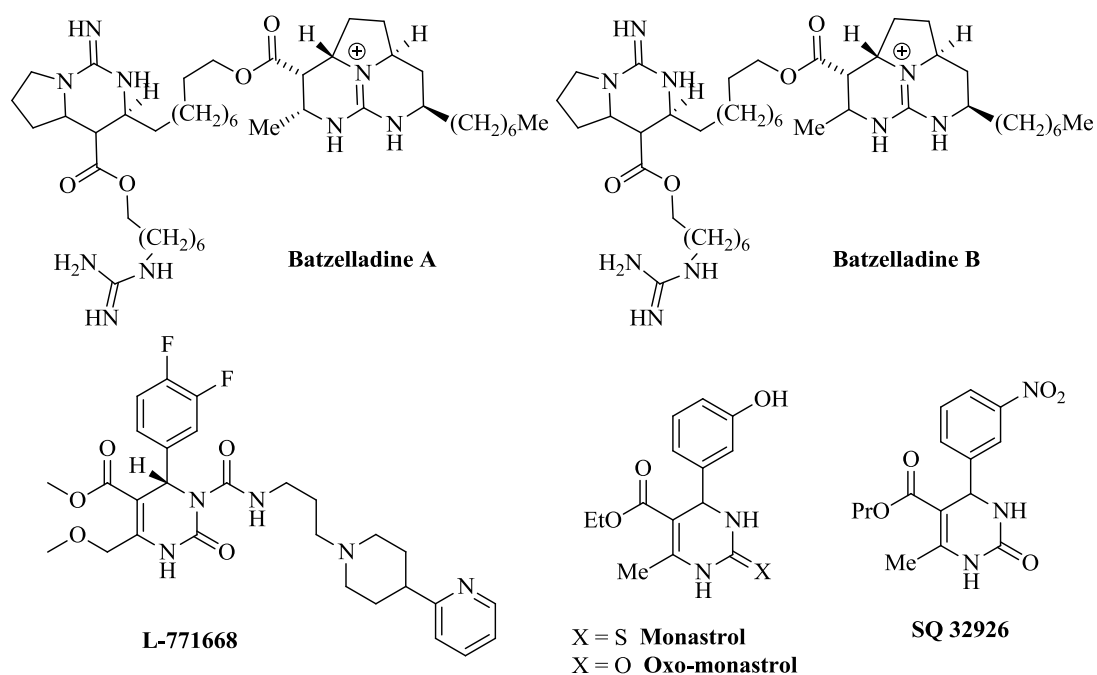


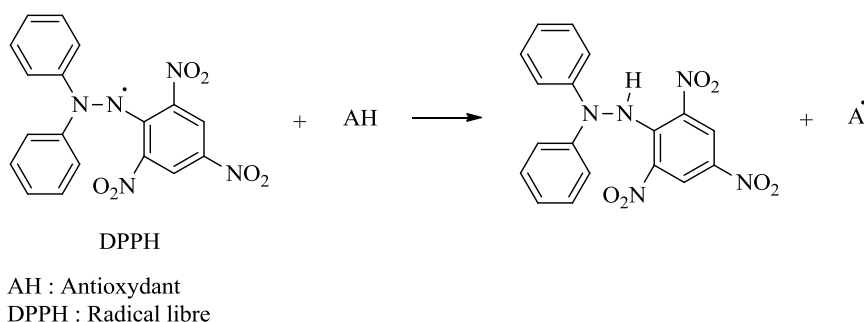
Figure 21 : Exemple de composés naturels et synthétiques contenant le noyau dihydropyrimidinique (DHPM)

Le monastrol (Fig. 18) est le composé anticancéreux le plus important avec une capacité de traverser la membrane cellulaire. Il bloque la mitose par inhibition réversible et spécifique de la myosine kinase Eg5 [5]. Autres analogues de monastrol tels que les dérivés oxo-monastrol, thio et 3,4-méthylènedioxy ont été développés et testés contre les lignées cellulaires du cancer du côlon HT-29 [2-4]. Le monastrol est un anticancéreux qui agit au niveau de la mitotique [5]. Cependant, des effets secondaires notamment neuro-toxique ont été rapportés [6-9].

Les radicaux libres sont des molécules possédant des électrons non appariés dans leurs orbitales externes. Les cellules sont constamment exposées aux radicaux libres créés par les rayonnements électromagnétiques provenant de l'environnement. Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que

l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci.

Le pouvoir antioxydant est mesuré en utilisant des radicaux libres plus stables. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. L'évaluation de l'activité antioxydante est basée sur la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène à la molécule du DPPH, au cours de la réaction, induisant ainsi un changement de coloration dans la solution initiale. L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 517 nm.



Plus le composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène plus il est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est inversement proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration nécessaire d'un composé pour faire disparaître de 50% le DPPH à l'équilibre est connue comme l'IC₅₀. De point de vue méthodologique, le test du DPPH présente l'avantage d'être rapide et reproductible. Le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant les groupements SH, NH ou OH. Il s'effectue à température ambiante et permet ainsi d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

5.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés dihydropyrimidinones (DHPMs), nouvellement synthétisés

La solution standard de la vitamine C (contrôle positif) est de 1 mg/100 µl de méthanol. Une solution de DPPH (1 mg/25 ml de Méthanol) est préparée comme témoin.

Dans des plaques de 96 puits, les produits sont solubilisés dans un volume approprié du DMSO pour avoir une concentration de 20 mg/ml. Dans des plaques de 96 puits, 16 µl de la solution de chaque produit et 16 µl de la vitamine C (10 mg/ml) sont ajoutés au méthanol pour avoir un volume final de 200 µl. En suite 100µl est transféré dans le puits suivant contenant 100 µl du méthanol (dilution 1/2). La même procédure est répétée pour réaliser les dilutions en cascade 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128. Après quoi, 150 µl de DPPH (1mg/25 ml méthanol) sont ajoutés dans chaque puits contenant 100 µl du mélange puis incubé 30 minutes dans l'obscurité à 37°C. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 517 nm. Le blanc est un mélange du méthanol et le réactif DPPH dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés comme étant le pourcentage de l'activité anti radicalaire.

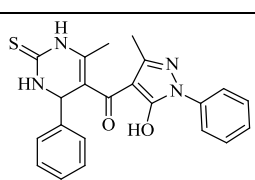
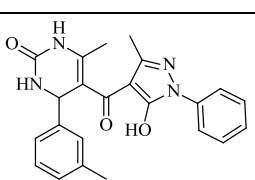
A noter, que pour certains produits une dilution préalable de 1/30 dans du DMSO était nécessaire à cause de leur fort effet antioxydant.

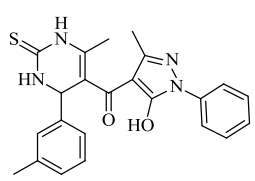
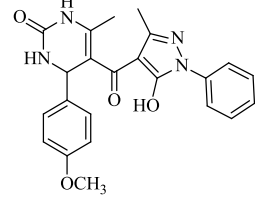
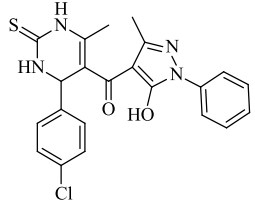
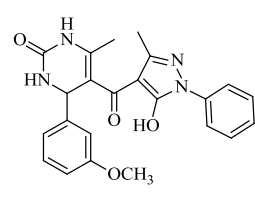
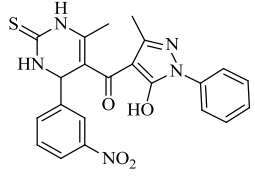
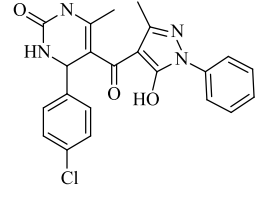
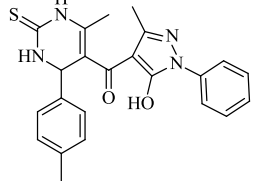
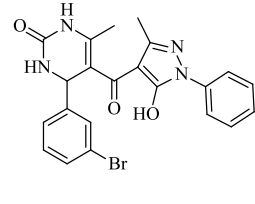
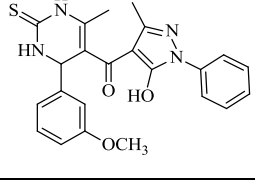
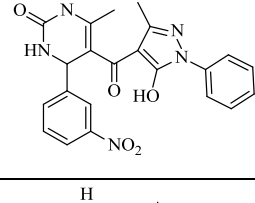
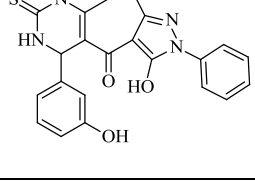
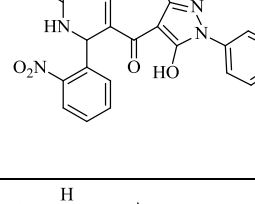
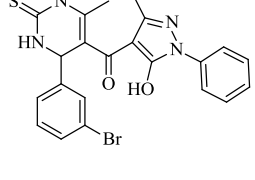
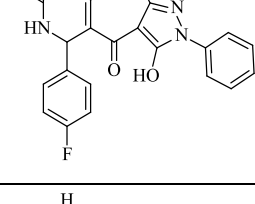
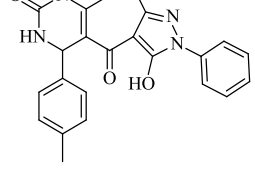
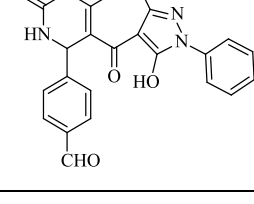
L'activité de piégeage des radicaux a été exprimée en pourcentage de neutralisation du radical DPPH selon la relation :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'échantillon})}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

La valeur de l'IC₅₀ déterminée à partir du graphique tracé de l'activité de piégeage en fonction des différentes concentrations de chaque produit, est définie comme la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration de radicaux DPPH initiale (Tableau X).

Tableau X : IC₅₀ (exprimé en µg/ml) des composés testés pour leur activité antioxydante

Produits	Structures	IC ₅₀	Produits	Structure	IC ₅₀
3		48,00	17		32,50

4		31,60	18		32,80
5		78,10	19		10,60
6		17,30	20		64,10
8		24,70	22		23,90
9		5,30	23		22,90
10		10,40	24		16,90
11		21,70	25		102,50
15		20,00	26		30,60

Nous remarquons que les composés (**6**, **9**, **19**, **24** et **10**) des dihydropyrimidines portant en position 4 les groupements 3-métoxyphényle, 3-hydroxyphényle, 2-nitophényle et 3-nitrophényle ont présenté une meilleure activité antioxydante avec des IC_{50} de 5,3; 10,4; 10,6; 16,9 et 17,3 μ g, respectivement. Le radical DPPH est de couleur pourpre et, après la réaction avec des donneurs d'hydrogène des antioxydants, la couleur devient jaune. Les composés testés possèdent une activité antioxydante relativement importante en comparaison avec la vitamine C (contrôle positif).

5.4.2. Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne des dihydropyrimidines est évaluée à la fois par la méthode des puits et la méthode des microplaques.

✓ Méthode des puits

A l'aide d'un emporte-pièce stérile, des puits d'environ 6 mm de diamètre ont été effectués dans la gélose. Dans chaque puits, on introduit 80 μ l de la solution des molécules à tester dans le DMSO avec différentes concentrations (50, 100, 150, 200 et 250 mg/ml). Après 30 min de diffusion à la température ambiante, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. La présence ou non d'une zone d'inhibition a été observée à l'oeil nu.

✓ Détermination de l' IC_{50} sur les microplaques

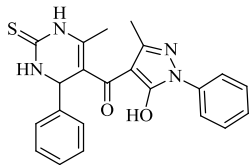
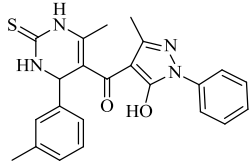
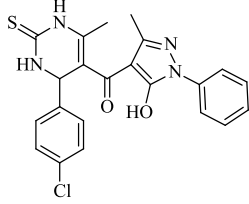
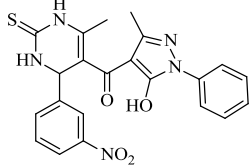
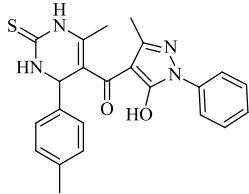
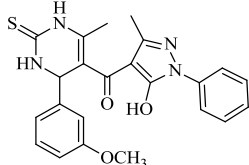
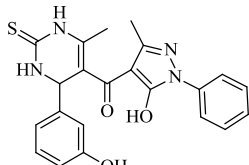
La croissance des bactéries sous l'effet de différentes concentrations des molécules synthétisées est surveillée par la mesure de la densité optique.

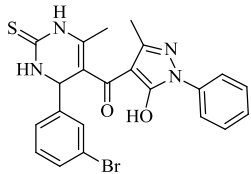
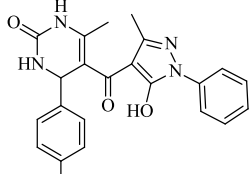
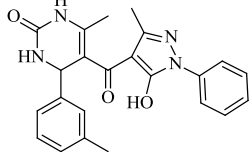
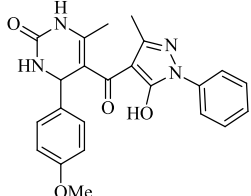
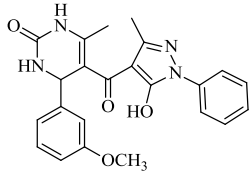
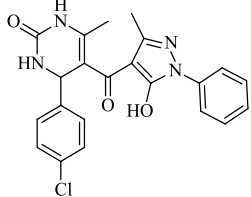
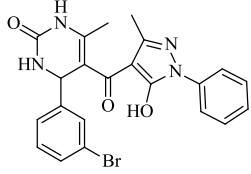
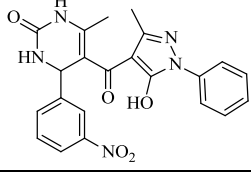
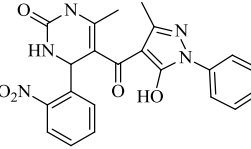
L'objectif consiste à déterminer la concentration qui réduit le taux de la population microbienne de 50% par rapport à celle du contrôle. Ce test vient compléter les essais antimicrobiens réalisés par la méthode des disques ou la méthode des puits. Le protocole suivi consiste à déterminer la densité optique (DO) après et avant l'incubation de chaque tube contenant la suspension de la molécule à tester.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(\text{DO Blanc} - \text{DO Echantillon})}{\text{DO Blanc}} \times 100$$

Les résultats de l'IC₅₀ obtenus sont résumés dans le tableau XI suivant :

Tableau XI : Résultats des tests de l'IC₅₀ de l'activité antibactérienne en µg/ml

Composés	Structures	<i>E.coli</i> ATCC	<i>Staph. aureus</i> ATCC
3		9,1	7,2
4		2,25	1,09
5		0,58	0,33
6		1,30	0,87
8		1,88	0,97
9		2,50	1,80
10		0,87	2,10

11		5,13	4,90
15		>100	76,12
17		95,2	85,50
18		>100	88,62
19		80,30	72,40
20		0,80	0,67
22		>100	>100
23		3,38	3,91
24		2,53	4,26

25		0,59	0,73
26		34,04	15,24

Les résultats ont montré que la plupart des composés testés ont une activité antibactérienne remarquable. L'activité a été montrée en termes de la concentration inhibitrice 50% de prolifération microbienne (IC₅₀). Cette étude a révélé que lorsque le cycle benzénique est substitué par des halogènes comme le chlore, le nitro, le fluor et le brome, une amélioration de l'activité des composés est observée. D'autre part, le soufre augmente l'activité d'une façon remarquable comparativement à l'oxygène. Les composés **10**, **20** et **25** se sont révélés être les composés les plus actifs.

5.4.3. Evaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des pyrazolo-énaminones, bipyrazoles et bipyrazolo-pyridines

A. Activité antibactérienne

Tableau XII : Résultats du test antibactérien des différents composés sur la Bactérie Escherichia coli

Composé	Zones d'inhibition (mm)				
	2mg/ml	4mg/ml	5mg/ml	6mg/ml	8mg/ml
2b	12	13	15	15	16
57	6	7	7	7	7
58	15	14	14	17	17
59	13	9	7	7	6
60	9	18	15	12	10
61	16	14	15	17	19
62	10	27	23	16	9
66	6	9	8	8	10
68	10	8	8	6	7
74	10	11	11	13	14
75	12	8	9	9	1
76	10	5	6	8	7

77	9	10	10	12	17
78	10	11	11	10	12
80	15	16	17	14	16
81	19	18	9	11	12
82	7	7	8	7	8

Tableau XIII : Résultats du test antibactérien des différents composés sur la Bactérie *staphylococcus aureus*

Molécule	Zone d'inhibition (mm)				
	2mg/ml	4mg/ml	5mg/ml	6mg/ml	8mg/ml
2b	9	10	12	10	10
57	12	8	8	8	7
58	12	8	7	11	11
59	13	12	8	7	10
60	14	10	10	13	13
61	16	12	12	10	11
62	19	8	11	12	16
66	11	11	10	10	10
68	15	12	10	10	12
74	9	10	10	14	12
75	9	9	13	16	12
76	11	10	13	13	15
77	7	9	8	6	5
78	12	9	11	9	8
80	12	9	9	10	10
81	14	11	12	14	16
82	9	13	8	8	10

Tableau XIV : Résultats des zones d'inhibition (en mm) du test antibactérien des antibiotiques

Bactéries	Antibiotiques			
	C	CN	TE	AMC
<i>Escherichia coli</i>	22	26	15	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	15	21	22

D'après les résultats obtenus (Tableau XII, XIII et XIV), nous avons conclu que les composés **58**, **61**, **62**, **74**, **80** et **81** étaient plus actifs que les autres composés contre *Escherichia coli*. D'autre part les mêmes composés se sont révélés être actifs contre *Staphylococcus aureus* en plus le composé **68**. La présence des groupes 4-chloro et 3-hydroxy

ainsi que le thiazole joue un rôle dans l'activité antibactérienne des pyrazolo-énaminones, et que le 4-nitrophényle augmente l'activité des composés bipyrazoliques. D'autre part, les bipyrazolopyridines et les pyrazolo-diazocine-diones ont souvent présenté une bonne activité antibactérienne.

B. Activité antioxydante

Nous avons utilisé la même méthode que pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés dihydropyrimidines (voir ci-dessus). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XV.

Tableau XV : Résultats du test antioxydant

Composés	IC₅₀ µg/ml	Composés	IC₅₀ µg/ml
2	80	74	180
57	20	75	40
58	34	76	80
59	90	77	40
60	39	78	21
61	40	80	20
62	20	81	100
66	5,7	82	48
68	20	Vitamine C	5

Le composé **66** s'est révélé être le composé le plus actif, il présente une activité antioxydante aussi bien que la vitamine C (standard), cette activité est due au groupe 4-hydroxy du pyrazolo-énaminone, de même pour les composés **62**, **68**, **80** et **57**, nous avons noté une bonne activité grâce à la présence du groupe hydroxy. Cette étude a révélé que les pyrazolo-pyridines ont une bonne activité anti-oxydante.

Références

- [1]. Brands M., Endermann R., Gahlmann R., Kruger J. Raddatz S. Dihydropyrimidinones – a new class of anti-staphylococcal antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett.* 13:241-245.
- [2]. Russowsky, D.; Canto, R. F.; Sanches, S. A.; D’oca, M. G.; De Fatima, A.; Pilli, R. A.; Kohn, L. K.; Antônio, M. A.; De Carvalho, J. E. *Bioorg. Chem.* 2006, 34,173-182.
- [3]. Chang, R. S.; Chen, T.B.;O’Malley, S. S.;Pettibone,D. J.; Disalvo, J.; Francis, B.; Bock, M. G.;Freidinger, R.; Nagarathnam, D.;Miao, S. W. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 409, 301-312.
- [4]. Atwal, K. S.; Swanson, B. N.; Unger, S. E.; Floyd, D. M.; Moreland, S.; Hedberg, A.; O’Reilly, B. C. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 806-811.
- [5]. Qian, X.; Wolff A. A.; Bergnes, G. *Annu. Rep. Med. Chem.* 2006, 41, 263-274.
- [6]. Luszcki, J. J.; Jankiewicz, K.; Jankiewicz M.; Czuczwar, S. J. *Eur. J. Pharmacol.* 2007, 562, 53-59.
- [7]. Dragunow, M. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1990, 36, 751-755.
- [8]. Robertson, H.; Riives, M.; Black D.; Peterson, M.A. *Brain Res.* 1984, 291, 388-390.
- [9]. Diasio R. B.; Harris, B. E. *Clin. Pharmacokinet.* 1989, 16, 215-237.

5.5. Les dérivés hydrazino-hétérocycliques

Synthesis and Biological Evaluation of Some Hydrazones as Cytotoxic and Anti-antioxidant Agents.

(Article en préparation).

(Voir ci-après)

5.5.1. Les dérivés hydrazone

Les activités pharmacologiques des hydrazones sont très large, incluent effets antibactérien, anticonvulsivant, analgésique, anti-inflammatoire, cardio-protecteur, antiplaquettaire, anticancéreux etc. Avec une bonne conception, une synthèse orientée par une étude relation structure-activité appropriée, un certain nombre de composés peuvent être développés avec des activités biologiques prometteuses.

Activité anticancéreuse

Organisation mondiale de la santé définit le cancer comme la création rapide de cellules anormales qui poussent au-delà de leurs limites habituelles et qui peuvent envahir les parties adjacentes du corps et se propager à d'autres organes. Le nombre de dérivés hydrazones synthétisés puis évalués sur les différentes lignées cancéreuses est considérable. On se limitera ici à quelques exemples. La plumbagine dérivés de l'hydrazone présente une activité élevée contre le cancer du sein [1,2]. Des dérivés de la prégnanolone, cyanoacétylhydrazone, actifs contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses [3, 4]. Des dérivés de l'acétylhydrazone ont montré un effet cytotoxique sur les lignées cellulaires, A549, HCT11b, HepG2, PC-9 et A375 avec des IC₅₀ compris entre 4 à 17 µM [5]. En fin l'arylhydrazone synthétisés aurait un IC₅₀ de 6,7 nM contre les lignées MDA-MB231 et MCF-7 [6-8].

Activité sur système nerveux central (SNC)

Les hydrazones possèdent des activités pharmacologiques contre divers troubles du système nerveux central. En effet, les maladies du système nerveux central peuvent en affectant le cerveau ou la moelle épinière provoquées des désordres psychologiques et neurologiques.

Des dérivés comme le 2-méthoxyacylhydrazone ont été synthétisés et évalués pour leur pouvoir inhibiteur de la phosphodiastérase 10A (PDE10A), enzyme impliqué dans les troubles neurologiques et psychologiques comme la schizophrénie [9,10]. Certains bishydrazones et hydrazones ont été également développés en tant que antidépresseur par [11-15].

Le paludisme, maladie infectieuse répandue dans les tropiques, est causé par *Plasmodium*. Des antipaludéens, dérivés d'hydrazines, contre les souches plasmodiales D10, W2 et 3D7 avec une valeur IC₅₀ de 39,2, 79,0 et 11,0 nM, respectivement, ont montré une activité

antiparasitaire très intéressante [16]. D'autres travaux ont montré que certains dérivés d'hydrazines sont létales pour *Plasmodium falciparum* et que le mécanisme d'action impliquerait l'inhibition du métabolisme phospholipidique [17].

La synthèse chimique des dérivés hydrazones, basée sur la relation structure activité, pourrait déboucher sur des molécules « tête de série » extrêmement prometteuses.

Dans cette optique nous nous sommes intéressés dans un premier temps à établir une relation entre l'effet antioxydant et l'effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses adhérentes et non adhérentes (MCF7, MDAMB468 et P815). Le pouvoir antioxydant est déterminé par le test DPPH (voir partie méthode pour détail) en comparaison avec la vitamine C (test de référence). Les dérivés hydrazones utilisés (synthétisés ou achetés) dans cette étude montrent un effet antioxydant progressif et proportionnel à la concentration des drogues (Figure 21) avec des IC_{50} entre 13 et 90 $\mu\text{l/ml}$ (Tableau XV).

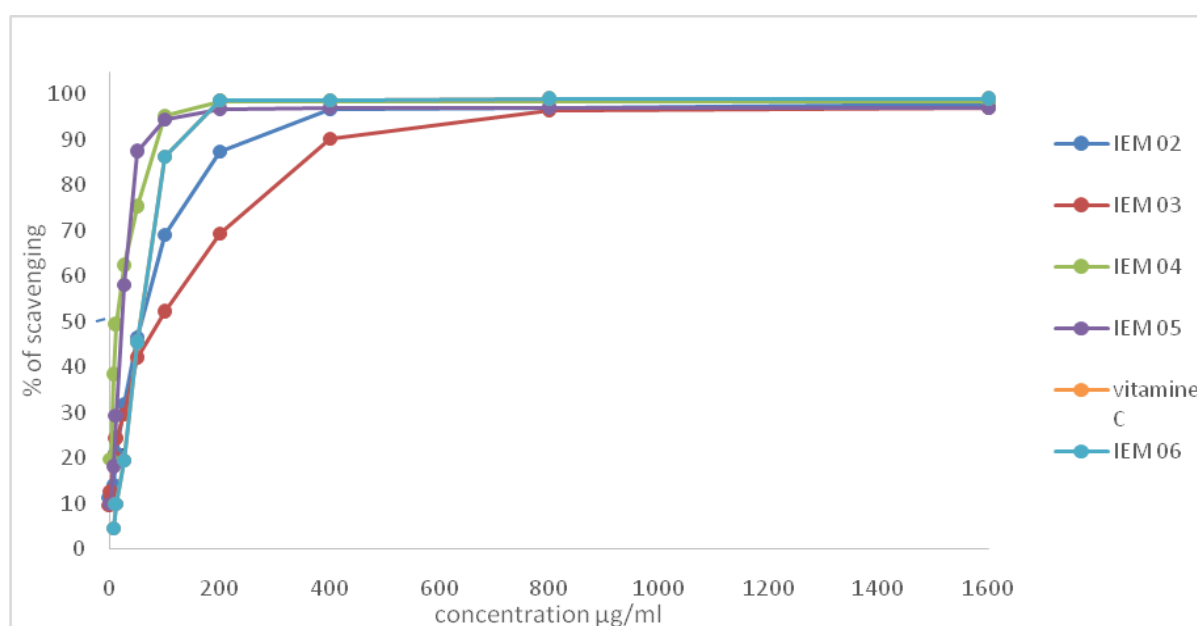
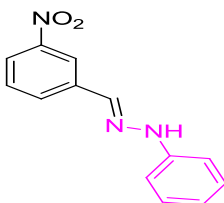
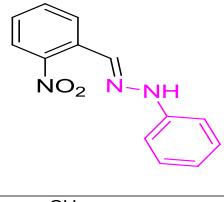
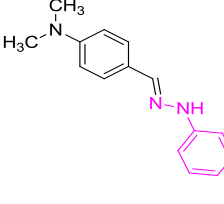
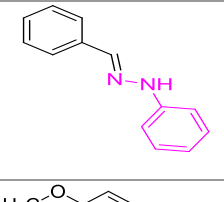
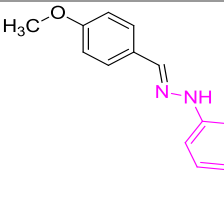


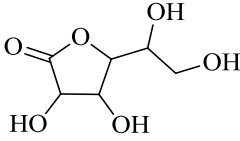
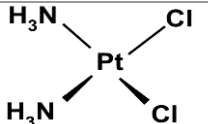
Figure 22. Antioxydant activity of hydrazino-derivatives evaluated by using DPPH method. Compounds were prepared in DMSO then diluted in methanol at appropriate concentrations (see method section). Then 150 μl of methanolic solution of DPPH (40 $\mu\text{g/ml}$) was added to each well, shaken and the test plate was allowed to stand in the dark at 37°C for 30 min. Absorbance was measured at 517 nm using a test plate reader (ELISA).

Les composés IEM4, IEM5 et IEM6 sont presque aussi actifs que la vitamine C ($IC_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$) utilisé (Tableau XVI). Comme prévu, la nitration en position 1 ou 2 des composés IEM 2 et IEM3 réduit légèrement leur pouvoir antioxydant par rapport au composé IEM 5.

Cependant, la substitution par des groupes méthoxy (IEM 6) et N, N-diméthyl (IEM 4) n'apporte pas un changement significatif dans leur pouvoir antioxydant.

Tableau XVI. Evaluation de l'activité antioxydante (test DPPH) et cytotoxique (test MTT) des dérivés hydrazones

Hydrazone compounds		Antioxydant effect DPPH assay, IC ₅₀ (µg/ml)	Cytotoxic effect on cancer cell lines		
			MTT assay, IC ₅₀ (µg/ml)		
			P 815	MDA- mb468	MCF7
1-(3-nitrobenzylidene)- 2- Phenylhydrazine (IEM 2)		60 ± 4	7 ± 0.35	18 ± 1.5	20 ± 1.3
1-(2-nitrobenzylidene)- 2- Phenylhydrazine (IEM 3)		90 ± 5	44 ± 2.5	32 ± 4	76 ± 3.5
N,N-dimethyl-4-((2- phenylhydrazono) methyl) aniline (IEM 4)		13 ± 1.5	19 ± 0.8	52 ± 3	44 ± 3.2
1-benzylidene-2- phenylhydrazine (IEM 5)		20 ± 2	17 ± 0.4	56 ± 3.5	60 ± 4
1-(4- methoxybenzylidene)- 2- phenylhydrazine (IEM 6)		14 ± 0.8	1,5 ± 0.05	84 ± 4.8	88 ± 4.5

Ascorbic acid		5 ± 0.25	-	-	-
Cisplatin		-	12 ± 0.1	0.4 ± 0.02	28 ± 1.8

La capacité de certains dérivés hydrazones à piéger les radicaux libres dans le test DPPH ne signifie pas que ces composés auront le même impact fonctionnel lorsque des mécanismes complexes sont impliqués et notamment dans les conditions physiologiques. Pour cette raison, il est nécessaire de vérifier l'effet antioxydant de certaines espèces telles que le radical superoxyde anion (O_2^-), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces espèces d'oxygène sont souvent générées dans les organismes par divers processus cellulaires, tels que la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries, dans les microsomes et par des enzymes telles que la xanthine oxydase et la NADPH oxydase ou par des facteurs exogènes. Ces espèces réactives, qui peuvent être augmentées dans le cadre de certaines pathologies, causent des dommages oxydatifs lors de réactions avec presque toutes les molécules trouvées dans les cellules vivantes.

Activité cytotoxique *in vitro*

L'activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses a été évaluée à la fois par le test MTT et par la nouvelle méthode DCPIP proposée dans le présent travail.

Comme le montre la figure 22, une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses P815 est proportionnelle aux concentrations croissantes des dérivés hydrazones. En outre, le profil de la cytotoxicité de ces composés hydrazones sur les lignées cellulaires adhérentes MCF7 et MDA mb468 est similaire à celui obtenu avec la lignée cellulaire P815 non adhérente (non représentée). De plus, tous les dérivés hydrazones testés sont capables de réduire de manière significative la croissance des cellules cancéreuses avec des valeurs IC_{50} comprises entre 1,5 à 88 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

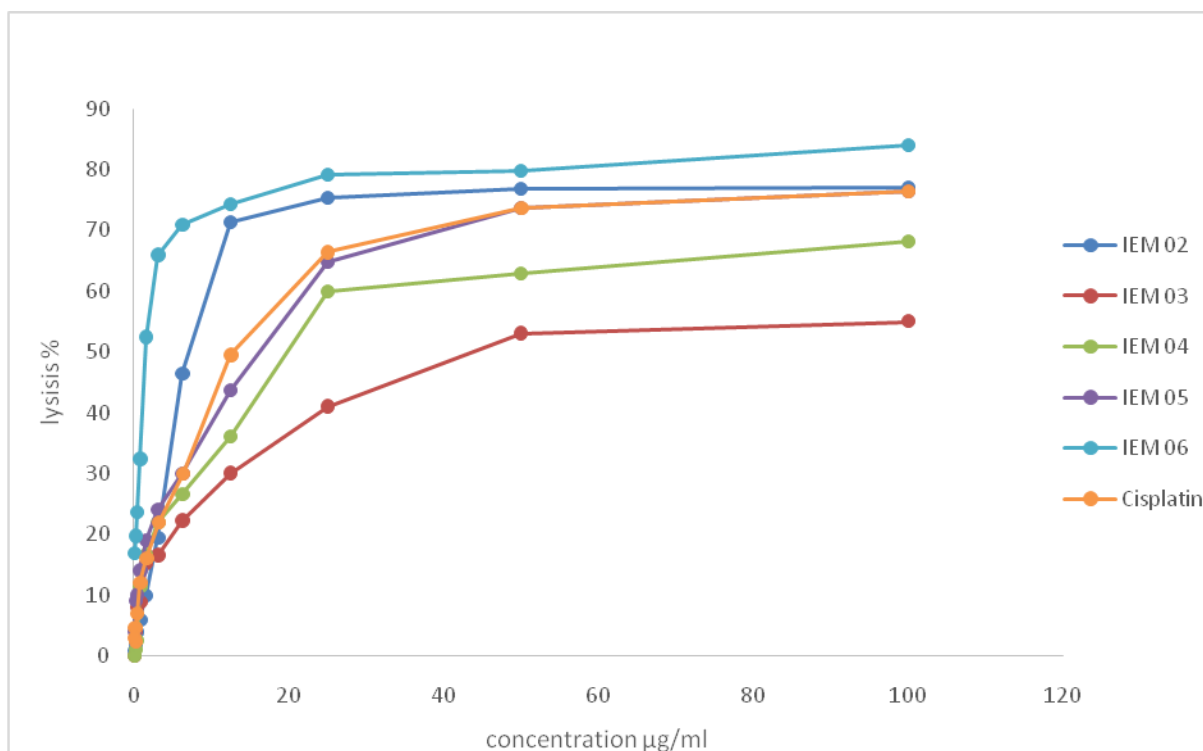


Figure 23. Effet cytotoxique in vitro de composés dérivés d'hydrazino sur des cellules cancéreuses P815. Les cellules non adhérentes P815 ($10^5/\text{ml}$) ont été cultivées dans des plaques de culture à 96 puits pendant 48 h en l'absence ou en présence de composés d'hydrazino aux concentrations indiquées. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 48 h. À la fin, la viabilité des cellules a été déterminée par les tests MTT décrits dans la section méthode. Les données sont la moyenne des mesures en triplicate \pm S D

Dans les mêmes conditions expérimentales, le dérivé d'hydrazone IEM6 ($\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) semble être plus actif (environ 8 fois) que le cisplatine ($\text{IC}_{50}=12\mu\text{g}/\text{ml}$) utilisé comme contrôle positif. Ce résultat démontre que ces composés hydrazino, en particulier la 1- (4-méthoxybenzylédine) -2-phénylhydrazine (IEM6), sont des composés anticancéreux puissants induisant une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses non adhérentes (P815) utilisées dans cette étude. Cependant, les cellules adhérentes, MCF7 et MDA-mb468, sont moins sensibles (environ 50 fois moins). En revanche, le 1- (3-nitrobenzylédine) -2-phénylhydrazine (IEM2) est actif sur toutes les lignées cellulaires testées avec une valeur d' IC_{50} comprise entre 7 et $20\mu\text{g}/\text{ml}$.

Il semble clair que le remplacement du groupe attractif (NO_2) par des groupes donneurs tels que le méthoxy ($\text{CH}_3\text{-O}$) ou le N-diméthyle ($(\text{CH}_3)_2\text{-N}$) augmente l'activité antioxydante (environ 3 fois), soulignant la relation entre la capacité de l'hydrogène à se séparer des groupes et le potentiel antioxydant. Cependant, il est trop tôt pour établir une relation structure-activité entre les hydrazones et les effets de cytotoxicité obtenus *in vitro*. À cet

égard, des recherches ultérieures basées sur la relation structure-activité pourraient mettre en évidence une efficacité *in vitro* de ces dérivés hydrazino. De plus, l'identification des mécanismes biochimiques par lesquels ces composés inhibent la croissance des cellules cancéreuses pourrait constituer une cible attractive pour une nouvelle approche chimiothérapeutique. Les hydrazones ont fait l'objet d'une attention considérable en raison de leur importance biologique en chimie médicale. De nombreuses études ont montré que les dérivés hydrazones ont un large spectre d'effets biologiques.

Références

- [1]. Dandawate P, Khan E, Padhye S, Gaba H, Sinha S, Deshpande J, et al. Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbaginhydrazones against breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22:3104-8.
- [2]. Aydın S, Kaushik-Basu N, Arora P, Basu A, Nichols BD, Talele TT, et al. Microwave assisted synthesis of some novel flurbiprofen hydrazidehydrazones as anti-HCV NS5B and anti-cancer agents. *Marmara Pharm J* 2013;17:26-34.
- [3]. Mohareb RM, Al-Omran F. Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: Novel synthesis of hydrazide-hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids* 2012;77:1551-9.
- [4]. Cui Z, Li Y, Ling Y, Huang J, Cui J, Wang R, et al. New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. *Eur J Med. Chem* 2010;45:5576-84.
- [5]. Liu T, Sun C, Xing X, Jing L, Tan R, Luo Y, et al. Synthesis and evaluation of 2-[2-(phenylthiomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl] aceto-hydrazone derivatives as antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22:3122-5.
- [6]. Vogel S, Kaufmann D, Pojarová M, Müller C, Pfaller T, Kühne S, et al. Arylhydrazones of 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. *Bioorg Med Chem* 2008;16: 6436-47.
- [7]. Xu G, Abad MC, Connolly PJ, Nepper MP, Struble GT, Springer BA, et al. 4-Amino-6-arylamino-pyrimidine-5-carbaldehyde hydrazones as potent ErbB-2/EGFR dual kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18:4615-9.
- [8]. Benites J, Valderrama JA, Rivera F, Rojo L, Campos N, Pedro M, et al. Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:862-8.
- [9]. Cutshall NS, Onrust R, Rohde A, Gragerov S, Hamilton L, Harbol K, et al. Novel 2-methoxyacylhydrazones as potent, selective PDE10A inhibitors with activity in animal models of schizophrenia. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22:5595-9.
- [10]. Gerpe A, Alvarez G, Benítez D, Boiani L, Quiroga M, Hernández P, et al. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-Trypanosomacruzi activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg Med Chem* 2009; 17:7500-9.

- [11]. Kulandasamy R, Adhikari AV, Stables JP. A new class of anticonvulsants possessing 6 Hz activity: 3,4-dialkyloxy thiophenebishydrazones. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 4376-84.
- [12]. de Oliveira KN, Costa P, Santin JR, Mazzambani L, Bürger C, Mora C, et al. Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones. *Bioorg Med Chem*. 2011; 19:4295-306.
- [13]. Caputto ME, Fabian LE, Benítez D, Merlino A, Ríos N, Cerecetto H, et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosomacruzi agents. *Bioorg Med Chem* 2011;19:6818-26.
- [14]. Carvalho SA, Feitosa LO, Soares M, Costa TE, Henriques MG, Salomão K, et al. Design and synthesis of new (E)-cinnaMIN-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *Eur J Med Chem* 2012;54:512-21.
- [15]. dos Santos Filho JM, Leite AC, de Oliveira BG, Moreira DR, Lima MS, Soares MB, et al. Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-Trypanosomacruzi agents. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 6682-91.
- [16]. Fattorusso C, Campiani G, Kukreja G, Persico M, Butini S, Romano MP, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of 4-quinolinyl- and 9-acridinylhydrazones as potent antimalarial agents. *J Med Chem* 2008; 51:1333-43.
- [17]. Elabbadi N, Gamouh A, Ancelin ML, Vial H. Phospholipid metabolism of serine on Plasmodium falciparum is a potential specific target for antimalarial drug development. *Biologie et Santé*. 2004, 4 (3), 1-14.

Synthesis and Biological Evaluation of Some Hydrazones as Cytotoxic and Anti-antioxidant Agents.

(Article en préparation).

(Voir ci-après)

Synthesis and Biological Evaluation of Some Hydrazones as Cytotoxic and Anti-antioxidant Agents

Ayad H², Elabbadi N²., Hafid A¹, Khouili M.¹

¹ Laboratoire de Chimie Organique et Analytique, Université Sultan Moulay Slimane, FST Béni Mellal, BP 523, 23000 Béni Mellal, Maroc

²Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Université Sultan Moulay Slimane, FST Béni Mellal, BP 523, 23000 Béni Mellal, Maroc.

Abstract

In the present study, some hydrazone derivatives were synthesized via the reaction of phenylhydrazine with various aromatic aldehydes. The chemical structures of the compounds were elucidated by spectroscopic techniques such as ¹H-NMR and MS. The compounds were evaluated for their anti-oxidant and cytotoxic activities. Anti-oxidant activity was determined by the DPPH method in comparison with ascorbic acid (positive control) and the IC₅₀ were evaluated to be 60, 90, 13, 20 and 14 μg/ml for IEM 2, IEM3, IEM4, IEM5 and IEM6, respectively. It is noteworthy that some of these hydrazino-derivatives compounds are as active as the standard ascorbic acid (IC₅₀ = 5 μg/ml). Cytotoxic activity was evaluated on adherent cancer cells (MCF 7 and MDAmb468) and non adherent cancer cells (P815). All hydrazone derivatives were able to reduce significantly the cell growth with IC₅₀ values from 1.5 to 44 μM. Interestingly IEM6 hydrazone derivative (IC₅₀ = 1.5 μM) seems to be as active as cisplatin (IC₅₀ = 2.5 μM) used as positive control.

Keywords: Hydrazone, Reactivity, Cytotoxicity, Antioxidant activity. P815 cells, MCF-7 cells, MDAmb468 cells

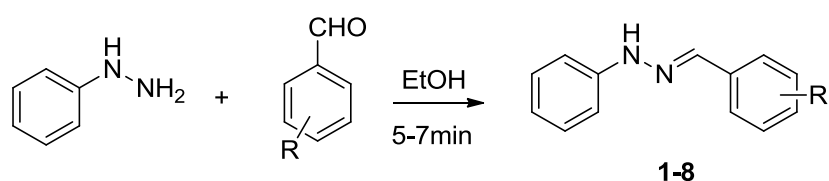
Introduction

The chemistry of nitrogen compounds is the preferred source of many subjects of study in the laboratory. The nitrogen atom is present in many natural molecules having a pharmacological interest and many methods have been developed for access to the nitrogen compounds includes heterocyclic. Some of them have been explored in the laboratory, through the chemistry of isocyanides and hydrazones until the recent study by the metathesis of nitrogen compounds. Hydrazone moiety plays an important key role in heterocyclic chemistry (1-7). Hydrazone is a class of organic compounds with structure $R_1R_2C=NNH_2$. These hydrazone compounds have received considerable attention due to their biological importance in medicinal chemistry. Many studies have confirmed that hydrazone derivatives have a broad spectrum of biological effects, including anti-oxidant and cytotoxic activity (8-17). Hydrazones also have been used for analytical chemistry as antioxydant agents (18-19). In this study, we described the synthesis of certain derivatives of the hydrazone and focused on their antioxidant activity and *in vitro* cytotoxicity evaluation by using DPPH method and MTT assay, respectively. So we tried a new reactivity on synthesized hydrazones

Material and Methods

Chemistry

Hydrazone are formed usually by the action of hydrazine on ketones or aldehydes. The alpha-hydrogen atom of hydrazones is more nucleophilic as compared to ketones because alpha-hydrogen atom of hydrazone is 10 times more acidic than ketones. The synthetic pathway leading to the title compounds is given in Scheme 1. Isonicotinylhydrazones (1-8) were synthesized by a single and fast step reaction of phenylhydrazine with appropriate aryl aldehydes, without catalyst in refluxing ethanol.



Scheme 1.

Biology

Chemicals

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH), DMSO and penicillin-neomycin were purchased from Sigma Chemical Co., Saint Quentin, France.

Cell lines

The non adherent murine mastocytoma cell line (P815) and the adherent human breast cancer cell line MDMmb468 were kindly provided by Prof. G. Lemaire, Institute of Biochemistry, University of Paris XI, France.

Cell lines were routinely cultured in complete medium RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Sergy Pontoise, France), 1% penicillin-neomycin and 2% L-glutamine (complete medium). Adherent cell line was first trypsinized before using.

Cellular chemosensitivity measurement (cytotoxicity assay)

The methyl thiazole tetrazolium (MTT) test (**Septisetyani 2014**) (20) was used to determine the effect of hydrazino-derivatives on the growth of non adherent murine mastocytoma cell line (P815) as well as on the adherent human breast cancer cell line MDAMB 468. The cisplatin was used as control positive.

Adherent cells were plated out in 100 μ l of complete medium at a concentration of 10^4 cells per ml and allowed to attach and grow for 24 h. For the non adherent cell line, 100 μ l of cultured cells (5×10^4 cells per ml) were plated out in flat-bottomed 96-well microtiter plates and used immediately. 100 μ l of medium containing compounds or cisplatin at appropriate concentrations were then added to the cell culture. After 48 h incubation in a humidified atmosphere at 37°C, 5% CO₂, 100 μ l of medium was carefully removed from each well and replaced with 20 μ l MTT solution (5 mg/ml PBS). After 4 h incubation under the same conditions, the cleavage of MTT to formazan by metabolically active cells was quantified by scanning the plates at 540 and 630 nm using multi-scan apparatus. The means of three independent assays was determined to analyze the effect of drug on PBMC and P815 cell growth. The growth inhibition rate was evaluated as percentage of parallel negative controls as follows: $[(A_{control} - A_{experiment})/A_{control}] \times 100$.

Antioxydant activity (Radical scavenging activity) by using DPPH method.

The free radical scavenging activity of compounds were measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH•) method as described before (Sanchez-Moreno et al 1998) (21). DPPH reagent evidently offers a convenient and accurate method for titrating the oxidizable groups of natural or synthetic antioxidants. Compounds were prepared in DMSO at concentration 20 mg/ml. In flat-bottomed 96-well microtiter plates (Bioster, Bastia di Rovolon, Italy), experiments were carried out first in 200 μ l by mixing samples (16 μ l) or 10 μ l of ascorbic acid solution 1 mg/ml (positive control) with an appropriate volume of methanol. Then the cascade dilution step was performed by transferring 100 μ l from each well to the next one containing 100 μ l of methanol. Methanolic solution of DPPH (40 μ g/ml) was prepared and 150 μ l of this solution was added to each well, shaken and the test plate was allowed to stand in the dark at 37°C for 30 min. A control was performed exactly as described above except the samples were replaced by pure DMSO. Absorbance was measured at 517 nm, using a test plate reader (ELISA). Radical scavenging activity was expressed as the inhibition percentage by using the following formula:

$$\% \text{ radical scavenging activity} = [(Ab_{\lambda 517nm} \text{ control} - Ab_{\lambda 517nm} \text{ sample}) / Ab_{\lambda 517nm} \text{ control}] \times 100.$$

The antioxidant activity was also expressed as the concentration (μ g/ml) of compound that reduces DPPH (40 μ g/ml) by 50% (IC₅₀). Results are expressed as the mean of triplicate experiments \pm SD.

Results and discussion

Antioxydant activity

The free radical scavenging potentials of commercial or synthesis compounds and ascorbic acid (Vitamin C) at different concentrations were evaluated by DPPH test. Antioxidants react with DPPH, which is a nitrogen-centered radical with a characteristic absorption at 517 nm and convert to 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine. The degree of discoloration indicates the scavenging potentials of the antioxidant compounds as shown in Fig 1, in which all hydrazine compounds tested as well as ascorbic acid (positive control) have reduced the DPPH radical in dose dependent manner.

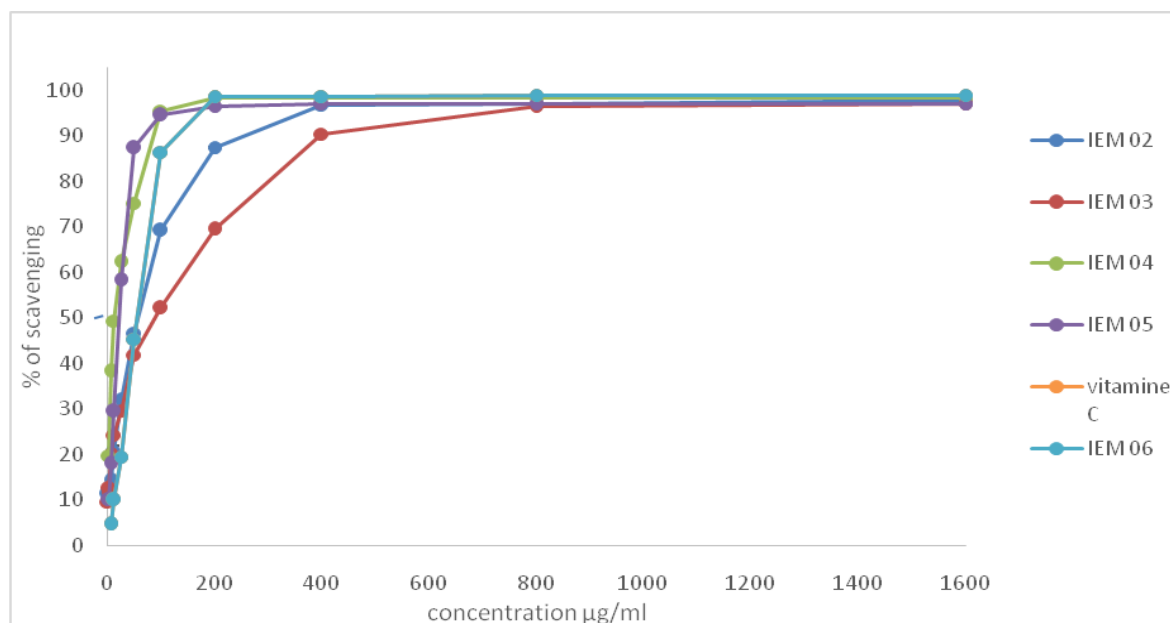
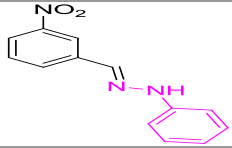
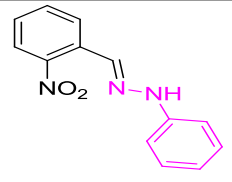
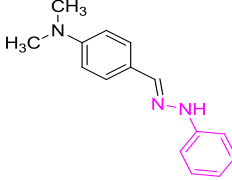
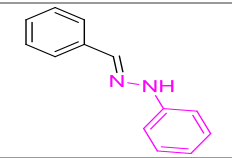
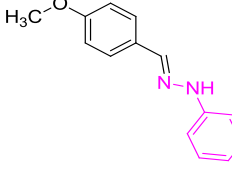
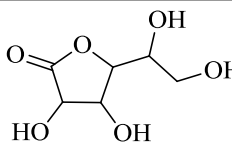
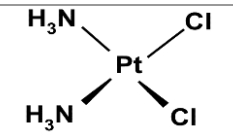


Figure 1. Antioxydant activity of hydrazino-derivatives evaluated by using DPPH method.

Compounds were prepared in DMSO then diluted in methanol at appropriate concentrations (see method section). Then 150 µl of methanolic solution of DPPH (40 µg/ml) was added to each well, shaken and the test plate was allowed to stand in the dark at 37°C for 30 min. Absorbance was measured at 517 nm using a test plate reader (ELISA).

Radical scavenging activity was expressed as the concentration (µg/ml) of compound that reduces DPPH (40 µg/ml) by 50% (IC_{50}). Evaluation of IC_{50} for chemical synthesized hydrazones IEM 2, IEM3, IEM4, IEM5 and IEM6, were found to be 60, 90, 13, 20 and 14 µg/ml, respectively (Table 1). It is noteworthy that some of these hydrazino-derivatives compounds are as active as the standard ascorbic acid ($IC_{50} = 5$ µg/ml) used. As expected, nitration in position 1 or 2 of IEM 2 and IEM3 compounds slightly reduced their antioxidant activity in comparison with that found for IEM 5. However, substitution by methoxy (IEM 6) and N,Ndimethyl (IEM 4) groups doesn't make any significant change in their antioxidant activity.

Tableau I. Antioxidant was evaluated by DPPH method.

Hydrazone compounds		Antioxydant effect	Cytotoxic effect on cancer cell lines		
		DPPH assay, IC ₅₀ (µg/ml)	MTT assay, IC ₅₀ (µg/ml)		
			P 815	MDA-mb468	MCF7
1-(3-nitrobenzylidene)-2-Phenylhydrazine (IEM 2)		60 ± 4	7 ± 0.35	18 ± 1.5	20 ± 1.3
1-(2-nitrobenzylidene)-2-Phenylhydrazine (IEM 3)		90 ± 5	44 ± 2.5	32 ± 4	76 ± 3.5
N,N-dimethyl-4-((2-phenylhydrazono) methyl) aniline (IEM 4)		13 ± 1.5	19 ± 0.8	52 ± 3	44 ± 3.2
1-benzylidene-2-phenylhydrazine (IEM 5)		20 ± 2	17 ± 0.4	56 ± 3.5	60 ± 4
1-(4-methoxybenzylidene)-2-phenylhydrazine (IEM 6)		14 ± 0.8	1,5 ± 0.05	84 ± 4.8	88 ± 4.5
Ascorbic acid		5 ± 0.25	-	-	-
Cisplatin		-	12 ± 0.1	0.4 ± 0.02	28 ± 1.8

The ability of some compounds to scavenge free radicals in DPPH test does not mean that these compounds will perform readily where complex mechanisms are operating such as those in physiological substrates. For this reason, there is need to verify the antioxidant effect in scavenging specific species such as superoxide anion radical (O₂^{•-}), hydroxyl radical (•OH) and hydrogen peroxide (H₂O₂). These oxygen species are often generated in organisms by diverse cellular processes, such as the electron transport chain in mitochondria, in microsomes

and through enzymes like xanthine oxidase and NADPH oxidase or from exogenous factors. These reactive species, which can be increased as part of certain pathologies ((Moreira 2005) (22), cause oxidative damage in reactions with nearly every molecule found in living cells (Sharma D, 2001) (23).

***In vitro* cytotoxicity activity**

In vitro cytotoxic effect of hydrazone compounds was evaluated against two cancer cell lines: adherent tumour cells (MCF7 and MDAMB468) and non adherent tumour cells (P815) by MTT assay as described in method section. The antitumoral cisplatin was used as positive control. As shown in figure 2, a dose dependent decrease in the growth of P815 was obtained with increasing concentrations of hydrazone-derivatives. Also, the cytotoxicity trend of these hydrazone compounds on adherent cell lines MCF7 and MDA mb468 was similar to that obtained with non adherent P815 cell line (not shown). As reported in Table I, all hydrazone-derivatives tested are able to reduce significantly the cancer cell growth with IC₅₀ values from 1.5 to 88 µg/ regardless of whether cells were used.

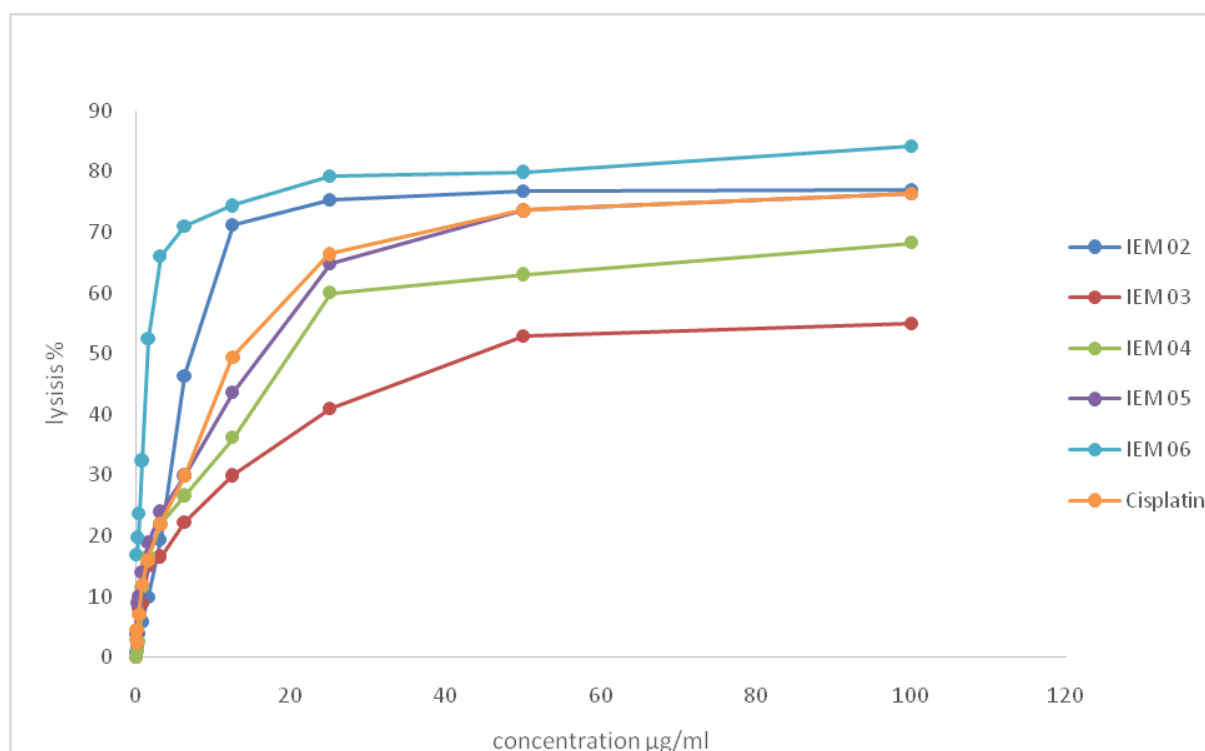


Figure 2. *In vitro* cytotoxicity effect of hydrazone-derivative compounds on P815 cancer cells. Non adherent P815 cells (10^5 /ml) were cultured in 96-well culture plates for 48 h in the absence or presence of hydrazone-compounds at indicated concentrations. Then the cells were incubation for 48 h. At the end, the cell viability was determined by MTT assays as described in the method section. Data are the mean of triplicate measurements \pm S.D

Interestingly, in the same experimental conditions, IEM6 hydrazone derivative ($IC_{50} = 1.5 \mu\text{g/ml}$) seems to be more active (~10-fold) than cisplatin ($IC_{50} = 12 \mu\text{g/ml}$) which was used as antitumoral positive control. This result demonstrates that these synthesised hydrazino-compounds, particularly 1-(4-methoxybenzylidene)-2- phenylhydrazine (IEM6), are a potent anti-cancer compounds inducing growth inhibition in non adherent cancer cells (P815) used in the present study. However, its effect on adherent cells, MCF7 and MDAMB468, which were found to be 88, and 84 $\mu\text{g/ml}$, respectively, appears to be less efficient (-50-fold). By contrast, 1-(3-nitrobenzylidene)-2- phenylhydrazine (IEM2), was active on all cell lines tested with an IC_{50} value ranging between 7 and 20 $\mu\text{g/ml}$.

It seems clear that replacement of attractive group (NO_2) by donor groups like methoxy ($\text{CH}_3\text{-O-}$) or N-dimethyl ($(\text{CH}_3)_2\text{-N}$) enhanced the antioxidant activity (about 3-fold), pointing out the relationship between the capacity of hydrogen to move from groups and the scavenging potential of the antioxidant compounds. However, it is early to make any structure-activity relationship between hydrazones and *in vitro* cytotoxicity effects. In that regard, further research based on relation structure-activity might emphasize an *in vitro* efficacy of these hydrazino-derivatives. Also identification of biochemical mechanism by which these compounds induce the inhibition cell growth might constitute an attractive target for a new chemotherapy approach against cancer cells. Hydrazones have received considerable attention due to their biological importance in medicinal chemistry. Many studies have confirmed that hydrazone derivatives have a broad spectrum of biological effects, including anti-oxidant and cytotoxic activity (8-17).

References:

1. G. Turan-Zitouni; Y. Blache, K. Güven *Boll. Chim.Farm.*, **2001**, *140*, 397-400.
2. Gao, Peng; Wei, Yunyang *Heterocyclic Communications.*, **2013**, *19*, *2*, 113 – 119.
3. Pal, Samudranil, A.R.; Rao, Balavardhana *Journal of Organometallic Chemistry.*, **2013**, *731*, 67 – 72.
4. Chang, Junbiao; Huang, Gang; Liu, Hongxu; Yu, Wenquan; Zhang, Yueteng; Chang, Junbiao; Dong, Lihong; Li, Yujiang; Yu, Xuejun *Journal of Organic Chemistry.*, **2013**, *78*, 10337 – 103431.
5. Lamaty, Frederic; Martin, Charlotte; Martinez, Jean; Nun, Pierrick *Tetrahedron.*, **2013**, *67*, 8187 -8194.
6. Chen, Ke; Hu, Yang; Li, Qing-Shan; Lu, Xiang; Yan, Ru; Zhu, Hai-Liang *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 903 – 909.
7. Jacobsen, N. Eric Tan, L. Kian. *Angewandte Chemie - International Edition.*, **2007**, *46*, 1315 – 13171.
8. Rollas, S.; Küçükgülzel, G. *Molecules*, 2010, *12*, 1910-1939.
9. Rollas, S.; Gulerman, N.; Erdeniz, H. *Farmaco*, 2002, *57*, 171-174.
10. Vicini, P.; Zani, F.; Cozzini, P.; Doytchinova, I. *Eur. J. Med. Chem.*, 2002, *37*, 553-564.
11. Cacic, M.; Trkovnik, M.; Cacic, F.; Has-Schon, E. *Molecules*, 2006, *11*, 134-147.
12. Kaplancikli, Z.A.; Turan-Zitouni, G.; Ozdemir, A.; Teulade, J.C. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2008, *341*, 721-724.
13. Kumar, P.; Narasimhan, B.; Sharma, D.; Judge, V.; Narang, R. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, *44*, 1853-1863.
14. Vicini, P.; Incerti, M.; La Colla, P.; Loddo, R. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, *44*, 1801-1807.
15. Ragavendran, J.V.; Sriram, D.; Patel, S.K.; Reddy, I.V.; Bharathwajan, N.; Stables, J.; Yogeewari, P. *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, *42*, 146- 151.
16. Salgın-Gök_en, U.; Gökhan-Kelekçi, N.; Gökta_, Ö.; Köysal, Y.; Kılıç, E.; I_ık, _.; Aktay, G.; Özalp, M. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, *15*, 5738-5751.
17. Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. *Curr. Med. Chem.*, 2006, *13*, 167-198.
18. Kamboj, Anjoo; Randhawa, Harpreet; Saluja, Ajay Kumar. *World J. Pharm.Res.*, 2014, *3*(2), 3146-3159.
19. Lima P. C, Lima L. M, Silva K. C, Leda P. H, Miranda A. L. P, Fraga C. A. M, Barreiro E. J. *Eur. J. Med. Chem.* 2000, *35*, 187-203.
20. Endah Puji Septisetyani*, Ratih Asmana Ningrum, Yulaika Romadhani, Popi Hadi Wisnuwardhani, Adi Santoso. *Indonesian J. Pharm.* 2014, *25* (4), 245 – 254
21. Sanchez-Moreno, Larrauri J. A., Saura-Calixto F.A. *Journal of the Science Food and Agriculture.* 1998, *76* (2): 270-276
22. Moreia DL, Leitao S, Goncalves JLS, Wigg MD, Leitao GG. *Quim Nova.* 2005, *28*, 421-5.
23. Sharma D, Appa Rao KB, Singh RV, Totey SM. *Anim Biotechnol.* 2001, *12*, 111-20.

5.6. Etudes électrochimiques et pouvoir antioxydant des Systèmes Hétérocycliques Nitré.

En collaboration avec le Professeur HAHID A. et le Professeur KHOUILI M. Laboratoire de Chimie Organique et Analytique, FST Beni-Mellal

En collaboration avec le Professeur CHTAINI A.
Laboratoire d'électrochimie moléculaire et matériaux inorganiques, FST Beni-Mellal

Dans cette partie, le travail consiste à faire une étude du comportement électrochimique des différents hétérocycles synthétisés à partir du méthoxynaphtalène 1 et le naphthalen-2-ol 2. Le but étant de comprendre les réactions de substitutions nucléophiles en différentes positions de ces composés par le groupement Nitro. Parallèlement, une évaluation de l'activité antioxydante de chaque molécule a été déterminée par le test DPPH (voir partie méthode). Le but étant d'établir une corrélation entre le pouvoir antioxydant et les réactions d'oxydoréductions afin d'orienter au mieux la synthèse chimique des futures molécules nouvellement synthétisées, dérivés hydrazones et la famille des dihydropyrimidinones (DHPMs).

5.6. Electrochemical Studies and Antioxidant Activity of Heterocyclic Nitrate Systems

Article avril 2019

Electrochemical Studies and Antioxidant Activity of Heterocyclic Nitrate Systems

Amlil A^{1,2}, Yassine H¹, Akhramez S¹, Touzara S², Ayad H³, Elabbadi N³, Chtaini A², Hafid A¹ and Khouili M^{1*}

¹Faculty of Science and Technology, Laboratory of Organic and Analytical Chemistry, University Sultan Moulay Slimane, Morocco

²Faculty of Science and Technology, Laboratory of Molecular Electrochemistry and Inorganic Materials, University Sultan Moulay Slimane, Morocco

³Faculty of Science and Technology, Laboratory of Biochemistry, University Sultan Moulay Slimane, Morocco

Abstract

A nitration by penta-hydrated bismuth ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) was carried out on two commercial molecules, methoxynaphthalene 1 and naphthalen-2-ol 2. The compounds produced from this organic synthesis (1.a, 1.b, 1.c and 2') as well as the starting molecules 1 and 2 have undergone a study on their antioxidant capacity, using two methods: electrochemical cyclic voltammetry CV and DPPH biologically. The experimental results of the two methods confirm that the antioxidant power of these aromatic molecules is canceled in the case of nitration or by replacement of the hydroxyl group (molecule 2) by the methoxy group (molecule 1).

Keywords: Nitration; Naphthalene; Cyclic voltammetry; Antioxidant activity

Introduction

Nitration is one of the oldest and most important unit reactions in organic synthesis. It is a key reaction for the production of dyes, plastics and basic chemical reagents. Conventional nitration is generally carried out in a strongly acidic medium, such as nitric acid and concentrated sulfuric acid [1,2]. This method is associated with many drawbacks, which are due to excessive loss of acid. This loss is harmful to the environment. In addition to that, its treatment is difficult, with exorbitant cost. Because of the problems associated with mixed acids, alternative methods were to be a field of research. In this case, various nitrating agents have been studied under different conditions [3].

Most of these agents have drawbacks, such as the regio-selectivity of nitration and the oxidation of competitive substrates. Therefore, there is a need for the development of new methods of nitration of aromatic compounds [4]. In the shed of this work, we present an efficient and easy-to-use protocol for the nitration of aromatics. This is achieved in the presence of bismuth nitrate, which is a widely used reagent in organic synthesis. It is better known as a polyvalent oxidant. In addition to that, it is used as weak Lewis acid in various transformations, and often under microwave irradiation [5-7].

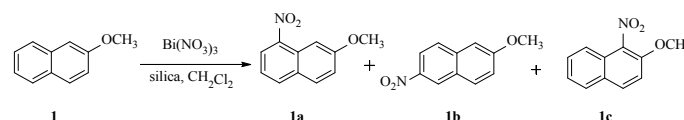
In the other side, the molecules containing the nitro group have been under investigation for a long time because of their important biological activity and specifically their antioxidant activities.

Despite wide application in organic synthesis, the utility of bismuth nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), as a nitrating agent, is relatively unexplored and may be underestimated. Previous studies have shown that bismuth nitrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) is effective for the nitration of phenolic compounds in the presence of a Lewis acid, in organic solvents and under microwave irradiation. Other authors have studied the nitration of arenes in the presence of bismuth nitrate and a catalyst such as silica. Furthermore, the operating conditions using silica with sulfuric acid, and silica in THF as a solvent under microwave, have been described in the literature Schemes 1 and 2 [8-10].

On our part, we used the nitrate of bismuth penthydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), in the presence of silica. In this case, several tests were carried out on 2-methoxynaphthalene 1, while varying the amounts of the reagents (Table 1). All nitrated products were characterized by the usual spectroscopic methods (^1H , ^{13}C NMR and mass spectrometry).

Entry	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (eq)	Silica (eq)	Time	Yield (%)		
				1a	1b	1c
1	0.5	1	6h	12	14	57
2	0.95	1	6h	11.7	9.3	82
3	1.2	1	6h	7	18	74
4	2	1	4h	12	11	64
5	3	1	4h	11.5	9	48.8

Table 1: Results of the nitration reaction on methoxy-naphthalene.



Scheme 1: Nitration reaction of methoxynaphthalene with bismuth pentahydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Several researchers have shown the utility of the detection of nitrated organic products by physicochemical methods. In the literature, glassy carbon electrodes GCP and carbon fiber microelectrode CFME, represent the main electrochemical sensors used in the follow-up analyzes of these nitro compounds, such as Methyl parathion (MPT), para-nitrophenol (PNP) and o-nitrophenol (2-nitrophenol). This choice is due to their qualities of selectivity, efficiency, stability and reproducibility [11-13].

In order to increase the detection sensitivity of the nitro compounds, a modification of the surface of the electrodes mentioned above has been made. However, a passivation problem has occurred at a given concentration of micro pollutants, which represents the limit of detection of the electrodes used. This problem is solved for the GCP

*Corresponding author: Khouili M, Faculty of Science and Technology, Laboratory of Organic and Analytical Chemistry, University Sultan Moulay Slimane, Morocco, Tel: 00212661057943; E-mail: aminamlil@yahoo.fr

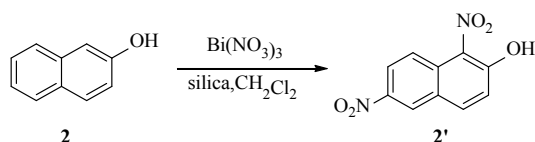
Received March 22, 2019; Accepted April 09, 2019; Published April 16, 2019

Citation: Amlil A, Yassine H, Akhramez S, Touzara S, Ayad H, et al. (2019) Electrochemical Studies and Antioxidant Activity of Heterocyclic Nitrate Systems. J Biosens Bioelectron 10: 268. doi: [10.4172/2155-6210.1000268](https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000268)

Copyright: © 2019 Amlil A, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

electrode, followed by a protocol for polishing and rinsing its surface, which lasts for 20 minutes.

Our work consists of studying the electrochemical behavior of the different heterocycles synthesized from methoxynaphthalene 1 and naphthalen-2-ol 2 in order to understand the nucleophilic substitution reactions at different positions of these compounds by the Nitro group.



Scheme 2: Nitration reaction of naphthalen-2-ol with bismuth pentahydrate (Bi(NO₃)₃·5H₂O)

The chosen electrode in our case is the CPE carbon paste electrode. This electrode is not disposable and not expensive and this is characterized by an immediate renewal of its surface, which solves the problem of passivation encountered at the level of other electrodes.

After the electrochemical analysis of the nitrated molecules, a biological study was carried out. In this part, an analysis of the antioxidant activity of the parent molecules as well as the nitrated organic molecules was carried out in order to compare the effect of nitration on the antioxidant power.

Experimental Section

Instrumentation

General synthetic methods: All reagents were purchased from commercial suppliers and were used without further purification. The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) analysis by using silica gel (60 F254) plates. Compounds were visualized by UV irradiation at 256 or 365 nm. Column Chromatography was performed on silica gel 60. Melting points (°C) were taken on samples in open capillary tubes. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker AC 300 (300 MHz for ¹H spectra; 75 MHz for ¹³C spectra). Chemical shifts are given in parts per million (ppm) from tetramethylsilane (TMS) as internal standard in CDCl₃, and the residual peak of DMSO in [D₆] DMSO. The following abbreviations are used for the ¹H NMR spectra multiplicities: br. s: broad singlet, s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, qt: quintuplet, m: multiplet. Coupling constants (*J*) are reported in Hertz [Hz].

Synthesis of nitrated organic molecules: a) Nitration reaction of methoxy-naphthalene with bismuth pentahydrate (Bi(NO₃)₃·5H₂O) 2-Methoxynaphthalene (0.5 g, 3.164 mmol) and silica (500 mg) were added to a suspension in CH₂Cl₂ (20 ml) of 1.2 equivalents of bismuth pentahydrate nitrate (Bi(NO₃)₃·5H₂O) (1.84 g, 3.777 mmol). The mixture was refluxed for 6 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered and washed with CH₂Cl₂, the resulting filtrate was concentrated, and the resulting residue was purified by column chromatography using EtOAc-hexane (1: 9 v / v). The products were obtained (1.a, 1.b and 1.c) with a total yield of 99%.

7-methoxy-1-nitronaphthalene 1.a: Yield: 7%; yellow powder; mp 64-66°C; ¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ (ppm) 8.24-8.35 (m, 2H, Ar-H), 8.07 (d, 1H, Ar-H, J=9Hz), 7.79 (d, 1H, Ar-H, J=2.4Hz), 7.52 (t, 1H, Ar-H, J=7.8Hz), 7.36 (dd, 1H, Ar-H, J=9Hz, J=2.4Hz), 3.90 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO, 75 MHz): δ 160.6, 145.1, 135.4, 131.2, 130.1, 126.3, 125.6, 122.7, 120.3, 101.6, 55.8.

2-methoxy-6-nitronaphthalene 1.b: Yield: 18 %; yellow powder; mp 130-132°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.89 (d, 1H, Ar-H), 8.17 (dd, 2H, Ar-H, J=9Hz, J=2.4Hz); 8.00 (d, 1H, Ar-H, J=9.3Hz); 7.51 (d, 1H, Ar-H, J=2.4Hz); 7.34 (dd, 1H, Ar-H, J=9.3Hz, J=2.7Hz); 3.92 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO, 75 MHz): δ 160.9, 143.6, 138.1, 132.3, 128.7, 127.2, 125.0, 121.2, 120.1, 106.8, 56.1.

2-methoxy-1-nitronaphthalene 1.c: Yield: 74%; crystalline yellow powder (ref Acta Cryst E); mp 110-112°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.20 (d, 1H, Ar-H, J=9Hz), 8.02 (d, 1H, Ar-H, J=8.4Hz), 7.71-7.47 (m, 4H, Ar-H), 4.01 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO, 75 MHz): δ 148.7, 133.1, 129.9, 128.8, 128.0, 125.6, 125.0, 119.8, 114.5, 57.6.

b) Nitration reaction of naphthalen-2-ol with bismuth pentahydrate (Bi(NO₃)₃·5H₂O)

2-Naphthol (0.5 g, 3.37 mmol) and silica gel (500 mg) were added to a suspension of bismuth nitrate pentahydrate (1.2 eq) (1.96 g, 4.044 mmol) in CH₂Cl₂. The mixture was refluxed for 24 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered and washed with CH₂Cl₂, the resulting filtrate was evaporated under vacuum, and the resulting residue was purified by column chromatography using EtOAc-hexane (1:9 v/v).

Preparation of the carbon paste electrode (CPE)

The carbon paste electrode has been developed according to the protocol cited in reference [14]. The graphite carbon powder was mixed with the paraffin oil in previously defined proportions. The resulting paste is inserted into the electrode cavity of 0.258 cm² section, a carbon rod is used to provide electrical conduction.

Electrochemical materials: The electrochemical measurements were invested by a Palm-Sens Em-Stat potentiostat. The electrochemical cell is equipped with three electrodes: a reference electrode (ECS), working electrode (CPE) and the counter electrode (platinum plate).

Results and Discussion

Electrochemical characterization of nitrated molecules

The electrochemical characterization of these molecules was carried out through two stages:

- Characterization of the parent molecule before its nitration.
- Characterization of molecules produced after nitration of the parent molecule.

The nitration of methoxynaphthalene produced three molecules that differ in the position of the NO₂ group.

- 1.a: The nitro group NO₂ is in position 8.
- 1.b: The nitro group NO₂ is in position 6.
- 1.c: The NO₂ nitro group is in position 1.

The electrochemical studies were invested by cyclic voltammetry (CV), in an acetic buffer solution of pH=5.2, at ambient temperature and without stirring. The detected concentration of these molecules is estimated at 8×10⁻⁴ M in a volume of 40 ml of the acetic buffer.

Electrochemical characterization of the parent molecule 1 before its nitration

As seen before, the electrode used for this study is the CPE carbon paste electrode, this electrode has been electrochemically characterized

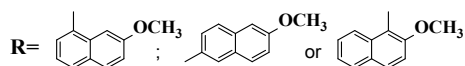
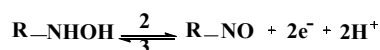
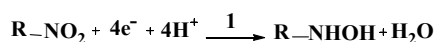
before and after the addition of the molecule in the electrolytic medium. The results obtained are shown in Figure 1.

The presence of methoxynaphthalene in the medium is characterized by the appearance of a peak of reduction towards approximately -0.5V/ECS, this isolated peak corresponds to the irreversible reduction of methoxynaphthalene.

Electrochemical characterization of the nitrated molecules produced from the parent molecule 1

a) Analysis of the EPC modified by 1.a. The molecule 1.a was introduced into the carbon paste in powder form; the resulting electrode is introduced into the measuring cell containing the buffer solution.

We find, at the first scan, in the direction of the negative potential, the presence of a reduction peak P_1 at the potential -0.815V/ECS and an oxidation peak P_2 in the direction of the positive scanning at the potential +0.13V/ECS. The second cycle shows a reduction peak P_3 at the potential +0.09V/ECS at cathodic scanning and the peak P_2 already obtained at the previous anodic scanning. The peak P_1 is irreversible and the peaks P_2 and P_3 represent a reversible oxidation-reduction phenomenon. P_4 is the oxidation peak of the methoxy group (-OCH₃). The electrochemical detection of 1.a is based on two redox systems. Indeed, at first it is reduced in an irreversible way, according to the equation (1). The product of this first reduction (R-NHOH) oxidizes reversibly according to equation (2) (Figure 2) [11].



b) Analysis of the EPC modified by 1.b:

The voltammogram recorded by the carbon paste electrode modified by the molecule 1.b Figure 3 shows the same behavior recorded for the molecule 1.a with a displacement of the potentials of the three peaks

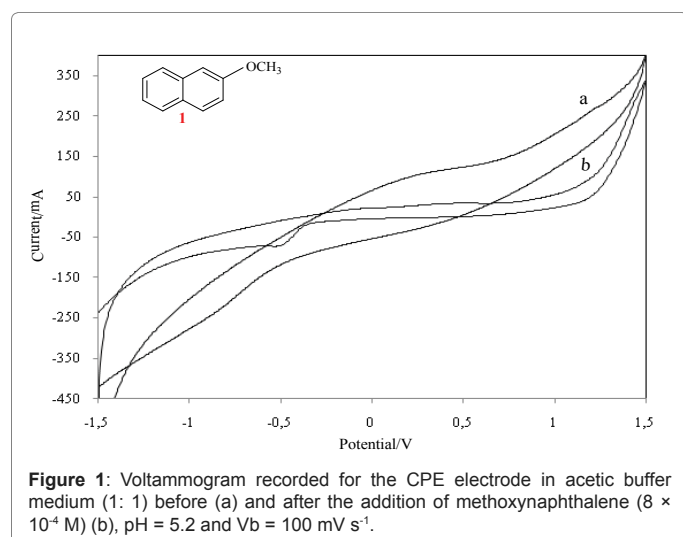


Figure 1: Voltammogram recorded for the CPE electrode in acetic buffer medium (1: 1) before (a) and after the addition of methoxynaphthalene (8×10^{-4} M) (b), pH = 5.2 and $V_b = 100$ mV s⁻¹.

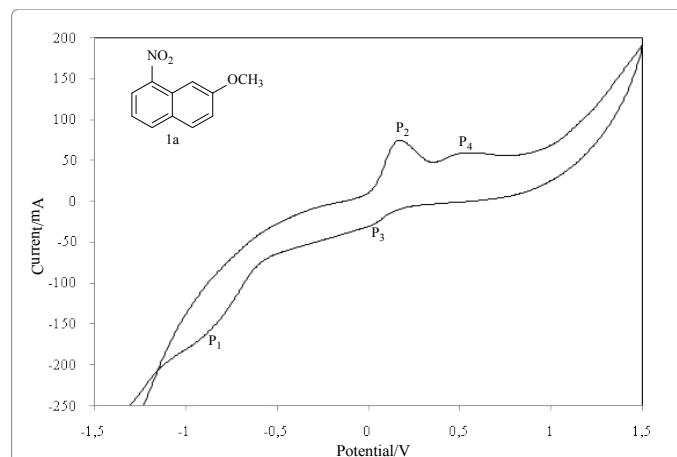


Figure 2: Voltammogram recorded for the CPE electrode in acetic buffer medium (1: 1) with the molecule 1.a (NO₂ in position 8) (8×10^{-4} mol l⁻¹), pH = 5.2 and $V_b = 100$ mV s⁻¹.

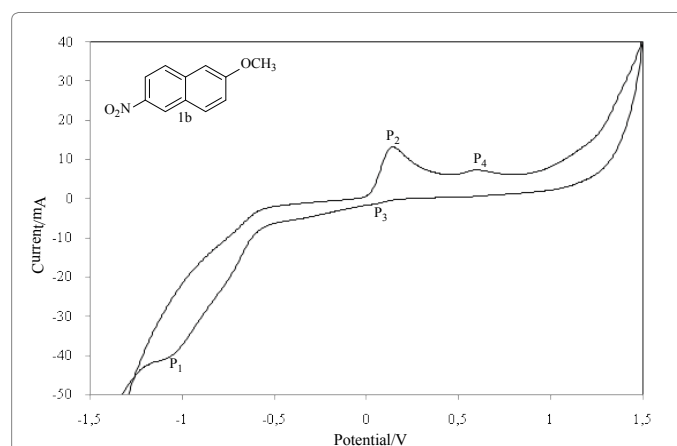


Figure 3: Voltammogram recorded for the CPE electrode in acetic buffer medium (1: 1) with molecule 1.b (NO₂ in position 6) (8×10^{-4} M), pH = 5.2 and $V_b = 100$ mV s⁻¹.

characteristic of the oxidation-reduction of the grouping nitro (NO₂) which is due to the position of the nitro group (NO₂) relative to the methoxy group (-OCH₃). We observe that the reduction peak P_3 is less visible for this molecule.

c) Analysis of the EPC modified by 1.c:

The voltammograms below show the electrochemical response obtained when the working electrode is the carbon paste modified by the molecule 1.c. The voltammogram has the same speed as those obtained by the other electrodes, except that the potentials of the peaks are shifted towards the positive values (Figure 4).

Results Summary

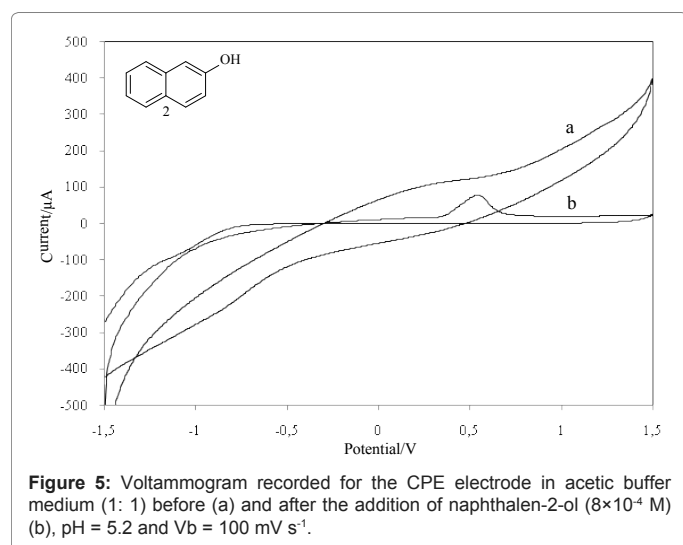
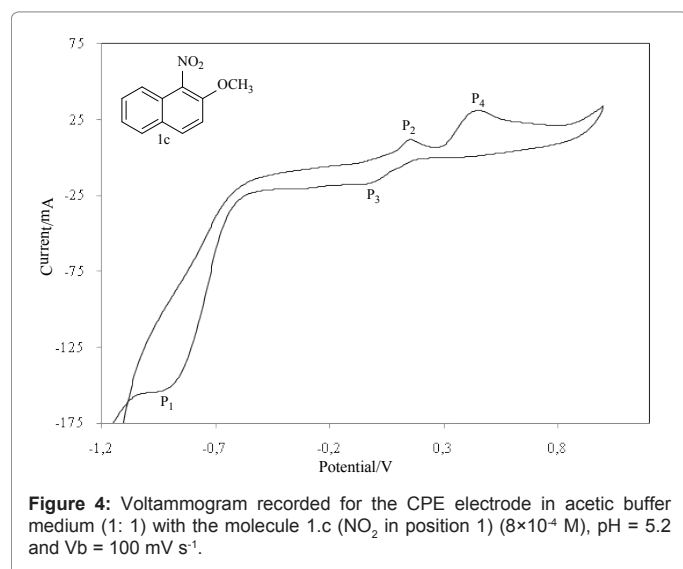
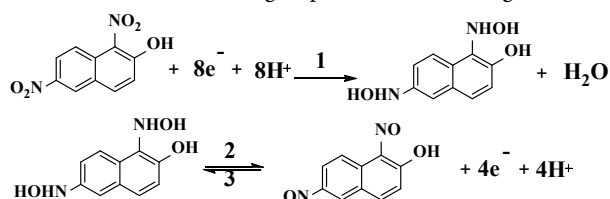
Electrochemical characterization of the parent molecule 2 before its nitration

In the light of these studies, two molecules of naphthalene were nitrated. The difference exists in the group attached to each molecule. The parent molecule 1 has a methoxy group (-OCH₃) and the parent molecule 2 has an alcohol group (OH). The electrochemical characterization of the parent molecule 1 shows no oxidation-reduction

peak (Figure 1), whereas the characterization of the parent molecule 2 exhibits an oxidation peak at the 0.5 V potential (Figure 5).

Electrochemical characterization of the nitrated molecule produced from the parent molecule 2

The peaks P_1 , P_2 , P_4 , P_3 and P_5 are even thinner compared to the peaks of the molecules of the reaction 1. We also note the presence of a single peak of reduction P_1 at the potential -0.66 V/ECS which characterizes the reduction of the two nitro groups (NO_2). On the other hand, we have two redox couples (P_2, P_3) and (P_4, P_5) which characterizes the oxidation-reduction of the groups (NHOH/NO) (Figure 6).



As it is described in Tables 2 and 3 we note that the potentials of the three characteristic peaks of the oxidation-reduction concerning the nitro group are compatible with the results seen in the bibliography.

In order to broaden our vision of the link between antioxidant and oxidoreduction, we will study the electrochemical responses of two other commercial molecules, naphthalene A and 1,2-benzenediol B, due to their chemical structures close to molecules studied during this work. Plus ascorbic acid (Vitamin C) which has a very high antioxidant activity (Figure 7).

The cyclic voltammogram of naphthalene does not represent any oxidation or reduction peak (Figure 8).

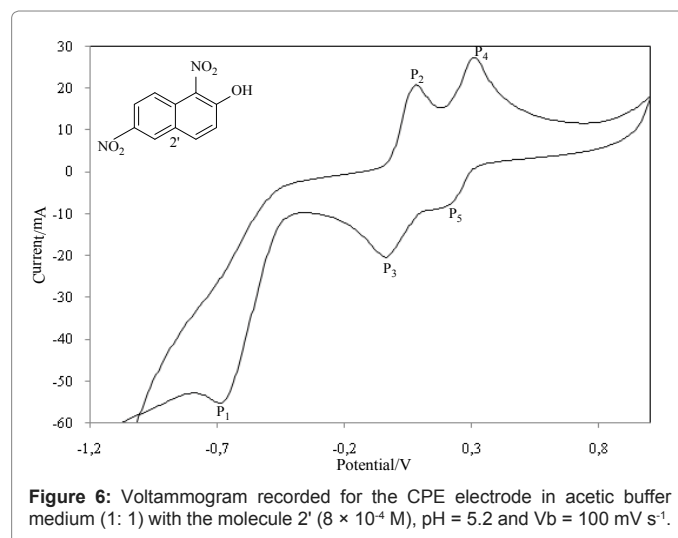
A single peak of reduction appears on the 1,2-benzenediol CV at -0.12 V/ECS potential (Figure 9). On the CV of ascorbic acid appears an oxidation peak at the potential 0.7 V/ECS.

The analysis of the electrochemical results obtained shows that the antioxidant properties of these molecules are based on two principles:

- Principle 1: The molecule has an antioxidant power, if it has stronger oxidizing properties than the molecule having the free radical.
- Principle 2: The molecule has antioxidant power, if it has stronger reducing properties than the target molecule.

We therefore deduce that:

- Molecules with oxidizing properties and reversible reducing properties (1.a, 1.b, 1.c and 2') at the liver do not have antioxidant properties because they are not part of either principle.

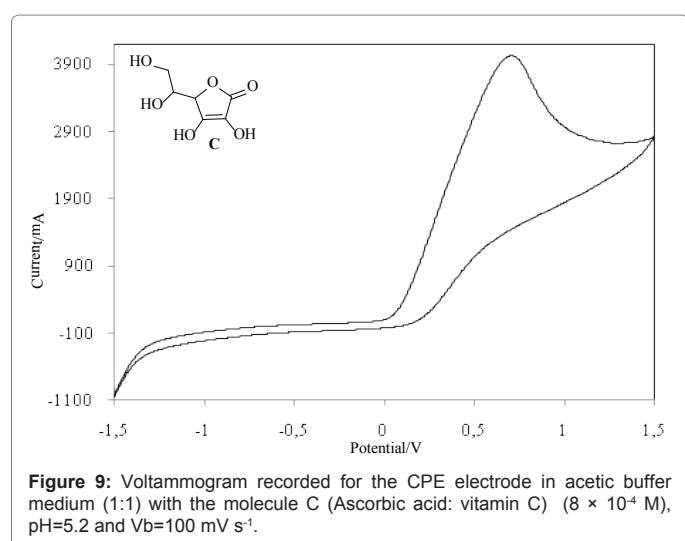
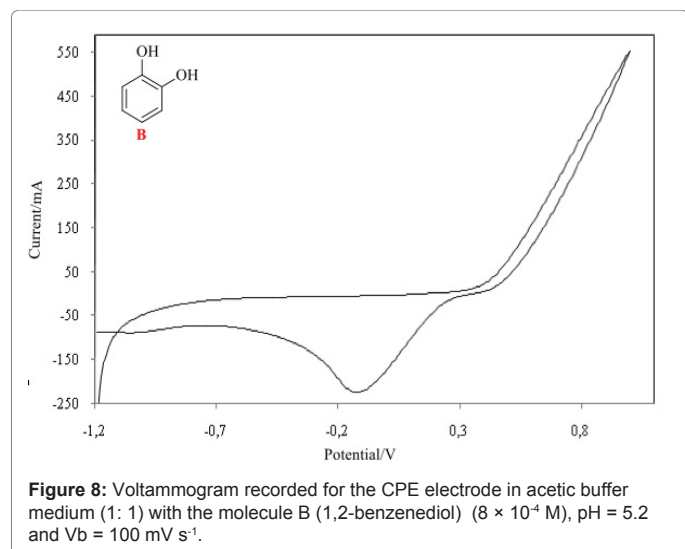
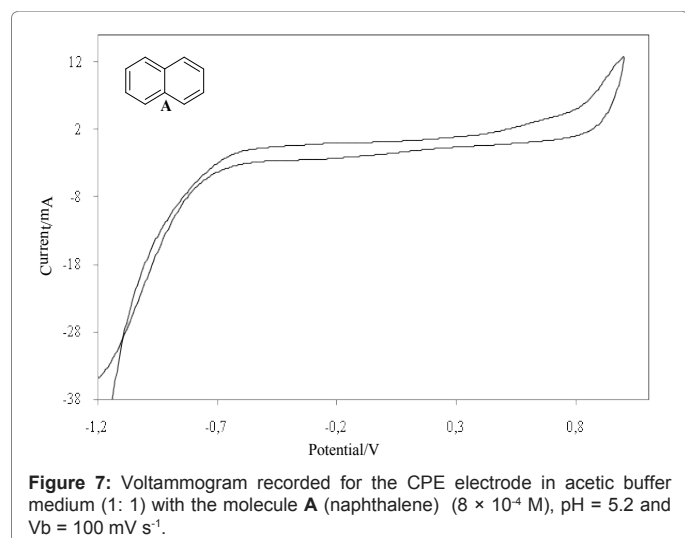


Molecule	1.a	1.b	1.c
E_{p_1} (V)	-0,815	-1	-0,87
E_{p_2} (V)	+0,13	+0,105	+0,03
E_{p_3} (V)	+0,09	+0,11	+0,11

Table 2: The potentials of the three peaks for each nitrated molecule.

Molecule	2'
E_{p_1} (V)	-0,66
E_{p_2} (V)	+0,05
E_{p_3} (V)	-0,01
E_{p_4} (V)	+0,28
E_{p_5} (V)	+0,05

Table 3: The potentials of the five peaks of the nitro molecule 2'.



- Molecules 2 and B have potential antioxidant properties:

- Molecule 2 has stronger oxidative properties than the target molecule, which follows principle 2.
- Molecule B, on the other hand, has stronger reducing properties than the free radical, which inhibits the reducing properties of the latter.

Antioxidant activity of heterocyclic nitrate systems

The free radical scavenging potentials of commercial or synthesis compounds and ascorbic acid at different concentrations were evaluated by using DPPH method. Antioxidants react with DPPH, which is a nitrogen-centered radical with a characteristic absorption at 517 nm and convert to 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine. The degree of discoloration indicates the scavenging potentials of the antioxidant compounds. The results showed that 2-naphthol as well as 1,2-benzenediol reduced the DPPH radical in dose dependent manner and the IC_{50} was found to be $50 \mu\text{g/ml}$ and $20 \mu\text{g/ml}$, respectively Figure 7 and Table 4.

Code of the molecule	Structure of the molecule	Classifications	IC_{50} Value ($\mu\text{g/ml}$)
1		methoxynaphthalene	>1600
1.a		7-methoxy-1-nitronaphthalene	>1600
1.b		2-methoxy-6-nitronaphthalene	>1600
1.c		2-methoxy-1-nitronaphthalene	>1600
2		2-naphthol	50 ± 4
2'		1,6-dinitronaphthalen-2-ol	>1600
A		naphthalene	>1600
B		1,2-benzenediol	20 ± 2
C		ascorbic acid : vitamin C	5 ± 0.5

Table 4: Antioxidant effect was evaluated by DPPH method.

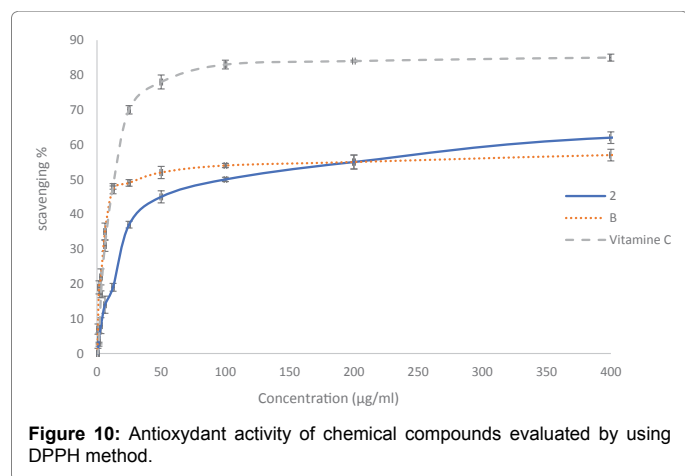


Figure 10: Antioxidant activity of chemical compounds evaluated by using DPPH method.

Compounds were prepared in DMSO then diluted in methanol at appropriate concentrations (see method section). Then 150 µl of methanolic solution of DPPH (40 µg/ml) was added to each well, shaken and the test plate was allowed to stand in the dark at 37°C for 30 min. Absorbance was measured at 517 nm using a test plate reader (ELISA).

It is noteworthy that these phenolic compounds are as active as the standard ascorbic acid ($IC_{50}=5 \mu\text{g/ml}$) used. Nitration of 2-naphtol in position 1 and 6 by bismuth penta-hydrate reagent was carried out as described in method section and the identified compound 1,6-dinitronaphtalen-2-ol was completely inactive on DPPH radical, even at highest concentrations (1,6 mg/ml) Table 4. As expected naphthalene as well as the methoxy-naphtalene series were not able to react positively with DPPH radical in our experiment conditions (Table 4 and Figure 10).

Phenolic compounds were able to scavenge radicals and to chelate metals while ascorbic acid can play a pro-oxidant role in the presence of transition metals. However, when the hydroxyl group was substituted for methoxy or when nitration on aromatic molecular part was occurred, the antioxidant power was drastically cancelled, pointing out the relationship between the capacity of hydrogen to move from hydroxyl group (phenolic) and the scavenging potentials of the antioxidant compounds. Indeed, the antioxidant capacity of the phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers, or decomposing peroxides [15,16]. The ability of some compounds to scavenge free radicals in DPPH tests does not mean that these compounds will perform readily where complex mechanisms are operating such as those in physiological substrates. For this reason, there is a need to verify the antioxidant effect in scavenging specific species such as superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). These oxygen species are often generated in organisms by diverse cellular processes, such as the electron transport chain in mitochondria, in microsomes and through enzymes like xanthine oxidase and NADPH oxidase or from exogenous factors. These reactive species, which can be increased as part of certain pathologies [17], cause oxidative damage in reactions with almost every molecule found in living cells [18,19].

Conclusion

Our work has been divided into two parts, the first one devoted to the organic synthesis of new nitrated organic molecules (1.a, 1.b, 1.c

and 2'). The second studies the antioxidant power of molecules 1 and 2, before and after nitration and other commercial molecules, in two ways: electrochemical and biological. According to the electrochemical results obtained, the molecules having at the same time the oxidizing properties and the reversible reducing properties (1.a, 1.b, 1.c and 2') have no antioxidant power, because they are not part of neither of the two principles. While, molecules 2 and B have important antioxidant properties. This has been confirmed by the biological results.

References

1. Firouzabadi H, Iranpoor N, Zolfigol MA (1997) Oxidation of Benzyl Alcohols under Mild Heterogeneous Conditions. *Russian J Organic Chem* 37: 1600-1602.
2. Riego JM, Sedin Z, Zaldivar JM, Marziano NC, Tortato C (1996) Sulfuric Acid on Silica-Gel: An Inexpensive Catalyst for Aromatic Nitration. *Tetrahedron Letters* 37: 513-516.
3. Leonard NM, Wieland LC, Mohan RS (2002) Applications of Bismuth (III) Compounds in Organic Synthesis. *Tetrahedron* 58: 8373-8397.
4. Bandyopadhyay D, Maldonado S, Banik BK (2012) A Microwave-Assisted Bismuth Nitrate-Catalyzed Unique Route Toward 1,4-Dihydropyridines. *Molecules* 17: 2643-2662.
5. Hajipour AR, Zarei A, Ruoho AE (2005) Supported Bismuth (III) Nitrate on Silica Sulfuric Acid as Useful Reagent for Nitration of Aromatic Compounds under Solvent-Free Conditions. *Russ J Org Chem* 41: 1493.
6. Badgujar DM, Talwar MB, Asthana SN, Mahuliker PP (2008) Advances in science and technology of modern energetic materials: An overview. *Journal of Hazardous Materials* 151: 289-305.
7. Pontié M, Thouand G, De Nardi F, Tapsoba I, Lherbette (2011) Silver Amalgam electrodes in electroanalysis of selected agrochemicals. *S. Electroanalysis* 23: 1579-1584.
8. Tapsoba I, Bourhis S, Feng T, Pontié M (2009) Sensitive and Selective Electrochemical Analysis of Methyl-parathion (MPT) and 4-Nitrophenol (PNP) by a New Type p-NiTSPc/p-PPD Coated Carbon Fiber Microelectrode (CFME). *Electroanalysis* 21: 1167-1176.
9. Ndlovu T, Arotiba O, Krause A, Mamba RW (2012) An Exfoliated Graphite-Based Bisphenol A Electrochemical Sensor. *Sensors (Basel)* 12: 11601-11611.
10. Zhang L, Wang G, Wu D, Xiong C, Zheng L, et al. (2018) Highly selective and sensitive sensor based on an organic electrochemical transistor for the detection of ascorbic acid. *Biosens Bioelectron* 100: 235-241.
11. Ahmad R, Mahmoudi T, Ahn MS, Hahn YB (2018) Recent advances in nanowires-based field-effect transistors for biological sensor applications. *Biosens Bioelectron* 100: 312-25.
12. Ali J, Najeeb J, Ali MA, Aslam MF, Raza A (2017) Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review. *J Biosens Bioelectron* 8: 2.
13. Lee KJ, Lee WS, Hwang A, Moon J, Kang T, et al. (2018) Simple and rapid detection of bacteria using a nuclease-responsive DNA probe. *Analyst* 143: 332-8.
14. Ye J, Nielsen S, Joseph S, Thomas T (2015) High-resolution and specific detection of bacteria on complex surfaces using nanoparticle probes and electron microscopy. *PLoS One* 10: e0126404.
15. Banica FG (2012) Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications. John Wiley & Sons 42: 3184-96.
16. Compagnone D, Francia G, Natale C, Neri G, Seeber R, et al. (2017) Chemical sensors and biosensors in Italy: A review of the 2015 literature. *Sensors* 17: 868.
17. Ghosh S, Datta D, Chaudhry S, Dutta M, Strosio MA (2018) Rapid Detection of Tumor Necrosis Factor-Alpha Using Quantum Dot-Based Optical Aptasensor. *IEEE Trans Nanobioscience* 17: 417-23.
18. Zhou Y, Chiu CW, Liang H (2012) Interfacial structures and properties of organic materials for biosensors: An overview. *Sensors* 12: 15036-15062.
19. Yoon JY (2016) Introduction to biosensors: From Electric circuits to immunosensors. Springer.

5.7. Valorisation des jus à base de karoubi pour une commercialisation future.

Evaluation de degré de conservation des différentes préparations, poudre, sirop et jus, issues de karoubi, en choisissant le pouvoir antioxydant comme paramètre intrinsèque de la nbonne conservation des aliments.

Sujet en collaboration avec IINRA Beni Méllal

Activité antioxydante (scavenging activity) (Powder, juice and sirup)

Cette étude s'inscrit dans une démarche de valorisation des jus à base de karoubi pour une commercialisation future. Nous avons considéré le paramètre « pouvoir antioxydant » comme paramètre intrinsèque de bonne conservation de l'aliment. La matière première poudre de Karoubi à été utilisée pour la préparation d'un jus et du sirop. L'évaluation du pouvoir antioxydant de chaque fraction est déterminée par le test DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazy) (voir partie Méthode).

Les résultats préliminaires montrent clairement qu'une augmentation progressive de la concentration ($\mu\text{g/ml}$) des factions (poudre, jus ou sirop) provoque un effet antioxydant plus important (Figure ci-dessous).

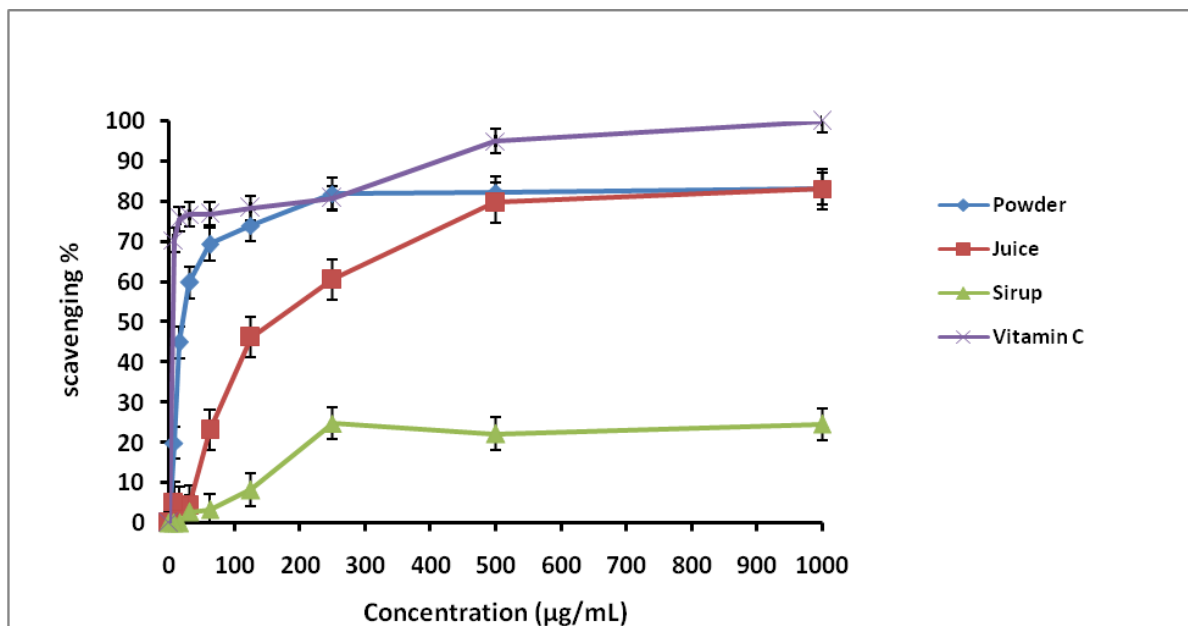


Figure 24: Effet antioxydant des différentes fractions issues de karoubi

Extracts	IC ₅₀ (µg/mL)
Powder	20
Juice	156
Sirup	-
Vitamin C	5

Ainsi, les IC₅₀ (concentration permettant de réduire de 50% la concentration initiale de DPPH) mesurés pour les fractions, poudre, jus et sirop sont 20 µg/ml, 156 µg/ml, respectivement (Tableau ci-dessus). Parallèlement, la vitamine C (contrôle positif) montre un IC₅₀ de 8 µg/ml dans les mêmes conditions expérimentales. Ces résultats montrent que le pouvoir antioxydant se retrouve mieux conservé dans la fraction jus alors que dans la fraction 'sirop' il est quasi nul. Cependant, l'étape de préparation du jus à partir de la poudre cause une baisse du pouvoir antioxydant d'un facteur 7. D'autres études sont programmées afin d'évaluer l'effet de la lumière, la température et le temps de conservation.

5.8. Discussion Générale et Conclusion

La formation de la tumeur, qui, en se développant arrive à détruire les cellules normales avoisinantes. La capacité de se diviser, de se spécialiser, mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chaque cellule saine. Sous l'influence de facteurs environnementaux, (tabac, le soleil...), de certains agents chimiques ou physiques, ou encore de certains virus, le génome humain subit des altérations, appelées mutations génétiques, qu'il est en mesure de réparer. Lorsque ce système de réparation fait défaut ou débordé, la cellule conserve ces mutations et devient anormale. Ne répondant plus aux signaux environnants elle échappe à toute régulation. Engagée dans un processus anarchique, elle accumule les anomalies et conduit au développement d'un cancer. La cellule cancéreuse peut se "détacher" de la tumeur, migrer dans une autre partie du corps (par le sang ou par la lymphe) et s'installer dans un autre endroit du corps, voire un autre organe pour créer une nouvelle tumeur. Les tumeurs créées dans un endroit différent sont appelées métastases.

L'expression de l'activité phosphatase alcaline (APAL) serait associée à une grande variété de cancer humain et une telle expression aberrante de l'APAL dans les cellules cancéreuses a suggéré son implication probable dans le développement des tumeurs [1]. Dans les lymphocytes B, l'expression de l'activité phosphatase alcaline est considérée comme marqueur intrinsèque des cellules B activée et que cette activité enzymatique est absente dans les cellules T [2]. Une augmentation de l'APAL lors de la multiplication des cellules cancéreuses (MCF-7 cells, human breast cancer) traitées par du dexaméthasone, acide rétinoïque ou du phorbol 12-myristique 13-acétate est également constatée [3]. De manière générale, lorsque les cellules cancéreuses sont stressées par la présence des drogues cytotoxiques, l'APAL augmente [4]. Les hormones stéroïdiennes comme les glucocorticoïdes sont également des régulateurs de l'APAL [5]. En revanche aucune diminution de l'activité APA n'a pu être détectée ou signalée en réponse à une stimulation ou inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales dans la littérature, à notre connaissance. Ainsi, dans le présent travail nous nous sommes intéressés à faire une première évaluation de la corrélation entre l'effet antiprolifératif (ou prolifératif) des drogues pures (carvacrol et cisplatine) et la modulation de l'APAL dans la lignée tumorale P815.

L'inhibition de l'activité phosphatase alcaline par le carvacrol, à faible concentration, est corrélée avec la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses P815 [Ayad H et al. 2016 ; Ayad H, 2018; Ayad et al. Article soumis, ci-joint]. Le même phénomène a pu être observé dans les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (PBMC) avec une sensibilité moindre (5 fois moins sensible). Les effets observés après 24 à 48h d'incubation, cycle cellulaire, suggère fortement une régulation/inhibition au niveau de la transcription des gènes codant pour la ou les phosphatases alcalines (PA) dans les cellules cancéreuses P815. Pas d'effet inhibiteur direct du carvacrol sur l'APAL préparée à partir des cellules P815. Cet effet prolifératif observé du carvacrol sur la lignée P815 avec la baisse considérable (-70%) de l'APAL intracellulaire est un résultat nouveau, jamais détecté ou signalé auparavant lors de la stimulation ou l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales. Cet effet prolifératif qui apparaît concomitant à l'effet répressur du carvacrol sur l'APAL, suggère que lorsque cette activité enzymatique est réprimée les cellules tumorales P815 prolifèrent mieux. Contrairement aux extraits ou drogues cytotoxiques qui montrent une corrélation entre l'effet antiprolifératif et l'augmentation de l'APAL. De plus, l'effet du carvacrol à faible dose apparaît similaire à celui obtenu par action de l'agent mitogène pookweed (facteur de croissance) utilisé dans le présent travail. En effet, le pookweed stimule la prolifération des cellules cancéreuses P815 et au même temps réprime l'APAL, exactement comme le carvacrol [Ayad H. et al. Article soumis]. Le fait que le carvacrol possède cette propriété mitogen-like pourrait nous ouvrir une autre voie différente et nouvelle pour contrer ce fléau « cancer » qui ne cesse de proliférer. La caractérisation de la cible phosphatase alcaline et son implication probable dans le contrôle cellulaire serait d'un atout considérable pour le développement d'une nouvelle approche thérapeutique.

Le développement d'une nouvelle molécule douée d'activité thérapeutique (médicament) à partir de la conception, les tests préliminaires et les phases cliniques (I, II, III et IV), jusqu'à sa mise sur le marché est un processus très long et très coûteux. Le coût global est estimé à environ 900 millions de dollars American soit 9000 millions de dirhams. Les tests préliminaires (précliniques) constituent une étape capitale, permettant d'éliminer les drogues inefficaces avant d'entamer la recherche clinique. La culture *in vitro* des cellules cancéreuses représentant une maladie (cancer) ou une anomalie biochimique associée à cette maladie [6,7], et la mise en place des tests de détermination du % d'inhibition de la croissance

cellulaire (viabilité cellulaire) est devenue primordiale dans le screening des molécules ayant un potentiel thérapeutique. Il est donc crucial d'avoir une ou des méthodologie(s) précise(s) de screening initial des drogues dans la phase de recherche préclinique avec des résultats exploitables à partir de test de cytotoxicité *in vitro*. Ces résultats peuvent influencer considérablement sur le choix de la molécule « tête de série » pour la suite du processus de développement.

Plusieurs méthodes ont pu être développées pour l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro*, dont certaines sont applicables sur les cellules adhérentes et non adhérentes. Cependant aucune n'est universelle. De plus, sur les mêmes lignées tumorales, différentes méthodes d'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* peuvent donner des résultats différents [8]. Le test MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] est devenu une référence pour la détermination de la viabilité et la prolifération cellulaire depuis son adoption par l'Institut National de Cancer dans son programme de recherche de nouvelles drogues douées d'activité anti cancéreuse [9,10]. La méthode MTT est basée sur la conversion du tetrazolium en cristaux de formazan (forme insoluble) essentiellement par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes et non pas les cellules mortes [11, 12]. Cependant, la réduction du réactif tetrazolium par d'autres déshydrogénases intracellulaires notamment au niveau du réticulum endoplasmique et par de nombreux composés endogènes et exogènes, pose le problème de la sensibilité et de la spécificité de la méthode [13, 14]. En pratique, l'élimination d'une partie du milieu de culture avant l'addition du réactif MTT est très hasardeuse et cela est particulièrement vrai pour les cellules cancéreuses non adhérentes (cellules en suspension). De plus, de nombreuses tentatives d'utilisation de ce test ont échoué d'établir une relation linéaire entre le produit MTT-formazan et le nombre de cellules, notamment à des densités cellulaires élevées [9, 11]. Ceci est particulièrement important, car le plus grand nombre de cellules (forte croissance cellulaire) se trouve dans les cellules témoins non traitées et celles-ci constituent une référence pour déterminer les paramètres de sensibilité aux drogues ou aux médicaments cytotoxiques. Un autre désavantage de la méthode MTT est que le cristal de formazan formé par les cellules vivantes est insoluble dans le milieu de culture, de sorte qu'une étape supplémentaire d'addition de solvant est nécessaire pour le dissoudre. Une étude récente a proposé qu'une solubilisation du formazan par un mélange SDS-HCl 0,01 M offre des résultats meilleurs [15].

En outre, une interférence entre le test MTT et tous les inhibiteurs de la glycolyse testés a été observée et à cet égard, toute analyse de chimio-sensibilité devant être utilisée pour

évaluer de nouveaux agents cytotoxiques (médicaments) ou combinaisons potentiels doit être évaluée pour en déterminer leur potentiel d'interférence. En effet, les interférences entre le test MTT et les inhibiteurs d'hexokinase ainsi que la lonidamine qui inhibent toute la glycolyse ont été étudiés. Les inhibiteurs d'hexokinase, le 2-désoxyglucose (2DG) et le 3-bromopyruvate (3-BrPA), annulent la conversion du glucose en glucose-6-phosphate par des hexokinases [16]. En revanche, l'exposition à la lonidamine (LON) provoque des dommages au niveau des mitochondries et finalement l'arrêt de la glycolyse [17]. La glycolyse aérobie est la voie de production d'énergie privilégiée des cellules cancéreuses, un phénomène connu sous le nom d'effet Warburg [18]. Les cellules normales ne présentent pas un taux d'activité élevé de la voie glycolyse conduisant à la génération de seulement deux molécules d'ATP par molécule de glucose utilisé, alors que le cycle de Krebs produit 36 molécules d'ATP pour chaque molécule de glucose consommée [19]. La conversion du glucose en glucose-6-phosphate par les hexokinases est la seule étape limitante dans la voie glycolytique et donc une cible très attrayante pour les agents chimio-thérapeutiques potentiels [20]. Du fait que ces inhibiteurs de la glycolyse exercent un effet sur l'activité mitochondriale, il est donc fort probable que ces inhibiteurs, comme d'ailleurs toutes les molécules ayant un potentiel d'oxydoréduction, puissent interférer avec le teste MTT de dénombrement des cellules. Ce paramètre d'interférence doit être envisagé avant la finalisation des protocoles expérimentaux.

Les méthodes utilisées lors de la sélection initiale des anticancéreux potentiels doivent être suffisamment sensibles à détecter de petites différences dans le nombre de cellules; mais suffisamment robuste pour générer des résultats reproductibles sous diverses conditions expérimentales. Dans ce sens, la mise en place d'une procédure expérimentale simple peut assurer des données fiables à partir de la première expérience et présenter un potentiel pour l'automatisation.

Le test DCPIP (2-6 DiChloroPhenol-Indophenol), proposé dans le présent travail [Ayad H et al. article soumis, ci-joint], constitue une bonne alternative et / ou complémentaire à la méthode MTT. En effet, le test DCPIP ne dépend pas du métabolisme fonctionnel des cellules vivantes, contrairement au test MTT qui peut être influençable par le milieu de culture, la situation métabolique de la cellule et par les interférences métaboliques causées par les inhibiteurs de la glycolyse [21, 22]. Etant donné que le test DCPIP est réalisé avec des cellules homogénéisées en présence du détergent TX-100, la décoloration (réduction) de DCPIP est corrélée au pouvoir réducteur d'enzymes déshydrogénases, y compris la succinate

déshydrogénase, et leur quantité. Pour valider ce test DCPIP, nous avons utilisé des cellules cancéreuses adhérentes, lignée MCF7 (human breast cancer cell line) et lignée MDAMB468 (human triple-negative breast cancer cell line), et des cellules cancéreuses non adhérentes, lignée P815 (murine mastocytoma cell line). L'inhibition de la croissance cellulaire (chimio-sensibilité) *in vitro* a été déterminée conjointement par la méthode DCPIP et la méthode MTT. Ainsi, nous avons mis au point une nouvelle méthode de chimio-sensibilité, basée sur la réduction du réactif DCPIP, applicable aux cellules adhérentes et non adhérentes, simple, rapide et peu coûteuse et qui donne des résultats quasi similaires à ceux obtenus par le test MTT [Ayad, H et al. Article soumis].

Parallèlement, nous avons entrepris une étude d'évaluation de l'effet cytotoxique et antioxydant des différentes molécules nouvellement synthétisées, *famille des dihydropyrimidinones*, les *dérivés Hydrazones Hétérocycliques* et les systèmes *Hétérocycliques Nitré*. L'objectif étant de sélectionner des molécules 'tête de série' et d'envisager une étude relation structure-activité afin d'orienter la synthèse chimique et d'améliorer leur l'efficacité cytotoxique.

De manière générale, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'oxygène singulet (1O_2), le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont des molécules partiellement réduites et fortement toxiques. Elles sont responsables des dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique [23,24]. Ces espèces oxygénées sont produites par l'organisme au cours des réactions métaboliques normales des cellules. D'un autre côté l'exposition environnementale à divers facteurs (tabac, polluants, radiations ioniques, alcool, pesticides synthétiques...) peut être un facteur aggravant et augmente leur production [25-28]. Cette surproduction au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies, inflammatoires [29,30], auto-immunes [25], neuro-dégénératives [27], cardiaques [31], diabète [32] ou certains cancers [33]. Pour échapper à ces graves conséquences du stress oxydant, l'apport d'antioxydants s'avère nécessaire. Les antioxydants sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour maintenir la

qualité des aliments et les protéger des phénomènes d'oxydations. C'est dans ce sens, que nous avons utilisé le pouvoir antioxydant comme critère de stabilité et de conservation des aliments (qualité) dans l'étude de valorisation des jus à base de karoubi pour une commercialisation future (en collaboration avec INRA Beni-Méllal).

Actuellement les antioxydants synthétiques les plus utilisés comme le BHT (Butyl Hydroxy Toluene) et le BHA (Butyl Hydroxy Anisole) peuvent être toxiques [34]. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques [35]. Il présente aussi des effets carcinogènes chez le rat [36]. De nouvelles recherches sont donc menées afin de découvrir de nouveaux antioxydants d'origine naturelle ou synthétique. De plus, les antioxydants inhibent la synthèse des prostaglandines et induisent des enzymes métabolisant les médicaments en plus de nombreuses activités biologiques [37, 38].

Les résultats obtenus dans le présent travail sont prometteurs pour certaines molécules, notamment 1-(4-méthoxybenzylidène)-2- phénylhydrazine ($IC_{50} = 1.5 \mu\text{g/ml}$ sur la lignée P815) avec des effets anticancéreux nettement meilleurs que l'anticancéreux de référence cisplatine ($IC_{50} = 12 \mu\text{g/ml}$ sur la même lignée P815). Ce dérivé hydrazone, 1-(4-méthoxybenzylidène)-2- phénylhydrazine, montre également un effet antioxydant ($IC_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$) semblable à celui de la vitamine C ($IC_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$) [Article soumis, ci-joint]. En revanche la molécule 1-(3-nitrobenzylidène)-2- phénylhydrazine montre une cytotoxicité significative (IC_{50} entre 7 et 20 $\mu\text{g/ml}$) sur toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées, adhérentes et non adhérentes, alors que son effet antioxydant apparaît moins important ($IC_{50} = 60 \mu\text{g/ml}$), due à la présence du groupe attracteur NO_2 . On a entrepris une étude électrochimique et pouvoir antioxydant des Systèmes Hétérocycliques Nitré. Le but étant d'établir une corrélation entre le pouvoir antioxydant et les réactions d'oxydoréductions afin d'orienter au mieux la synthèse chimique des futures molécules [Article en préparation, ci-joint]. A terme, il serait intéressant de définir des paramètres chimiques et électrochimiques spécifiques à chaque substituant (NO_2 , $\text{CH}_3\text{-O-}$, ...) utilisé, et d'évaluer leur impact sur la cytotoxicité des cellules tumorales.

En conclusion, il apparaît que l'activité phosphatase alcaline est prépondérante dans la nature. Elle est présente dans une grande diversité de milieux naturels. Ce caractère quasi-ubiquitaire des phosphatases alcalines laisse penser que cette activité enzymatique joue un rôle très important dans les processus fondamentaux de la vie. L'effet répresseur du Carvacrol sur l'activité phosphatase alcaline intracellulaire, lors de la stimulation ou l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ou cellules normales, est un résultat nouveau, jamais détecté ou signalé auparavant. L'implication de cette enzyme dans le contrôle prolifératif/antiprolifératif des cellules tumorales, soulève une fois de plus le rôle central que pourrait jouer cette activité phosphatase alcaline dans le développement du cancer. Les effets observés après 24 à 48h d'incubation (cycle cellulaire) suggèrent fortement une régulation/inhibition au niveau de la transcription des gènes codant pour la ou les phosphatases alcalines « type prolifératif » (PAL-*pr*) dans les cellules cancéreuses P815. De plus, l'effet du Carvacrol à faible dose apparaît similaire à celui obtenu par l'action de l'agent mitogène pookweed (facteur de croissance) utilisé dans le présent travail. Cette propriété *mitogen-like* du Carvacrol renforce notre approche expérimentale et pourrait nous ouvrir une autre voie différente et nouvelle pour contrer ce fléau « le cancer » qui ne cesse de proliférer. En effet, cette activité PAL-*pr* pourrait être une enzyme particulière (iso-enzyme de la famille des phosphatases alcalines) et lorsqu'elle est réprimée de manière spécifique, directement ou indirectement, conduirait à la prolifération cellulaires cancéreuses. Dans cette hypothèse, la PAL-*pr* constituerait une cible potentielle pour l'immunothérapie et la chimiothérapie.

Références

- [1]. Tsai LC, Hung MW, chen VHSu, chang GG, ghang TC. Expression and regulation of alkaline phosphatase in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Biochem.* 2000; 267 : 1330-1339.
- [2]. Feldbush TL, Lafrenz D. Harry S. Truman Hôpital mémorial des anciens combattants, Columbia, Missouri. *J immunol.* 1991 Dec 1; 147(11):3690-5
- [3]. Chang TC, Wang JK, Hung MW, chiao CH, Tsai LC, chang GG. Regulation of the expression of alkaline phosphatase in a human breast cancer cell line. *Biochem J* . 1994; 303:199-205.
- [4]. Sadeghirizi A and Yazdanparast R. Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from *Dendrostellera lessertii*. *Acta Biochimica Polonica.* 2007; 54: 323-329.
- [5]. Majeska, RJ, Nair, BC and Rodan, GA. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology* (Baltimore) 1985; 116, 170-179

- [6]. Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005; 31:757–68.
- [7]. Adams CP, Brantner VV. Estimating the cost of new drug development: Is it really \$802 million? *Health Affair.* 2006; 25(2):420–8.
- [8]. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics.* 2005, 288: 369-376.
- [9]. Carmichael J, DeGaff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., and Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987, 47:936-942.
- [10]. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbot B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., and Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 1988, 48:589-601.
- [11]. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55–63.
- [12]. Berridge MV., Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives Biochem. Biophys.* 1993, 303:474-482.
- [13]. Lü L, Zhang L, Wai MSM, Yew DTW, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol in Vitro.* 2012; 26: 636–44.
- [14]. Stockert JC, Blázquez-Casto A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: intracellular localisation of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012, 114:785–96.
- [15]. Septisetyani E.P., RatihAsmanaNingrum, YulaikaRomadhani, PopiHadiWisnuwardhani, AdiSantoso. Optimization of sodium dodecyl sulphate as a formazansolvent and comparison 3-(4,-5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with WST-1 assay in MCF-7 cells. *Indonesian J. Pharm.* 2014, Vol. 25 No. 4 : 245 – 254.
- [16]. Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:1358–66.
- [17]. Rosbe KW, Brann TW, Holden SA, Teicher BA, Frei III E. Effect of lonidamine on the cytotoxicity of four alkylating agents in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 25:32–6.
- [18]. Warburg O, Posener K, Negelein E. Uber den stoffwechsel der tumoren. *Biochem Z.* 1924; 152:319–44.
- [19]. Kim J-W, Dang CV. Cancer’s molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* 2006;66(18):8927–30.
- [20]. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene.* 2006; 25:4633–46.
- [21]. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991; 51:2515–20.
- [22]. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro.* 2001; 15:257–9.

- [23]. Halliwell B. & M. Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage *in vitro* and in cell culture how should you do it and what do the results mean. *British J. Pharmacol.* 2004, 142, 31-32.
- [24]. Valko M., C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic & M. Mazur. Free radicals, metal and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol.Interact.*, 2006, 160, 1-40.
- [25]. Halliwell B. & J.M. Gutteridge, 1989.-*Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Clarendon Press, 543 p.
- [26]. Pincemail J., K. Bonjean, K. Cayeux & J.O. Defraigne. Physiological action of antioxidant defences. *Nutr. Clin. Métabol.* 2002, 16, 233-239.
- [27]. Sorg O., 2004.- Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *C. R. Biol.* 2004, 327, 649-662.
- [28]. Kocchilin-Ramonatxo C., 2006.- Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. Métabol.* 2006, 20, 165-177.
- [29]. Ahsan H., A. Ali & R. Ali. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, 131, 398-404.
- [30]. Dnsiov E.T. & I.B. Afanas'ev.-*IN: oxidation and antioxidants inorganic chemistry and biology*. Taylor & Francis Group (U.S.A), 2005, 703-861.
- [31]. Harrison D., K.K.Griendling, U. Landmesser, B. Hornig & H. Dresler, 2003.- Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 2003, 91, 7-11.
- [32]. Pal Yu.B., 1994.- Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopath. Rev.* 1994, 74, 139-155.
- [33]. Valko M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur & J. Telser. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.* 2007, 39, 44-84.
- [34]. Yu R., S. Mandlekar & T. Kong, 2000.- Molecular mechanisms of butylated hydroxyl anisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome.
- [35]. Barlow S.M. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. *In: Food Antioxidants*. B.J.F.Hudson (ed), London UK, Elsevier, 1990, 253-307.
- [36]. Ito N., M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai & M. Tatematsu. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24 (10-11), 1071-1082.
- [37]. Azirak S, Rencuzogullari E. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bonemarrow cells. *Environ. Toxicol.* 2008, 23: 728-735.
- [38]. Alagawani M, MohaMed ezzat abd el-hack1, Mayada Ragab FaRag2, Ruchi tiwaRi3, kuldeep dhaMa4. Biological Effects and Modes of Action of Carvacrol in Animal and Poultry Production and Health - A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* 2015, 3(2): 74-84.

5.9. PERSPECTIVES

Implication de la Phosphatase Alcaline *proliférative* (PA-*pr*) dans les cellules cancéreuses : caractérisation et ciblage potentiel pour l'immunothérapie et la chimiothérapie.

Implication de la Phosphatase Alcaline *proliférative* (*PAL-pr*) dans les cellules cancéreuses : caractérisation et ciblage potentiel pour l'immunothérapie et la chimiothérapie.

La phosphatase alcaline de type proliférative (*PAL-pr*) serait probablement responsable et/ou impliquée fortement dans une voie de « signalisation intracellulaire », contrôlant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses *via* un mécanisme impliquant la répression du gène codant pour *PAL-pr*. Cette activité *PAL-pr* pourrait être une enzyme particulière (iso-enzyme de la famille des phosphatases alcalines) et lorsqu'elle est réprimée de manière spécifique, directement ou indirectement, conduirait à la prolifération cellulaire. Dans cette hypothèse, il serait primordial d'établir un profil protéique, sur un gel polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-page) et non dénaturantes, avec repérage des différentes activités PAL, y compris l'activité *PAL-pr*, issues des cellules traitées ou non. L'identification des activités PA sur gel pourrait être réalisée par l'incubation des petits fragments du gel avec le substrat PNPP ou visualisée directement sur le gel en utilisant une solution 5 mg/ml de 5-bromo-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt (BCIP). Parallèlement à la caractérisation biochimique de la *PAL-pr*, une première caractérisation immunologique par l'utilisation d'anticorps (anti-phosphatases alcalines disponibles sur le marché) après transfert sur nitrocellulose est indispensable.

Nous tenterons de démontrer que l'activité *PAL-pr* est complètement différente de celles exprimées lors des stress cellulaires, provoqués par des anticancéreux cytotoxiques notamment la vincristine, cis platine, etc. Dans cette hypothèse, la recherche du gène codant pour cette activité *PA-pr* serait indispensable. Ainsi, l'évaluation du nombre de copie exprimée de chaque gène des différents iso-formes des phosphatases alcalines, en utilisant les amorces des oligonucléotides spécifiques de chaque gène étudié.

La spécificité de cette activité *PAL-pr* pourrait ouvrir des perspectives à la fois au niveau fondamental et notamment la compréhension des mécanismes impliqués dans la signalisation/régulation de la prolifération cellulaire mais également une cible de choix pour une approche immunologique, pharmacologique et thérapeutique. Dans ces perspectives, l'utilisation des anticorps anti-phosphatases alcalines qui existe déjà sur le marché pourrait

se révéler primordial pour la mise au point d'un protocole de ciblage des cellules cancéreuses exprimant et de manière spécifique l'iso forme PAL-*pr*.

En fin, y a t il un lien entre l'activité PAL-*pr* et la voie tyrosine kinase ?. Est-ce que l'effet cytotoxique sur les cellules tumorales n'impliquerait pas le système de phosphorylation/déphosphorylation de(s) substrat(s) comme la voie tyrosine kinase ?. Dans cette hypothèse, l'augmentation de l'activité PAL, généralement observée dans les cellules traitées par les drogues cytotoxiques, ne serait elle pas impliquée dans la régulation de la voie tyrosine kinase ?, *via* une déphosphorylation. Inversement, la baisse de l'expression de l'activité PAL-*pr* intracellulaire, par le Carvacrol par exemple, épargnerait la régulation par déphosphorylation et par conséquent favoriserait la prolifération des cellulaires tumorales observées dans les cellules P815 [AYAD H et al. 2016 ci-dessus].

Approches préconisées et méthodologie

Parallèlement à l'extraction, purification et synthèse chimique (hemi-synthèse), le screening des molécules repose sur des expériences *in-vitro* qui seront validées sur un modèle animal, souris DBA-2 porteuse de la tumeur P815. Diverses lignées tumorales (humaines et animales) sont utilisées. Nous avons mis au point la technique de cytotoxicité des cellules tumorales par des produits exogènes ainsi que celle d'analyse de l'expression des gènes par PCR. La technique de suivie de l'effet des produits sur la progression tumorale *in-vivo* est également une technique de routine dans notre laboratoire (voir ci-dessous).

A. Effet cytotoxique sur les lignées tumorales in vitro.

Les différentes fractions et drogues seront testées pour leur capacité cytotoxique contre des lignées tumorales établies d'origine animale (P815, L929, BHK, Vero, Hep, DC-3F) ou humaine (IGR-OV1, MCF-7) et leurs homologues sélectionnées pour leur résistance à la chimiothérapie et donc qui expriment le gène MDR1 (L929/MDR, MCF-7/ADR, IGR-OVI/ADR, IGR-OVI/VCR, et IGR/CP). Il est à noter que les lignées MCF7-ADR et IGR-OVI/ADR sont résistantes à l'adriamycine alors que les lignées IGR-OVI/VCR et IGR-OVI/CP sont résistantes à la vincristine et au cis-platine, respectivement. Ces lignées font partie d'une banque de lignées tumorales dont nous disposons au sein de notre laboratoire. Ces cellules tumorales seront cultivées dans des plaques de cultures de 96 puits. La densité

cellulaire est de 10 000 cellules par puits dans un volume de 100 µl de milieu de culture (RPMI 1640 supplémenté par le sérum de veau fœtal, de glutamine et de pénicilline). Les incubations seront effectuées en présence de concentrations variables des différents produits (ou fractions) pendant 24, 48 ou 72 heures dans une atmosphère humide à 37°C et 5% CO₂. Ensuite la cytotoxicité au niveau de chaque puits sera mesurée par de DO à 540 nm en utilisant la technique de DCPIP développé dans notre laboratoire (Ayad H. et al. Soumis). Ces techniques sont actuellement disponibles dans notre laboratoire à Beni-Mellal et des résultats ont déjà été obtenus par ces techniques. Les molécules (ou fractions) toxiques contre les lignées tumorales étudiées, seront testées pour leur capacité à induire la mort cellulaire programmée (apoptose) (voire ci-après en C).

B. Effet sur la progression tumorale in vivo.

Un modèle de souris syngéniques a été mis en place. Ce modèle utilise des souris DBA-2 porteuses de l'haplotype (H2^d) qui reçoivent, par injection sous cutanée, une suspension de cellules tumorales P815 du même haplotype (H2^d). Ces souris développent une tumeur palpable dont le volume (en mm³) peut être mesuré chaque jour. Ces souris seront traitées par différentes doses d'extraits (ou produits purifiés) et la progression ou la régression tumorale sera suivie pour chaque lot de souris. Les souris témoins recevront du PBS seul. Parallèlement, nous analyserons l'effet des différents composés (ou extraits) actifs sur le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses. En effet, P815 est une lignée tumorale qui donne des métastases au niveau hépatique et pulmonaire. Les différents lots traités ou non seront examinés pour le développement des métastases. D'autres paramètres tels que la variation du poids corporel, la longévité, la numération des PBMC au cours du traitement seront aussi mesurés.

C. Analyse de la mort cellulaire programmée (apoptose)

De nombreuses drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse induisent la mort par apoptose des cellules cibles. Cette induction peut être directe ou indirecte, conséquence de lésions causées dans l'ADN. Plusieurs mécanismes ont été invoqués pour expliquer cette induction de l'apoptose : induction de Fas et Fas-L, activation des MAP-kinases des voies de stress, stimulation du relargage de cytochromes C par les mitochondries [1-4]. Le mode

d'action de l'apoptose pourrait dépendre à la fois des drogues utilisées et du type cellulaire. Nous mesurerons l'induction de l'apoptose par les différents composés (ou extraits) actifs et par les composés usuellement utilisés dans la chimiothérapie (adriamycine, vincristine, cisplatine, taxol). Parallèlement, nous chercherons à associer aux stimuli susceptibles de déclencher l'apoptose une activation des caspases ou une modulation de l'expression des gènes régulateurs de ce phénomène (Myc, p53, Bc-2, Bax, ..)

Deux méthodes seront utilisées pour apprécier la mort cellulaire programmée. La première est celle de la dégradation d'ADN en fragment de 100 à 200 paires de bases donnant un aspect de « barreaux d'échelle » en électrophorèse. Cette technique est maintenant en place dans notre laboratoire de Béni-Mellal. Les lignées tumorales seront incubées pendant 6, 12 ou 24 heures en présence des différents composés purifiés. L'ADN sera préparé à partir d'une suspension cellulaire (10 millions de cellules) en utilisant la technique du phénol-chloroforme. La séparation des fragments sera effectuée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1-2% en présence d'un marqueur de poids moléculaires. Les différents fragments seront visualisés sous la lumière ultraviolette à 312 nm. La présence des bandes d'ADN sous forme de barreaux d'échelle témoignerait d'une mort cellulaire de type apoptotique.

Dans la deuxième méthode, nous utiliserons la microscopie à fluorescence avec prise de photographie afin de visualiser le noyau des cellules en apoptose après coloration par l'acridine orange, l'iodure de propidium ou l'annexin V.

Ces deux approches complémentaires devraient nous permettre de visualiser l'apoptose mais également de distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques.

D. Evaluation par technique PCR des effets des principes actifs sur l'expression des gènes

La plupart des médicaments utilisés en chimiothérapie induisent l'activation de gènes associés à la réponse cellulaire immédiate aux lésions de l'ADN, en particulier les gènes Fos, Jun, p53, Gadd, polymérase- β , PKC, les gènes codant pour les ubiquitines, ainsi que d'autres protéines nucléaires se liant aux adduits de l'ADN. Cette induction pourrait être liée, du moins en partie, à l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinases, des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases), protéines kinases associées à l'ADN. Ces dernières activées suite à des lésions de l'ADN, phosphorylent un certain nombre de protéines incluant Fos, Jun, la protéine de la réplication HSSB (human single stranded DNA-binding protein),

et la p53 [5]. Bien que le rôle de ce phénomène d'induction ne soit pas clairement établi, il est cependant fort probable que cela passe par une régulation/activation des protéines de réparation et/ou par la modulation du cycle cellulaire à la suite des lésions de l'ADN. Dans ce dernier cas, la p53 est requise pour l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, étape nécessaire pour la réparation [6,7]. L'inactivation de la p53 par des mutations est très fréquente dans les cancers humains et y est souvent associée à la résistance et aux rechutes. Les mutations dans p53 sont également capables d'induire la résistance cellulaire aux facteurs de croissances [8] et de moduler les gènes de résistance. Ainsi, il a été démontré que la p53 mutée stimule le promoteur du gène MDR1 [9].

C'est dans cette optique que la technique de PCR compétitive sera utilisée pour étudier l'effet des différents composés (ou extraits) sur l'expression des gènes contrôlant la régulation de la prolifération cellulaire, y compris l'apoptose (Bcl-2, Myc, p53, bax, Fas et Fas-L), ainsi que ceux impliqués dans la réponse cellulaire immédiate aux lésions de l'ADN (Fos, Jun, Gadd, p53). La même technique sera également utilisée pour mettre en évidence l'expression du gène codant pour les phosphatases et notamment la forme proliférative (PAL-*pr*). Cette étude concernera aussi bien les lignées tumorales en culture *in vitro* que les tumeurs traitées *in vivo* par les différents produits toxiques. *In vitro*, les différentes lignées tumorales seront stimulées pendant 3, 6 ou 12 heures par des concentrations cytotoxiques minimales des composés actifs. Les cellules seront ensuite lavées et les RNA totaux préparés par le kit « RNA-plus » commercialisé. Ces RNA seront soumis à une transcriptase inverse en utilisant un oligo (dt) pendant une heure à 37°C. PCR compétitive sera amorcée en utilisant comme matrice les cDNA et comme amorce des oligonucléotides spécifiques de chaque gène étudié. Cette réaction se déroule en présence de la taq polymérase et des dNTPs. La PCR est rendue compétitive par l'addition dans le milieu réactionnel des concentrations croissantes des inhibiteurs respectifs pour chaque gène. Cette technique est mise au point au sein de notre laboratoire.

Parallèlement à ces études de PCR au niveau des ARN, une autre étude au niveau des protéines correspondantes sera également menée au sein de notre laboratoire. Pour ce faire, nous procéderons à une culture des lignées tumorales pendant 12, 24, 48 et 72 heures en présence des concentrations cytotoxiques minimales des différents composés. Par la suite, les cellules seront lavées dans du PBS, perméabilisées dans du méthanol (10 minutes à -20°C) et testées pour l'expression des protéines codées par les gènes sus-cités en utilisant des

anticorps couplés à la fluorescéine. Ce test de fluorescence fait appel à un appareil de cytométrie en flux (FACS) ou peut être effectué en utilisant un microscope à fluorescence.

Références

- [1]. Friesen C, Herr I, Krammer PH and Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med.* 1996; 2:574-577.
- [2]. Fulda S, Susin SA, Kroemer G and Debatin KM. Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1998; 58: 4453-4460.
- [3]. Carson DA, Wasson DB, Esparzal LM, Carrera CJ, Kipps TJ. and Cottam HB. Oral antilymphocyte activity and induction of apoptosis by 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-desoxyadenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89 :2970-2974.
- [4]. Yoshioka A., et al. Desoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-fluorodesoxyuridine-induced DNA double stand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:8235-8241.
- [5]. Gottlieb TM and Jackson SP. Protein kinases and DNA damage. *Trend Biol. Sci.* 1994; 19:500-503.
- [6]. Kahn A. Cycle cellulaire, cancer, sénescence et p53. *Médecine/Science* 1994; **10**:206.
- [7]. Marx J. New link found between p53 and DNA repair. *Science* 1994; 266: 25.
- [8]. Reiss M, Vellucci VF, Zhou ZL. Mutant p53 tumor suppressor gene causes resistance to transforming growth factor beta 1 in murin keratinocytes. *Cancer Res.* 1993; 53:899-904.
- [9]. Nguyen KT, Liu B, Ueda K, Gottesman MM, Pastan I. and Chin KV. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants. *Oncol. Res.* 1994; 6:71-77.

