

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1 : Microparticules, exosomes et corps apoptotiques, (Mause and Weber, 2010).	10
Figure 2 : Cycle cellulaire.	15
Figure 3 : Aoptose et mitochondrie	16
Figure 4: La voie du recepteur du Fas.	17
Figure 5: Le role de l'autophagie dans les maladies humaines (Mizushima 2008).	19
Figure 6: Résumé des voies de résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Sui et al 2013).	20
Figure 7 : Historique de la chimiothérapie anticacereuse (DeVita et Chu, 2008).	33
Figure 8: Mode d'action du traitement hormonal du cancer du sein.	36
Figure 9: Mode d'action du traitement hormonal du cancer de la prostate.	36
Figure 10 : Exemples d'antimétabolites antifolates.	42
Figure 11: Exemples d'Antibiotiques anti-tumoraux.	43
Figure 12 : Les inhibiteurs de topoisomérase.	44
Figure 13 : Exemples d'inhibiteurs mitotiques utilisés en chimiothérapie.	46
Figure 14 : Mécanismes d'action des inhibiteurs des microtubules.	47
Figure 15 : Exemples d'inhibiteurs de la Tyrosine Kinase.	48
Figure 16 : Exemple d'inhibiteurs de signalisation cellulaire.	50
Figure 17 : Mécanismes de la résistance aux drogues de chimiothérapie.	53
Figure 18 : Le rituximab et ses propriétés.	60
Figure 19: Formules chimiques et structures électroniques des espèces réactives de l'oxygène (ROS).	66
Figure 20 : Structure Chimique du quercétine a et de l'isoorientine b.	67
Figure 21 : Le métabolisme du Naringine chez l'homme.	68
Figure 22: Les constituants chimiques majeurs et habituels de la propolis.	68
Figure 23 : Structure Moléculaire de l'Artemisinine.	71
Figure 24 : Image d' <i>Artemisia annua</i> , plante	72
Figure 25 : La molécule artemisinine et ses dérivés.	76
Figure 26: Alkylation de l'hème par l'artémisinine.	79
Figure 27: Les cibles de l'Artemisinine dans l'hématie et dans le parasite paludique	79
Figure 28: Bioactivation de l'artémisinine;	80
Figure 29: Analyse représentative en HPLC-ESI-MS de l'échantillon de l'extrait EAEP	88
Figure 30: Analyse représentative en HPLC-ESI-MS de l'échantillon de l'extrait EEP	89
Figure 31 : Evolution du poids corporel des souris porteuses de tumeurs traitées avec EEP et témoins.	91
Figure 32 : Pourcentage de viabilité des cellules PBMC traitées avec EEP et EAEP.	92
Figure 33: Evolution du volume tumoral chez les souris DBA2 (H2d) traitées par EEP.	93
Figure 34 : Analyse de l'induction de l'apoptose dans les cellules P815.	90
Figure 35: Effet antioxydant des extraits de propolis EEP et EAEP, évalué par la méthode au DPPH.	94
Figure 36 : Effet cytotoxique sur P815 de la combinaison de ART et des extraits de propolis EEP EAEP.	94
Figure 37 : Cinétique de la cytotoxicité in vitro de l'artémisinine sur les lignées P815 (A) et BSR (B).	104
Figure 38 : Cytotoxicité in vitro de l'artémisinine sur les lignées P815 (A) et BSR (B).	105
Figure 39 : Electrophorèse sur gel d'agarose montrant L'ADN apoptotique.	105
Figure 40 : Induction de l'apoptose par le traitement de P815 et de BSR par l'artémisinine (70µM).	106
Figure 41 : Effect de l'artémisinine sur l'évolution du volume tumoral chez les souris DBA2.	109
Figure 42: Effet de l'artémisinine contre les cellules PBMC.	109

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 1: Autophagie en réponse à la chimiothérapie pour différents types de cancers (Sui et al 2013).	21
Tableau 2 : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase et leurs cibles.	49
Tableau 3a : Anticorps monoclonaux et leurs cibles en immunothérapie anticancereuse.	55
Tableau 3b : Anticorps monoclonaux et leurs cibles en immunothérapie anticancereuse.	55
Tableau 3c : Anticorps monoclonaux et leurs cibles en immunothérapie anticancereuse.	58
Tableau 4 : Structures générales et exemples de familles de flavonoides.	68
HPLC MS pour l'extrait EAEP.	87
Tableau 6 : Molécules de flavonoides et leurs ions fragments présumés détecté en ionisation négative HPLC MS pour l'extrait EEP.	87
Tableau 7: Activité cytotoxique in vitro de l'extrait EEP et EAEP contre les lignées Hep-2, BSRet P815.	90
Tableau 8. Effets inducteurs de signaux des flavonoides. (Vidak et al., 2015).	98
Tableau 9 : Analyse de l'indice de combinaison CI, vincristine Artemisinine contre la lignée P815.	106
Tableau 10 : Analyse de l'indice de combinaison CI, vincristine 10 μ M Artemisinine (IC 30) contre la lignée BSR.	106

LISTE DES ABREVIATIONS:

ADN : acide désoxyribonucléique
ALV : virus de la leucémie aviaire
ARN : acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ART: Artémisinine
BET: Bromure d'éthidium
CIRC : Centre international de Recherche sur le Cancer
CTL : Lymphocytes T cytotoxiques
°C : Degré Celsius
CAPE, caffeic acid phenethyl ester
Con A, concanavalin A
DMEM: Dulbecco Medium Eagle's Modified
DMSO: diméthylsulfoxyde
DO: Densité optique
EDTA : acide éthylènediamine tétracétique
ENZ : enzyme
EtOH : Éthanol
EGF : facteur de croissance épidermique
Erk-2, extracellular-signal-regulated kinase
FGF : facteur de croissance fibroblastique
FCS : fetal calf serum (sérum de veau foetal)
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
G2/M : Phases G2 et M du cycle cellulaire
GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GSH: glutathion
GST: glutathion-S-transférase
Gy: Gray
GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée).
HE : Huile essentielle
HLA : human leucocyte antigen (antigènes des leucocytes humains)
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance.
IC : Combinaison Index (Indice de combinaison).
IC₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%.
IFN-γ gamma-interferon
IL, interleukin
LKB1 (Liver Kinase B1; aussi appelée Serine/Threonine Kinase 11 - STK11)
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MDR : résistance multiple aux drogues (multidrug resistance)
MeOH : Méthanol
MAP, Mitogen-Activated Protein
mn : Minute
MS : Spectrométrie de masse
MTT: Méthyl Tetrazolium Test
MTX : Méthotrexate
(m, μ) g : (milli, micro) gramme
(m, μ)L : (milli, micro) : litre

NK: Natural killer cells
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
nm : nanomètre
NSCLC : non small cells lung cancer (cancer bronchique non à petites cellules)
NO, Nitric oxide
Bfbf NOS, nitric oxide synthase
OH·, Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO).
O₂⁻, Anion superoxide
pb: paire de base
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononuclées du sang périphérique)
PBS : phosphate buffered saline
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
P-gp : glycoprotéine-P
% : Pourcentage
® : Registred (Marque enregistrée)
ROS : espèces oxygénées réactives (Reactive Oxygen Species).
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
SDS: sodium dodecyl sulfate
SVF : sérum de veau fœtal
SOD: superoxyde dismutase
TBE : Tris borate EDTA
TGF- β 1: Transforming growth factor-beta 1
TNF : facteur de nécrose des tumeurs (tumor necrosis factor)
TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor
TRIS: Tris (hydroxyméthyle) aminométhane
™ : Trad mark (marque commerciale)
uma : unité de masse atomique
UV : UltraViolet
v/v: Volume à volume
VEGF: vascular endothelial growth factor
Vin: Vincristine
WSD, water-soluble derivative

RESUME :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROPRIETES ANTITUMORALES D'EXTRAITS DE LA PROPOLIS D'ORIGINE MAROCAINE ET DE L'ARTEMISININE (Etude cellulaire et moléculaire *in vitro* et *in vivo*)

Lors de ce travail de thèse des essais cellulaires et moléculaires *in vitro* et des essais *in vivo* sur des souris du modèle DBA2/H2D ont abordé pour la première fois des aspects concernant le potentiel anti-tumoral des extraits de la propolis produite localement (Région de Beni Mellal Maroc). L'investigation des effets anti-tumoraux de l'artémisinine, originaire de la plante *Artemisia annua* a aussi été abordée. La combinaison des extraits de propolis et de l'artémisinine ont pour la première fois confirmé le mode d'action de cette molécule ainsi que l'effet antagoniste des extraits de propolis contenant des flavonoïdes et autres molécules ayant un grand potentiel cytotoxique sélectif et antioxydant, contre l'action cytotoxique de l'artémisinine essentiellement basée sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'extrait éthanolique de la propolis (EEP), ainsi que l'extrait à l'acétate d'éthyle (EAEP), exercent une activité cytotoxique *in vitro* d'une manière dose dépendante contre les cellules des lignées Hep2, P815 et BSR. EAEP induit l'apoptose dans les cellules P815 (marquage à l'annexineV). Les valeurs des IC₅₀ sont comprises entre 15 et 38 µg/mL. Cette activité ne dépend pas seulement de la composition chimique de l'extrait (analyse par HPLC/ESI-MS), mais elle dépend aussi des cellules tumorales cibles. L'effet cytotoxique de ces extraits sur les cellules PBMC a été très faible comparativement à celui induit sur les cellules tumorales. D'autre part, le traitement par voie orale des souris (DBA2/P815) portant des tumeurs avec l'extrait éthanolique de propolis (5 mg et 2,5 mg par souris tous les quatre jours, cinq fois pour deux groupes différents en répétitions avec témoins, réduit significativement le volume de la tumeur (1,2cm³ et 2,7 cm³ pour les groupes traités contre 3,5 cm³ pour les témoins). Concernant l'artémisinine (ART), l'étude s'est intéressée à la cytotoxicité différentielle de l'artémisinine sur les lignées de cellules tumorales P815 et BSR. Les valeurs des IC₅₀ sont 12 µM pour P815 et 52µM pour BSR. Ces études de cytotoxicité *in vitro* ont été complétées par l'étude de l'apoptose par électrophorèse de l'ADN apoptotique fragmenté et par le test de marquage à l'annexine V-streptavidine-FITC. L'apoptose a été induite par l'artémisinine dans P815, et non dans BSR. En outre, la synergie *in vitro* entre l'artémisinine et la vincristine a été examinée. L'administration orale de l'artémisinine a inhibé le développement des tumeurs solides chez les souris du modèle murin DBA2. Cela suggère l'existence d'interactions moléculaires différentes entre les lignées de cellules étudiées et l'artémisinine. Pour la première fois, les résultats obtenus montrent que la combinaison de l'artémisinine avec les extraits de propolis d'origine marocaine (EEP et EAEP) aboutit à l'antagonisme en ce qui concerne la cytotoxicité de l'artémisinine vis-à-vis des cellules P815. Ces résultats, confirment en même temps le mode d'action cytotoxique principal de l'ART. Cet effet antagoniste des extraits est dose dépendant en présence d'une dose fixe de l'ART (IC₃₀). En effet, cette molécule produit son effet cytotoxique par la génération de peroxydes (ROS) suite à la réaction de son noyau trioxane (enodoperoxyde) avec le fer ferreux au sein des cellules. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi produites vont tuer les cellules en oxydant les lipides membranaires et d'autres structures vitales des cellules. Ces résultats mettent en évidence et confirment de manière très intéressante le mode d'action de l'artémisinine ainsi que les interactions éventuelles entre les produits naturels et certaines drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

Mots clés : Cancer, propolis, artémisinine, ROS, Synergie, combinaison, apoptose, Flavonoïdes.

ABSTRACT:

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF ANTITUMOR PROPERTIES OF MOROCCAN PROPOLIS EXTRACTS AND ARTEMISININ (Cellular and molecular study *in vitro* and *in vivo*)

In this thesis, cellular and molecular *in vitro* assays and *in vivo* tests on DBA2 H2d mice model have addressed for the first time aspects of the anti-tumor potential of extracts of locally produced propolis (Beni Mellal Region Morocco). The investigation of the anti-tumor effects of artemisinin, from the plant *Artemisia annua* was also assayed. The combination of propolis extracts and artemisinin have for the first time confirmed the mode of action of artemisinin and the antagonistic effect of propolis extracts containing flavonoids and other molecules having a large selective cytotoxic and antioxidant potential, against the cytotoxic action of artemisinin based mainly on the production of reactive oxygen species (ROS). The ethanol extract of propolis (EEP), and ethyl acetate extract (EAEP) exerted *in vitro* cytotoxic activity in a dose dependent manner against the cell lines Hep2, P815 and BSR. EAEP induced apoptosis in P815 cell line (labeling with Annexin V). IC₅₀ values were between 15 and 38 µg/mL. This activity not only depends on the chemical composition of the extracts (analysis by HPLC / ESI-MS), but it also depends on the target tumor cells. The cytotoxic effect of these extracts on PBMC cells was very low compared to that induced on tumor cells. On the other hand, the oral treatment of mice (DBA2/P815) bearing tumors with the ethanol extract of propolis (5 mg and 2.5 mg per mouse every four days, five times for two different groups with repetitions and controls, had significantly reduced tumor volume (1,2cm³ and 2.7 cm³ for the treated groups versus 3.5 cm³ for controls). Artemisinin (ART), assays showed differential cytotoxicity against P815 and BSR tumor cell lines. The IC₅₀ values were 12 µM for P815 and 52µM for BSR. Apoptosis was investigated by electrophoresis of apoptotic fragmented DNA and by annexin V-FITC-streptavidin test. Apoptosis was induced by artemisinin in P815 but not in BSR. In addition, the *in vitro* synergy between artemisinin and vincristine was examined. *In vivo* study performed on (DBA2/H2d/P815) mice model showed tumor volume reduction by oral administration of artemisinin. For the first time, the obtained results showed that the combination of artemisinin with propolis extracts from Morocco (EEP and EAEP) resulted in antagonism with respect to cytotoxicity of artemisinin on P815 cells. These results confirm the cytotoxic mechanism of action of ART. This antagonistic effect is extract's dose dependent in the presence of a fixed dose of ART (IC₃₀). Indeed, this molecule produces its cytotoxic effect by the generation of peroxides (ROS) following the reaction of its core trioxane (endoperoxide) with ferrous iron within cells. These produced reactive oxygen species (ROS) thus kill the cells by oxidizing the membrane lipids and other vital cell structures. These results demonstrate and confirm a very interesting the mode of action of artemisinin and possible interactions between natural products and certain drugs used in cancer chemotherapy.

Keywords: Cancer, propolis, artemisinin, ROS, Synergy, combination, apoptosis, Flavonoids.

INTRODUCTION:

L'intérêt scientifique des plantes médicinales et de leurs dérivés connaît un grand essor. Les raisons de cet intérêt sont principalement : une plus grande efficacité des nouveaux médicaments d'origine végétale, un intérêt croissant pour les produits naturels, et des préoccupations croissantes au sujet des effets secondaires de la médecine et de la thérapie conventionnelles.

En effet, l'homme a depuis des milliers d'années, utilisé les plantes et d'autres produits naturels comme base des ressources thérapeutiques. Ainsi, toutes les cultures du monde ont une connaissance approfondie de leur médecine traditionnelle basée sur des croyances et des pratiques empiriques qui existaient avant le développement des sciences médicales et pharmacologiques modernes. Ces pratiques font partie des patrimoines culturels des différentes communautés humaines et sont transmises aux générations et échangées avec d'autres communautés, oralement ou sous la forme écrite.

Les pathologies que l'être humain a du affronter tout au long des ères de son existence jusqu'à nos jours, sont très variées et sont d'une gravité souvent foudroyante. Face à cette gravité, l'humain, par sa volonté, par son instinct de survie et par son génie a pu interroger son environnement de manière à révéler les secrets thérapeutiques salvateurs de la nature. De même, cet humain a pu imiter la nature, et a pu développer ce qu'il a appelé la «médecine moderne» ou la «thérapie médicamenteuse scientifique». Des études diverses ont indiqué que les médicaments d'origine végétale représentent environ 25% du marché des médicaments d'ordonnance américaine (Grifo et al., 1997). 119 produits chimiques, considérés comme des médicaments importants proviennent de 90 espèces végétales, réparties dans plusieurs pays du monde (Arvigo et Balick, 1993). Selon le National Cancer Institute des Etats Unis, il est démontré de façon convaincante que près de 69% des drogues anti-cancéreuses homologuées entre 1980 et 2002 étaient soit des produits naturels, soit des dérivés synthétisés sur la base de propriétés issues de l'étude de produits naturels (Newman and Cragg, 2003).

Les produits naturels jouent un rôle important dans les soins de santé de 20% et 80% des gens qui résident respectivement dans les pays développés et dans les pays du tiers monde. En outre, parmi 39 médicaments anticancéreux synthétiques, 13 d'entre eux étaient basés sur un pharmacophore originaire de composés naturels (Cooper, 1993);

(Newman et al., 2003). Les usages nombreux des plantes médicinales font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux.

Cette médecine ainsi que la pharmacologie, toutes les deux modernes, ne cessent de nous fasciner par leurs prodigieuses avancées. Elles affrontent, cependant des limitations face aux systèmes biologiques qui, comme la science le met de plus en plus en évidence, sont d'une grande complexité et d'une grande robustesse. Il est par conséquent évident, que ni l'imitation de la nature ni la compréhension de son fonctionnement ne sont arrivées à un niveau parfait. Il y aura donc nécessairement une persistance durable de ce duel des aller retour entre le naturel et l'imitation du naturel. Ce constat nous rappelle entre autres choses, l'importance capitale de la préservation de notre patrimoine nature.

Lors de ce travail de thèse, nous aborderons quelques aspects concernant le potentiel anti-tumoral des extraits de la propolis produite localement. Nous aborderons aussi une investigation des effets anti-tumoraux d'une molécule, l'artémisinine, extraite de la plante *Artemisia annua*. Ces études comprennent des essais cellulaires et moléculaires *in vitro* et des essais *in vivo* sur des souris du modèle DBA2/H2D.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LE CANCER

I-1- CANCEROGENESE ET PATHOLOGIE CANCEREUSE :

Le cancer est un terme générique qui est utilisé pour désigner un vaste groupe de maladies qui se manifestent par des néoplasies pouvant toucher une partie quelconque de l'organisme humain ou animal. Les autres termes utilisés sont les tumeurs ou encore les tumeurs malignes.

Un trait caractéristique des cancers est la création rapide de cellules anormales qui se développent au-delà de leurs limites habituelles, et qui peuvent alors envahir les parties adjacentes du lieu de leur formation et de se propager à d'autres organes. Ce processus de propagation à distance est appelé métastase. Les métastases sont la principale cause des décès par cancer.

La recherche sur le cancer au cours des dernières décennies a caractérisé un nombre très important d'événements cellulaires et moléculaires qui permettent la transformation maligne des cellules hébergeant des altérations oncogéniques. Ces événements comprennent: la prolifération incontrôlée; l'évasion des facteurs suppresseurs de tumeurs; l'inhibition de la mort cellulaire; la création d'un microenvironnement particulier contenant des vaisseaux sanguins, du stroma et des cellules immunitaires; et l'acquisition du potentiel invasif et métastatique (Hanahan et Weinberg 2011).

Même s'il est admis que les cellules constituant la tumeur descendent d'une seule cellule après sa transformation maligne (clone), elles contiennent au fait des sous populations hétérogènes. Ce phénomène est mis en évidence par l'expression de marqueurs différentiels et par les différences de comportement des cellules d'un supposé clone (Marusyk and Polyak, 2010).

En outre, notre connaissance des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur a été enrichie par le développement des techniques de séquençage de l'ADN. Par ces techniques, il a été possible d'identifier de nombreux gènes qui sont mutés dans différents types de cancers (Stratton, 2011). Ces informations sont essentielles dans la compréhension de la base génétique du développement du cancer et de sa progression. Pourtant, l'ordre d'acquisition de ces mutations et les cellules qui les accumulent pour permettre la formation et l'établissement du cancer restent mal compris (Blanpain 2013).

En effet, il existe une variabilité des voies empruntées par les cellules lors de leur évolution maligne. La mutation des gènes tels que Ras ou P53 peut être trouvée dans un ensemble de tumeurs histologiquement identiques ou non. D'autres parts, l'apparition des mutations des oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs peut se faire précocement ou de manière tardive lors du processus de la progression tumorale. Il en résulte que l'acquisition des capacités biologiques des cellules tumorales telles que la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse ainsi que le potentiel réplicatif illimité peuvent apparaître à des moments variables de la progression de la cancérogenèse. Ce phénomène est observable pour les tumeurs du même type et aussi pour des tumeurs de types différents. Il est aussi observé que l'expression d'un gène ou sa mutation peut induire l'acquisition d'une seule capacité maligne chez les cellules tumorales (Figure 1), comme il peut induire l'installation simultanée de plusieurs de ces capacités (Hanahan et Weinberg 2000).

La médecine, pour mettre en pratique des thérapeutiques efficaces, exige de meilleures façons de définir les maladies. Ceci est une forte raison pour l'introduction des technologies de pointe dans les procédures de diagnostics. Un diagnostic, le plus précis de la maladie, sur la base de la description de ses mécanismes moléculaires, est essentiel pour une intervention innovante correctement adaptée aux besoins de chaque patient (Mirnezami et al. 2012).

Il est désormais admis que les cellules cancéreuses présentent des défaillances au niveau des circuits de régulation moléculaire de la prolifération et de l'homéostasie. Cela étant, et sachant qu'il existe au moins une centaine de types de cancers avec des sous-types, on peut se rendre compte de la complexité du phénomène tumoral et de la difficulté de la compréhension des circuits pouvant induire ou au contraire, contrôler la prolifération (Hanahan and Weinberg 2000). Le vaste génotype des cellules tumorales

résulte en six altérations essentielles de la physiologie de ces cellules, à savoir : 1) autosuffisance en signaux et facteurs de croissance, 2) insensibilité aux inhibiteurs de croissance, 3) évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), 4) acquisition du potentiel répliatif illimité, 5) angiogenèse accrue, 6) métastase et invasion des tissus (Hanahan and Weinberg 2011).

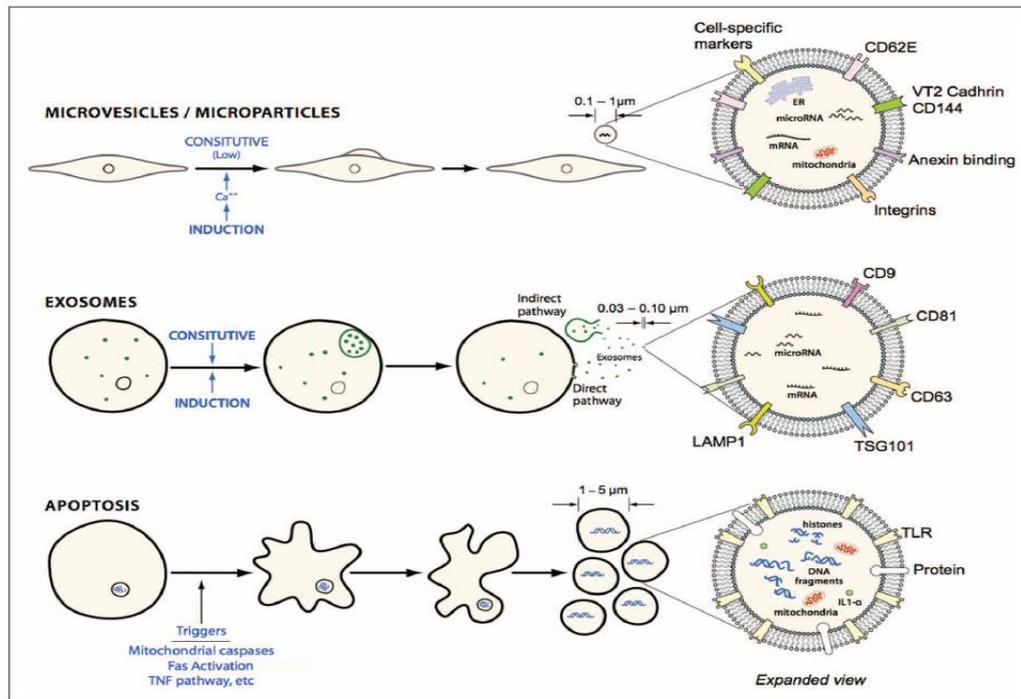


Figure 3. Schematic comparing different types of membrane vesicles: microparticles, exosomes and apoptotic bodies. Exosomes are sized in the approximate range of 30–100 nm and are thus smaller than microparticles and express surface markers such as LAMP1 and TSG101. Exosomes can either be generated from via a direct pathway from the membrane or mature in the cytosol in late endosomes and collect in multivesicular bodies (MVB) and become released via exocytosis. Apoptotic bodies are 1–5 µm in size and are released as cellular blebs as the cell undergoes apoptosis. Apoptotic bodies can be differentiated according to size and the presence of fragmented DNA.

Figure 1 : Microparticules, exosomes et corps apoptotiques, (Mause and Weber, 2010).

La prolifération de la cellule ayant subi la mutation initiale est très influencée par certains facteurs, dits de promotion. Ils confèrent à la cellule mutée la capacité d'un développement clonal aboutissant à une lésion pré-néoplasique formant une tumeur bénigne (adénome, papillome). Expérimentalement, les mieux connus de ces facteurs sont certains esters du phorbol par exemple. Le tabac est à la fois un initiateur et un promoteur. Dans les cancers du col utérin, le papilloma virus joue le rôle d'initiateur. L'irritation ou l'inflammation chronique jouent le rôle de promoteur. Dans cette étape de promotion, l'influence des facteurs de croissance cellulaire, des facteurs de régulation du cycle cellulaire et l'interaction avec d'autres mutations endogènes sont également déterminants (DeVita et al., 2008). La plus fréquente de ces mutations est celle du gène suppresseur de tumeur p53, observée dans plus de 50% des cancers humains. De

nombreuses autres mutations spécifiques ou non à une variété de tumeur, sont observées (Soussi et al., 2000). Le processus tumoral se poursuit lors de sa progression qui évolue in situ par le biais de l'angiogénèse et l'invasivité tumorale locale. Cette dernière se poursuit par l'établissement des métastases (De Vita et al., 2008).

L'évolution du processus tumoral peut être décrite en deux phases, une phase in situ puis une phase d'invasion où concourent ensemble des phénomènes (néoangiogénèse, invasivité tumorale) qui feront toute la gravité des processus tumoraux avec l'établissement possible de métastases (DeVita et al., 2008). Les facteurs angiogéniques sont sécrétés par les cellules tumorales mises en hypoxie du fait de leur croissance rapide. Les protéases et les héparinases sécrétées par les cellules tumorales et stromales participent à la dégradation des glycoaminoglycanes constituant des membranes basales permettant ainsi la libération et l'activation des facteurs de croissance angiogénique. L'environnement tumoral ou stroma interagit avec le processus tumoral par le développement de la néoangiogénèse et par le déclenchement, par le stroma, des mécanismes physiologiques de réparation tissulaire. Cette réaction stromale est caractérisée par la synthèse et l'activation de multiples protéases qui entraînent la dissolution des matrices extra- cellulaires et de la trame stromale. Cela entraîne la migration des cellules tumorales non seulement à travers le stroma mais également dans les néo-capillaires sanguins et lymphatiques péri-tumoraux (Mignatti et Rifkin, 1993).

L'établissement des métastases débute par la migration des cellules tumorales et leur pénétration dans la lumière des néo-capillaires. Ce stade est atteint après leur adhésion transitoire soit aux cellules endothéliales, soit directement aux constituants des membranes basales (laminine-fibronectine) par des liaisons mettant en jeu des récepteurs spécifiques cellulaires.

Une fois dans la circulation, la plus grande majorité des cellules tumorales qui migrent meurt suite à de multiples stress : frottement et pression mécanique, toxicité de la concentration en oxygène, agression par les acteurs de la défense immunitaire (Hanahan and Weinberg 2011). Il est à noter que les cellules cancéreuses circulantes sont accompagnées de plaquettes et de polynucléaires, ce qui entraîne des réactions inflammatoires et d'éventuelles hypoplaquetoses sévères.

Cependant, certaines cellules tumorales circulantes peuvent survivre à cet ensemble de stress. Elles peuvent aussi s'immobiliser dans des sites spécifiques et entreprendre la

colonisation tissulaire après extravasation. L'arrêt des cellules cancéreuses circulantes fait appel à une reconnaissance spécifique entre cellules tumorales et épitopes de surface des cellules endothéliales, via des molécules d'adhésion (Yang and Weinberg 2008).

Il arrive parfois qu'une tumeur qui présente tous les signes histologiques d'une tumeur maligne peut rester définitivement à un stade ne formant pas un cancer envahissant, décelable cliniquement. Les exemples les plus connus sont les cancers de la thyroïde ou de la prostate dont la découverte à l'occasion d'autopsie systématiques est très fréquente. Il s'agit de cancers dits *in situ* n'ayant aucune traduction clinique, et qui restent définitivement à ce stade. Le mécanisme sous-jacent ce phénomène est mal connu (Allred 2010).

Les protéines qui contrôlent finement la polarité des cellules épithéliales sont connues comme des protéines suppresseurs de tumeur ou proto-oncoprotéines. La perte de la polarité des cellules épithéliales, par dérégulation de ces protéines, est cruciale pour l'invasion des cellules cancéreuses et la progression du processus tumoral. L'accumulation de preuves indique que la polarité des cellules épithéliales et les divisions cellulaires polarisées contribuent causalement à limiter la formation des carcinomes (Shackelford and Shaw 2009).

Les protéines de polarité cellulaire interagissent avec les voies de signalisation qui régulent la croissance cellulaire et la prolifération, y compris WNT, les voies Hippo, et la voie-kinase B1 (LKB1) - mTOR dépendant du métabolisme énergétique (Shackelford and Shaw 2009).

Les composants de la voie Hippo sont d'importants suppresseurs de tumeurs. Des études récentes ont fourni des preuves que les régulateurs de la polarité cellulaire *lethal giant larvae* homologue (LGL, également connu sous le sigle LLGL), la protéine kinase C atypique (aPKC) et la *crumbs* homologue (CRB) et les composants des jonctions adhérents E-cadhérine- α -caténine ou E-cadhérine- β -caténine régulent la voie Hippo chez cellules épithéliales des mammifères et chez *Drosophila melanogaster* (Grzeschik et al. 2010).

La voie LKB1-AMPK-mTOR, qui est le lien moléculaire entre la polarité et l'état métabolique d'une cellule, est essentielle dans le processus de tumorigenèse (Shackelford and Shaw 2009 ; Guertin and Sabatini 2007).

Le maintien de la plupart des tissus épithéliaux adultes repose sur la présence de cellules souches polarisées, qui s'auto-renouvellent à travers des divisions cellulaires

symétriques (Belmonte and Perez-Moreno, 2012). Pendant la différenciation, les cellules souches réorientent leurs fuseaux mitotiques et se divisent de façon asymétrique afin de générer les cellules spécialisées qui assurent la fonction de l'épithélium et de son homéostasie. Les gènes qui contrôlent la polarité des cellules épithéliales régulent également l'orientation du fuseau et la symétrie de la division cellulaire dans les cellules souches (Shackelford and Shaw 2009).

Les tumeurs épithéliales sont très hétérogènes, et la cellule d'origine qui peut initier la tumorigenèse peut être sujette à des conditions génétiques et épigénétiques complexes et diverses. Deux théories de l'initiation de la tumeur ont été postulées. La première suppose que certaines tumeurs proviennent de cellules souches adultes ou progénitrices qui ont mal fonctionné, c'est la somatic mutation theory (SMT). La deuxième postule qu'elles découlent de cellules différenciées qui acquièrent des capacités d'auto-renouvellement, c'est la Tissue Organization Field Theory (TOFT). Pour certains carcinomes, il a été prouvé que des cellules souches ou progéniteurs étaient à leur origine. Cependant, cela semble peu probable et ambigu pour plusieurs autres types de cancers. (Belmonte et Perez-Moreno, 2012).

Toutes ces capacités sont acquises lors du processus de la tumorigenèse avec un échappement extraordinaire aux différents niveaux de défense anticancéreuse de l'organisme humain. Il est aussi établi que les cellules tumorales et d'autres lignées de cellules non tumorales (Figure 1), en émettant des microparticules (MP), peuvent transmettre des messages très importants et peuvent induire des processus de transformation cellulaires qui échappent totalement au contrôle exercé par le système immunitaire (Mause and Weber, 2010).

En effet, les microparticules (MP) ou ectosomes ou microsomes sont des petites vésicules fermées d'une taille de 0,2 à 2 μm de diamètre libérées à travers la membrane plasmique cellulaire. Plusieurs molécules oncogènes ont été identifiées à l'intérieur de ces microparticules, y compris les protéines solubles XIAP, la survivine, les métalloprotéinases, CX3CL1, PYK2 et d'autres protéines liées aux micro ARN. On y trouve aussi des protéines membranaires EGFR, HER-2, les intégrines, les pompes à efflux, des ARN messagers et des micro ARN (miR-21, miR-27a, , miR-451), entre autres (Penfornis 2016). Des études ont montré que ces microparticules transfèrent leur cargaison à des cellules néoplasiques ou non malignes et contribuent ainsi à l'activation des voies

oncogéniques, résultant dans la survie cellulaire, la résistance aux médicaments et la diffusion du cancer (Silva de Souza et al., 2015).

Une des manières permettant de tromper la surveillance exercée par les cellules immunitaires est la production par les cellules tumorales de microparticules portant des molécules immuno-modulatrices telles que le Fas ligand (FasL, CD95L) qui est le ligand du récepteur de la mort Fas (CD95), qui induit l'apoptose chez les lymphocytes T et diminue ainsi l'action immunitaire de ce type de cellules (Andreola et al. 2002). Il a aussi été démontré que les cellules tumorales échappent à l'apoptose en émettant des microparticules (MP) contenant des quantités substantielles de caspase3 (Al-Nedawi et al., 2008). Cette dernière, est connue pour induire l'apoptose quand elle s'accumule dans les cellules (Boing et al., 2008). Cette hypothèse est réconfortée par le fait que l'inhibition de la production des microparticules favorise l'installation de l'apoptose. En plus de cela, les lignées n'exprimant pas la caspase3, telle que MCF7 par exemple n'émettent que très rarement des microparticules (Hussein et al., 2007).

La multiplicité, la complexifié et la robustesse des systèmes de défense et de conyroles du cycle cellulaire (Figure 1) ne permettent pourtant et heureusement qu'une rare apparition des cancers au cours de la vie humaine. (Hanahan and Weinberg 2000).

I-2- LA MORT CELLULAIRE :

La mort cellulaire désigne l'arrêt du métabolisme et des fonctions vitales de la cellule aboutissant à sa destruction. Elle peut se produire soit de manière spontanée, soit sous l'effet d'agents cytotoxiques. Il est généralement admis qu'il existe deux types majeurs de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. Mais les biologistes cellulaires dans de nombreuses études distinguent d'autres formes de mort cellulaire qui peuvent être liées à ces deux formes majeures ou totalement indépendantes. Il s'agit de l'autophagie, de la mort par sénescence réplivative et de la catastrophe mitotique (Todde et al., 2009).

La nécrose cellulaire est une mort dégénérative, causée par l'action du lysosome. Les cellules, qui meurent par nécrose, sont caractérisées par l'augmentation du volume de leur cytoplasme, le gonflement de différents organites et la distorsion de la chromatine.

La membrane cellulaire se désintègre et le contenu intracellulaire est libéré. La nécrose est souvent accompagnée d'une réponse inflammatoire de l'organisme et peut entraîner des dommages au niveau des tissus (Proskuryakov et al., 2003).

Le cycle cellulaire:

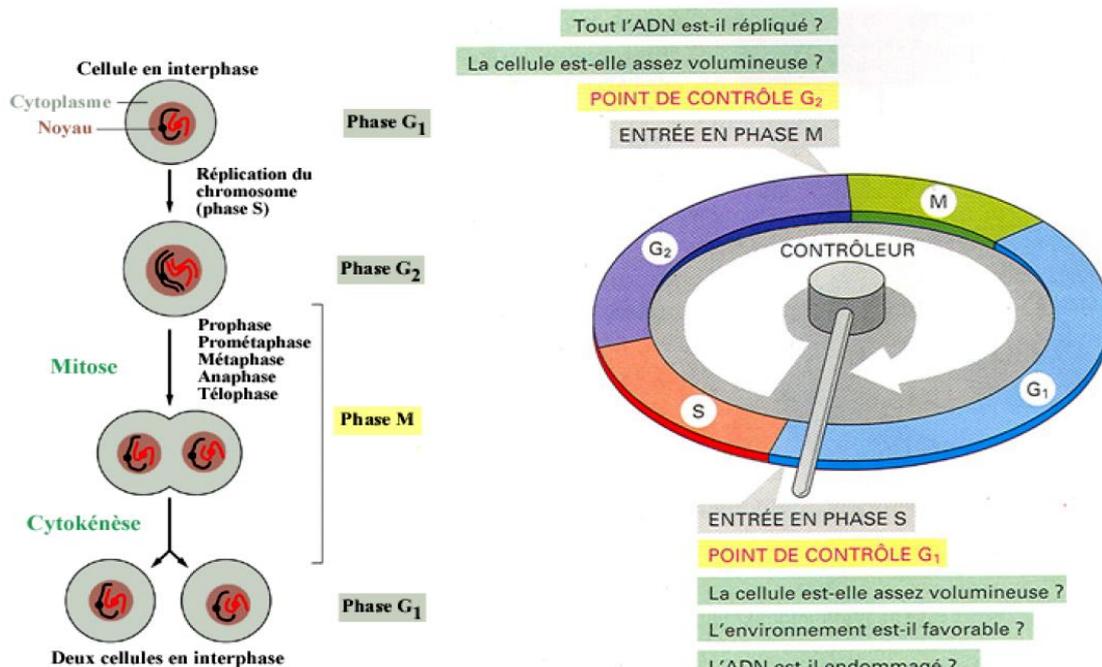


Figure 2 : Cycle cellulaire.

L'apoptose :

C'est la mort cellulaire programmée. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire et est contrôlée par un ensemble de mécanismes cellulaires spécifiques (Elmore, 2007).

Elle est considérée comme faisant partie du développement, du maintien et du renouvellement normal des tissus. Elle est définie comme une mort cellulaire programmée, impliquant le « suicide » des cellules en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble (Kaufmann et Hengartner, 2001). L'apoptose engage un grand nombre de voies de signalisation et de régulation cellulaire, impliquant un grand besoin d'énergie. Les composants de ces voies sont codés par le génome, ils sont exprimés et activés après induction de la mort cellulaire par un stimulus (Kaufmann et Hengartner, 2001).

L'apoptose est nécessaire et vitale à l'organisme aussi bien au cours de l'embryogenèse que lors de l'activation du système immunitaire. En effet, durant le développement de l'organisme, les cellules sont produites en grandes quantités et selon des critères particuliers requis, certaines d'entre elles vont mourir par apoptose. De même au niveau du système immunitaire, l'apoptose est responsable de la délétion des cellules T auto-

réactives (pour permettre la tolérance du soi), ainsi que de la sélection des lymphocytes B responsables de la réponse immunitaire (Reed et al., 1996). Son inhibition ou une apoptose défectueuse entraîne le développement de cancers et de pathologies virales alors qu'une apoptose excessive peut entraîner des désordres tels que les désordres neuro-dégénératifs (Thatte et Dahanukar, 1997).

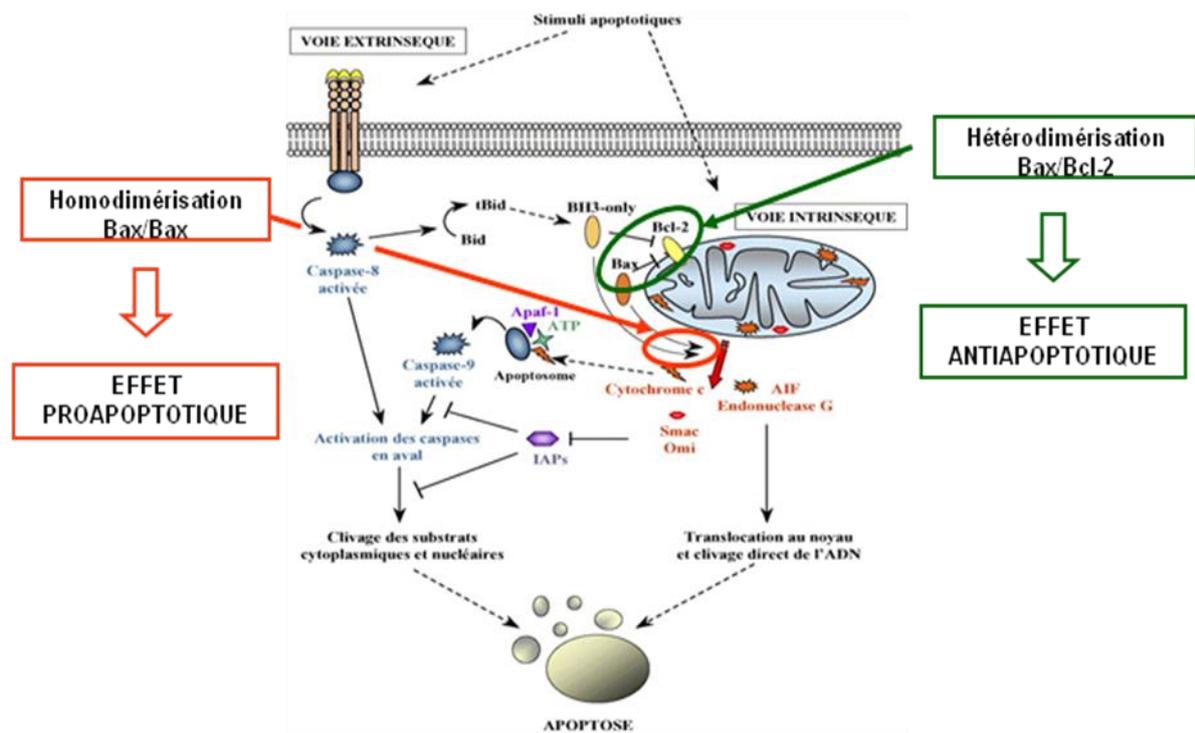


Figure 3 : Apoptose et mitochondrie

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus hautement régulé aboutissant à la destruction cellulaire de façon organisée et indépendante de tout phénomène d'inflammation. Elle survient en réponse à différents signaux extracellulaires ou non. Les principaux mécanismes induisant l'apoptose sont le stress, le traitement par des substances cytotoxiques, l'atteinte de l'ADN, la transmission d'un signal de mort via le récepteur Fas, la privation de facteurs de croissance. Tous ces signaux aboutissent à une voie commune passant par la mitochondrie, les protéines de la famille Bcl-2 et les caspases.

Cette mort cellulaire affecte des cellules isolées aboutissant à un processus de condensation et de fragmentation, sans dommages pour les cellules environnantes. Les cellules apoptotiques présentent des changements morphologiques spécifiques : exposition des phosphatidyl-sérines à l'extérieur de la membrane plasmique, compaction et marginalisation de la chromatine nucléaire, condensation du cytoplasme, dégradation de l'ADN et enfin la formation des corps apoptotiques, qui seront éliminés par phagocytose sans réaction inflammatoire (Vermeulen et al., 2005).

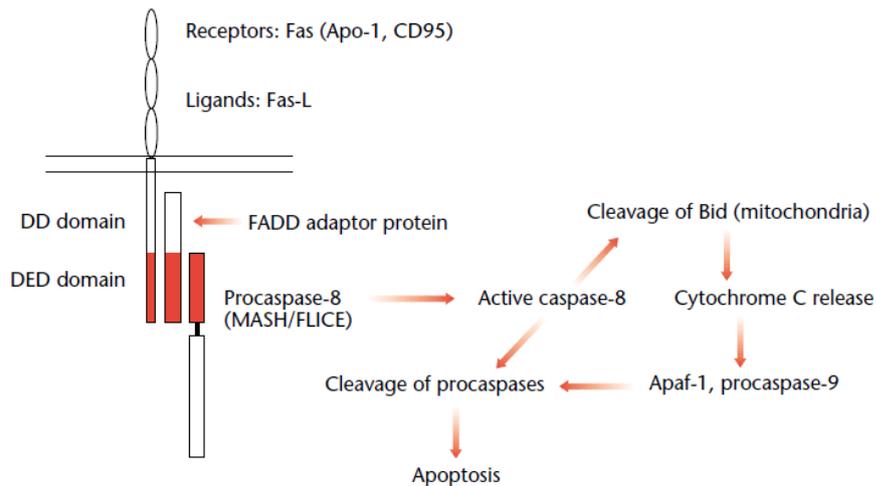


Figure 4: La voie du récepteur du Fas.

Cette voie utilise une protéine cytoplasmique dite domaine de mort, death domain (DD). La protéine DD a une séquence conservée de 80 acides aminés. Cette protéine est aussi retrouvée dans les protéines adaptateurs MORT1/FADD, TRADD et RIP. Le DD de Fas s'attache à MORT1/FADD qui interagit avec la caspase-8 (un membre de la famille protéase ICE/Ced-3, à travers DED (Death Effector Domain). Des études récentes suggèrent que la caspase 8 brise la protéine Bid appartenant à la famille Bcl2 régulant l'intégrité de la mitochondrie de manière à activer la cascade apoptotique (Wu, 2001).

Le processus apoptotique est contrôlé par deux voies principales de signalisation cellulaire : la voie extrinsèque impliquant des récepteurs des signaux de mort et la voie intrinsèque ou mitochondriale. L'apoptose induit l'activation de deux grandes familles d'enzymes : les caspases et les protéines de la famille Bcl-2. Les caspases ont un rôle important dans les processus de dégradation des organites tandis que les protéines de la famille Bcl-2 vont participer au maintien et à la régulation du signal (Mohamad et al., 2005). La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) et l'activation des caspases sont deux événements déterminants de la mort cellulaire par apoptose (Zamzami and Kroemer, 2003). MMP est induite par la prédominance des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 par rapport aux anti-apoptotiques de la même famille. Elle culmine dans la perte complète de la fonction barrière de la membrane mitochondriale (Figure 3) externe et la libération de protéines toxiques de l'espace inter-membranaire mitochondrial. Il s'agit de nucléases et de protéases qui sont indépendantes des caspases (Figure 4), et d'activateurs de caspases à savoir le cytochrome c (qui active l'apoptosome, un complexe d'activation de caspase contenant Apaf-1 et la procaspase-9), et Smac / DIABLO et Omi / HTR2 (qui bloque la famille AIP des inhibiteurs de caspases). (Zamzami and Kroemer, 2003)

L'autophagie :

C'est un mécanisme conservé le long de l'évolution des cellules eucaryotes. Elle constitue une voie majeure du catabolisme lysosomique permettant la dégradation de macromolécules et d'organites cellulaires inutiles ou superflus. Les vésicules, appelées autophagosomes vont fusionner avec les lysosomes pour former des autolysosomes, dont le contenu sera dégradé par des hydrolases lysosomales. L'autophagie joue un rôle important dans le contrôle de la longévité mais aussi dans les processus pathologiques comme le cancer ou les maladies neuro-dégénératives (Todde et al., 2009). En effet, elle intervient lorsque les cellules sont soumises à un stress nutritif et permet leur adaptation et la survie ou la mort cellulaire. Son implication dans le cancer commence à être sérieusement étudiée même si son rôle précis reste encore à définir (Kroemer et al., 2008).

La neferine est un alcaloïde bisbenzylisoquinoline isolé à partir des embryons de lotus (*Nelumbo nucifera*). Cette molécule exerce un effet antitumoral sur les cellules du cancer ovarien humain et préserve les cellules épithéliales non malignes des trompes de Fallope. Son mode d'action consiste en l'induction de l'autophagie et l'inactivation de la voie mTOR. Il a aussi été constaté que les deux voies de signalisation p38 MAPK et JNK sont activées par le traitement à la neferine et ont contribué à l'induction de l'autophagie dans les cellules du cancer ovarien (Xu et al., 2016).

Ce mécanisme intervient ainsi dans divers processus cellulaires relatifs à l'homéostasie, à la différenciation, au contrôle de la croissance, à la défense et à l'acclimatation des cellules

. Lors du processus d'autophagie, il ya formation d'auto-phagosomes délimités par une double ou multi membrane qui séquestrent du contenu cytoplasmique qui sera dégradé après la fusion avec les lysosomes (Figure 5). L'autophagie est régulée par des gènes dits relatifs à l'autophagie (autophagy-related genes (ATGs) qui à l'origine ont été découverts chez la levure. Plus d'une vingtaine de ces gènes ont été identifiés chez les cellules de mammifères (Ouyang et al. 2012). Pendant les stades précancéreux, il y a prévalence de la fonction homéostatique de l'autophagie en prévoyance de la transformation des cellules normales. Sa fonction est de parer au stress et à l'action des ROS, d'éliminer les organites endommagés et de maintenir la stabilité et l'intégrité du génome de la cellule. L'autophagie limite aussi la nécrose et l'inflammation qui sont des promoteurs de la

croissance tumorale. De plus, elle induit la sénescence pour arrêter la transformation maligne des cellules. En revanche, pendant les stades avancés du développement tumoral, l'autophagie devient le promoteur de la survie des cellules tumorales en réponse aux divers stress et facilite ainsi la résistance aux drogues anti-tumorales (Figure 5). L'autophagie joue ainsi un double rôle dans la réaction à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Sui et al. 2013).

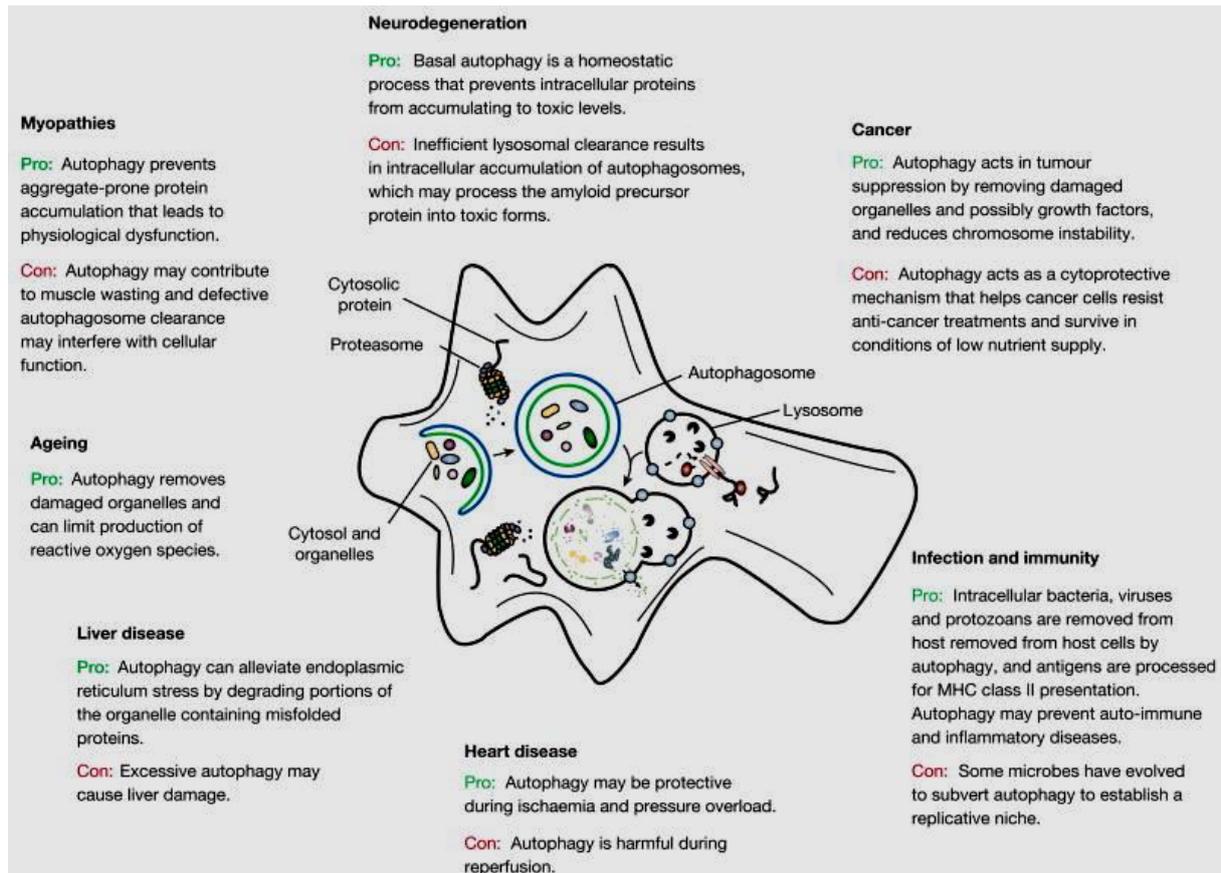


Figure 5: Le rôle de l'autophagie dans les maladies humaines (Mizushima 2008).

Degradation, in particular through autophagy and the proteasome, is important in cellular physiology. Autophagy can act as a cytoprotective mechanism to prevent various diseases, and dysfunctional autophagy leads to pathology. In some cases, however, autophagy can be deleterious; for example, some microbes subvert autophagy for replication, and the cytoprotective action can allow cancer cells to resist anti-cancer treatments.

L'analyse des réseaux de signalisation tumoraux montre que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs interviennent dans la régulation de l'autophagie. Ainsi, les gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN ou p53 généralement mutés dans les cancers humains peuvent induire l'autophagie. Mais les gènes tumoraux actifs comme PI3KI et Akt inhibent l'autophagie. On s'aperçoit alors qu'au niveau moléculaire (Figure 6), l'autophagie peut favoriser la mort ou la survie cellulaire en réponse à l'action régulatrice des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Sui et al. 2013).

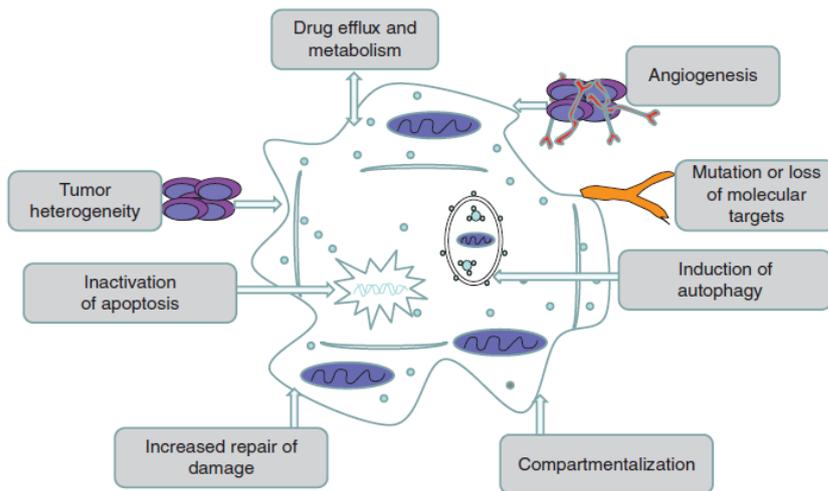


Figure 6: Résumé des voies de résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Sui et al 2013).

Il apparaît donc que l'autophagie peut être un mécanisme de survie des cellules contre le stress métabolique ou contre les thérapies systémiques. Elle peut aussi contourner le processus de mort apoptotique induit par les agents endommageant l'ADN ou par les thérapies hormonales comme le tamoxifen. La mort des cellules tumorales par autophagie comme alternative à l'inhibition de l'apoptose ou à leur résistance aux thérapies induisant l'apoptose (tableau 1). Les inducteurs et les inhibiteurs de l'autophagie sont exploitables en vue de la découverte de nouvelles thérapies anticancéreuses. Cependant, la complexité des mécanismes et des protéines et gènes intervenant dans ces processus impose des analyses de biologie systématique et une approche intégrative pour aider à la compréhension des réseaux d'interactions entre les différents constituants de ces systèmes. (Alberghina et al., 2004 ; Sui et al. 2013).

La mort par sénescence répllicative accélérée :

Elle désigne le processus physiologique cellulaire entraînant des modifications progressives non pathologiques au cours du temps. La cellule ne se divise plus suite à l'endommagement de l'ADN ou au raccourcissement des télomères (Passos et al., 2007). Il y a par conséquent activation de la voie de signalisation ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/ AT Rad3 Related) (Lansdorp, 2000). Cette voie va stabiliser la protéine p53, induisant une surexpression de la protéine p21 (cip1/waf 1) bloquant la prolifération cellulaire.

Tableau 1: Autophagie en réponse à la chimiothérapie pour différents types de cancers (Sui et al 2013).

Class	Target	Type of cancer	Autophagy role	Method used to evaluate autophagy
<i>Autophagy inducers</i>				
Aurora kinase A	mTOR	Breast	Prosurvival	siRNA (LC3, Atg5) CQ
Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	HDAC inhibitor	CML	Prosurvival	Bafilomycin A 3-MA Bafilomycin A
Epirubicin (EPI)	Anthracyclines	Breast Breast	Prodeath Prosurvival	3-MA siRNA (Beclin 1, Atg7) Bafilomycin A
5-Fluorouracil	Thymidylate synthase inhibitor	Colorectal	Prosurvival	siRNA (Atg7) 3-MA
Atorvastatin	AMPK	Digestive malignancies	Prodeath Prosurvival	3-MA siRNA (Atg5) Bafilomycin A
Irinotecan	MAPK14/p38 α	Colorectal	Prosurvival	siRNA (Atg5, Atg7) Bafilomycin A 3-MA
Cisplatin Oxaliplatin	Genotoxic stress Genotoxic stress	Esophageal Hepatocellular carcinoma	Prosurvival Prosurvival	3-MA siRNA (Atg5) CQ 3-MA
Bevacizumab	Angiogenesis inhibitor	Hepatocellular carcinoma	Prosurvival	CQ 3-MA
Sorafenib	ER stress	Hepatocellular carcinoma	Prosurvival	CQ
High-mobility group box 1 protein (HMGB1)	Genotoxic stress DAMP molecule	CML	Prodeath Prosurvival	siRNA (Beclin 1)
Gefitinib or Erlotinib	EGFR tyrosine kinase inhibitor	Lung	Prosurvival	siRNA (Atg5, Atg7) CQ 3-MA
Topotecan	Genotoxic stress	Lung	Prosurvival	CQ
RAGE	Genotoxic or metabolic stress	Pancreatic	Prosurvival	
NVP-BE235	PI3K/AKT/mTOR inhibitor	Renal Urothelial	Prosurvival Prodeath	CQ
Ursolic acid	Genotoxic stress	Prostate Cervical	Prosurvival Prodeath	siRNA (Atg5, Beclin 1) 3-MA siRNA (Atg5) Wortmannin
Imatinib	Tyrosine kinase inhibitor	Glioma	Prosurvival Prodeath	Bafilomycin A RTA 203 siRNA (Atg5, Beclin 1) 3-MA
FK-16	Fragment of LL-37	Colon	Prodeath	siRNA (Bax, Bcl-2)
Temozolomide	Genotoxic stress	Glioblastoma	Prodeath	mTOR inhibitor RAD001
Mono-Pt	Genotoxic stress	Ovarian	Prodeath	siRNA (Atg7, Beclin 1) 3-MA CQ Bafilomycin A
Cannabinoids	ER stress AMPK	Glioma Pancreatic Hepatocellular carcinoma	Prodeath Prodeath Prodeath	siRNA (Atg1) 3-MA CQ siRNA (Atg5) 3-MA
<i>Autophagy inhibitors</i>				
CQ	Lysosomotropic agent	Breast	Prosurvival	
HCQ		Esophageal Hepatocellular carcinoma	Prosurvival Prosurvival	
		Lung	Prosurvival	
		Pancreatic	Prosurvival	

ATR est une protéine kinase spécifique de la sérine/threonine qui est impliquée dans la détection des lésions de l'ADN et l'activation du contrôle des lésions de l'ADN de (damage checkpoint), (Figure 2), qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire (Sancar et al., 2004). ATR est activée en réponse à la persistante de l'ADN simple brin, qui est un intermédiaire commun formé lors de la détection de lésions de l'ADN. L'ADN simple brin apparaît dans les fourches de réplication bloquées et comme intermédiaire dans les voies de réparation par excision et recombinaison homologue des nucléotides de l'ADN. ATR agit avec une protéine partenaire appelée ATRIP en reconnaissant l'ADN simple

brinentouré de l'APR (Zou, 2003). Une fois ATR est activée, elle phosphoryle Chk1, initiant ainsi une cascade de transduction du signal qui aboutit à un arrêt du cycle cellulaire. En plus de son rôle dans l'activation du point de contrôle des dommages de l'ADN, ATR est supposée fonctionner dans la réplication normale de l'ADN (Brown et Baltimore, 2003).

La sénescence répllicative accélérée est dépendante des protéines p53 et p21, puisque leur inactivation inhibe fortement ce mécanisme et va privilégier l'apoptose. Une large proportion de molécules anticancéreuses est capable d'induire ce phénomène. Des données cliniques à ce sujet commencent à être de plus en plus décrites (Xue et al., 2007).

La catastrophe mitotique :

C'est un processus encore peu connu. Suite à un stress chimique ou physique, la cellule va entrer précocement et de manière inappropriée en mitose. Il s'agit donc d'une forme aberrante de mitose avec des changements morphologiques spécifiques mais biochimiquement variables (Vakifahmetoglu et al., 2008). Les cellules cancéreuses présentant des anomalies de régulation de l'apoptose et/ou des points de contrôle du cycle cellulaire (Figure 2), peuvent déclencher la catastrophe mitotique. Son origine peut être aussi bien des problèmes de réparation de l'ADN, qu'une dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire ou encore une déficience de la protéine p53 (Vakifahmetoglu et al., 2008). Les voies de la sénescence et de la catastrophe mitotique peuvent être interconnectées (Roninson et al., 2001). Selon le type cellulaire et le contexte génétique, les cellules en catastrophe mitotique peuvent mourir par apoptose dépendante des caspases ou par nécrose indépendamment des caspases.

I-3- VIRUS ET CANCER :

Près de 18 % des cancers humains seraient associés à des infections virales impliquant notamment les virus des hépatites chroniques (VHC, VHB), les papillomavirus à haut risque de malignité, les herpesvirus (EBV, HHV8), HTLV-I et plus récemment le polyomavirus associé au carcinome de Merkel. Les liens de causalité reposent sur l'analyse de données épidémiologiques, l'utilisation de modèles animaux, l'investigation biologique des tumeurs et l'analyse du pouvoir immortalisant et transformant de ces virus.

Plusieurs virus modèles ont contribué à définir les bases génétiques du cancer, qu'il soit d'origine virale ou non. (Maréchal et Quignon2013)

Le virus de la leucémie aviaire ou ALV est découvert par Vilhelm Ellerman et Olaf Bang, deux biologistes de l'université de Copenhague, en 1908. L'ALV est identifié comme un virus capable de transmettre une forme de leucémie aviaire chez les poulets.

Mais cette découverte resta dans l'ombre, du fait que les leucémies à cette époque là ne sont pas considérées comme des cancers. Suite aux travaux réalisés à la même époque, Francis Peyton Rous, en 1911 décrit aux États-Unis une forme de sarcome aviaire, une tumeur bien connue, et démontre son association avec un autre virus (virus du sarcome de Rous ou RSV). D'autres éléments expérimentaux, comme la fréquence élevée des tumeurs induites par le RSV chez les poulets et leur délai d'apparition court, popularisent un modèle d'oncogenèse virale qui vaudra à son auteur le prix Nobel de physiologie en 1966 pour avoir découvert le premier virus oncogène. Cependant, des limites technologiques (absence de culture cellulaire, d'outils d'analyse des virus et de leur impact sur les cellules, méconnaissance de la nature des virus et de leur cycle intracellulaire) ne permettront pas d'analyser les mécanismes d'apparition des cancers associés aux virus ALV et RSV avant les années 60-70 du vingtième siècle. À cette époque, le cancer apparaît pour la première fois comme une question médicale d'intérêt majeur, et les pays occidentaux – États-Unis en tête – réunissent des moyens financiers et humains considérables pour traiter deux questions centrales : quelles sont les modifications qui distinguent une cellule tumorale d'une cellule normale? Quels sont les mécanismes (métaboliques, biochimiques, génétiques) sous-jacents ? (Maréchal et Quignon2013).

Dans ce contexte, les virus oncogènes, et notamment les virus ALV et le RSV découverts au début du vingtième siècle, vont être rapidement (ré)-identifiés comme des modèles d'études privilégiés. Ces deux virus, très proches, appartiennent à une famille particulière de virus à ARN (les Retroviridae) capables de convertir leur génome en ADN et de s'intégrer dans les chromosomes de la cellule infectée. Cette découverte vaudra à David Baltimore, Renato Dulbecco et Howard Temin le prix Nobel de physiologie/médecine en 1975.

De nombreux travaux vont ensuite s'attacher à comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels le RSV induit des tumeurs. Ces dernières sont polyclonales et

apparaissent avec une fréquence élevée et après des durées d'incubation courtes. Le RSV est également capable de transformer des cellules en culture avec une très grande efficacité. Dès 1970, il est démontré que le pouvoir oncogène du RSV est lié à la présence d'une séquence spécifique (v-src pour viral-sarc) dans le génome viral : il s'agit d'une découverte fondamentale qui établit pour la première fois que le cancer est associé à des gènes spécifiques, désormais appelés oncogènes (Maréchal et Quignon, 2013).

Dans le prolongement de ces premiers résultats, J. Michael Bishop et Harold Varmus (prix Nobel de physiologie/médecine en 1989) seront les premiers à suggérer que l'oncogène viral v-src est en fait issu d'un gène cellulaire (c-src) normal qui aurait été capturé et activé par mutation lors du cycle de réplication du RSV. Les travaux conduits sur les tumeurs humaines confirment effectivement qu'à l'instar du RSV, certains cancers sont associés à des mutations du gène cellulaire c-src. Ces observations ont une portée considérable : elles contribuent d'une part à démontrer que le cancer a une origine génétique et d'autre part que des mutations discrètes affectant certains gènes cellulaires sont associées à l'apparition de cancers chez l'homme (Maréchal et Quignon 2013). Dans leur version normale, ces gènes sont qualifiés de proto-oncogènes. Après mutation, ils participent directement à la mise en place du phénotype cancéreux. Les travaux menés en parallèle sur le virus ALV ne confirment pas les observations faites sur RSV, suggérant que d'autres mécanismes d'oncogenèse sont en action. Le virus ALV ne contient pas d'oncogène. Il est incapable de transformer les cellules en culture, et les cancers qui apparaissent chez les poulets surviennent avec une fréquence faible et une durée d'incubation longue. Enfin les tumeurs obtenues sont monoclonales. Ces données et d'autres encore suggèrent que l'infection virale est nécessaire mais qu'un événement supplémentaire, rare, est requis pour que les tumeurs apparaissent. L'analyse génétique des tumeurs démontre que le pouvoir oncogène d'ALV résulte d'un processus de mutagenèse par insertion : l'ALV étant un rétrovirus, il réalise son cycle de multiplication en s'intégrant de façon aléatoire dans le génome des cellules qu'il infecte. Dans de rares cas (ceux qui sont à l'origine des leucémies) l'intégration du provirus s'effectue au voisinage du proto-oncogène c-myc. Cette intégration place l'expression de c-myc sous le contrôle d'un régulateur viral fort qui induit son expression à très haut niveau. On sait aujourd'hui que le proto-oncogène c-myc favorise

la survie des lymphocytes B, et que sa surexpression (induite par insertion rétrovirale, ou par translocation dans le lymphome de Burkitt notamment) est un événement prédisposant à l'apparition des tumeurs lymphocytaires. (Maréchal et Quignon 2013)

I-4- ETAT DE L'EPIDEMIE CANCEREUSE AU MAROC ET DANS LE MONDE :

Au Maroc on enregistre annuellement plus de 30 000 nouveaux cas de cancer. Les cancers du poumon sont les plus fréquents chez les hommes. Ils sont suivis de ceux de la prostate, du colon, du rectum, du lymphome non hodgkinien, de l'œsophage puis de la vessie, (Jemal et al., 2011). Chez les femmes, les cancers du sein arrivent largement en tête avec plus de 5 300 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Ils sont suivis de ceux du col utérin, du colon et du rectum, de la thyroïde et de l'ovaire (Ferlay et al., 2008).

Au niveau mondial, les néoplasies les plus fréquentes chez les hommes sont en tout premier lieu les cancers du poumon, dont l'incidence dépasse le million de nouveaux cas par an, suivis rapidement de ceux de la prostate, du colon et du rectum, de l'estomac, du foie, de l'œsophage puis de la vessie, dont les incidences cumulées sont supérieures à trois millions de nouveaux cas par an (Ferlay et al., 2010). Chez les femmes, les cancers du sein arrivent largement en tête avec plus d'un million de nouveaux cas diagnostiqués chaque année, suivis de ceux du col utérin, du colon et du rectum, du poumon et de l'estomac, dont les incidences sont supérieures à un million neuf cent mille nouveaux cas par an (Jemal et al., 2011) .

Les estimations pour l'année 2012 affichent l'effectif de 14 millions de nouveaux cas de cancer dans le monde. Les décès liés à cette pathologie sont estimés à 8,2 millions (Ferlay, 2013).

Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (avec 1,8 million de cas, soit 13,0 % du total), du sein (1,7 million de cas, ou 11,9% du total) et le cancer colorectal (1,4 million de cas, ou 9,7% du total).

Les causes les plus fréquentes de décès par cancer étaient les cancers du poumon (1,6 million de décès, 19,4% du total), du foie (0,8 million de décès, 9,1% du total) et de l'estomac (0,7 million de décès, ou 8,8% du total) (Ferlay et al., 2013).

Le cancer du sein est aussi l'une des principales causes de décès par cancer dans les pays les moins développés. Il est en nette augmentation dans les pays du Maghreb, du sud de l'Afrique, en Chine ou encore dans les pays d'Amérique latine (Sasco, 2008). L'American

Cancer Society a estimé qu'aux Etats Unis 1,6 millions de nouveaux cas de cancers sont attendus en 2015 (amer cancer soc 2015).

L'évolution des modes de vie et le régime d'alimentation dans ces pays sont à l'origine de cette augmentation. On note aussi que ces données reflètent que les progrès cliniques enregistrés dans la lutte contre la maladie ne profitent pas aux populations vivant dans les régions les moins développées du globe. En effet, selon l'OMS, dans certains pays d'Asie et d'Afrique 80% de la population dépend de la médecine traditionnelle pour ses premiers soins de santé (WHO, 2010).

Géographiquement parlant, les mortalités sont les plus fortes dans les pays les moins avancés. Les populations de ces pays subissent la moitié des mortalités totales par le cancer (Ferlay et al. 2010). Les taux les plus élevés d'incidence du cancer sont ceux de l'Amérique du nord, de l'Australie et de l'Europe (Ferlay et al. 2010). En accord avec la considération que le cancer est une maladie liée au «développement» la même répartition peut être attribuée à la plupart des cancers comme les cancers du poumon ou du côlon, et surtout aux cancers hormono-dépendants (sein, endomètre, ovaire, prostate, testicule).

A l'opposé, la répartition géographique des cancers liés à des agents biologiques tels que les virus (virus du papillome humain et cancer du col utérin, virus des hépatites B et C et cancer du foie, virus d'Epstein-Barr et cancer du nasopharynx ou lymphome de Burkitt), les bactéries (*helicobacter pylori* et cancer de l'estomac) ou les parasites (schistosomia et cancer de la vessie), montre des taux très élevés dans les pays du Sud, et en particulier en Afrique et en Asie. Les habitudes hygiéniques, le niveau de vie ainsi que le bas niveau du système de santé de ces pays est clairement reflété par l'incidence de ces types de cancer dans ces pays (Sasco, 2008).

I-5- TRAITEMENTS ANTICANCEREUX

I-5-1- TRAITEMENTS CONVENTIONNELS

Il est évident comme il a été signalé plus haut que le bon diagnostic, le plus précoce possible conditionne la réussite de toute thérapie anticancéreuse.

Le but des traitements est de détruire les cellules malignes et/ou de bloquer leur prolifération. Le traitement des cancers est multidisciplinaire : chirurgie, radiothérapie,

hormonothérapie et immunothérapie. Le choix d'un plan de traitement repose sur une concertation pluridisciplinaire impliquant diverses spécialités chirurgicales et médicales: anatomo-pathologie, radiologie, chirurgie, oncologie médicale, radiothérapie, bien être et psychologie des patients cancéreux.

Les diverses modalités thérapeutiques peuvent être utilisées seules ou en combinaison avec d'autres thérapies. Le choix d'une stratégie thérapeutique repose sur divers facteurs: la taille de la tumeur, sa localisation son type histologique, et son grade...

A- LA CHIRURGIE

Cette technique consiste à intervenir directement au niveau de la tumeur. C'est le plus souvent le traitement radical à condition que la tumeur n'ait pas essaimé dans d'autres régions du corps. Mais il faut bien reconnaître que, pour que cette technique soit la plus efficace, il faudrait lui conjuguer d'autres traitements et s'aider de médicaments ou de rayons qui iront détruire les cellules cancéreuses là où elles se trouvent (Lacave et al., 2005). L'exemple le plus fréquent est le traitement par chimiothérapie dans le cadre d'une tumeur du sein de grande taille ; la réalisation d'une chimiothérapie avant l'intervention chirurgicale (on parle de chimiothérapie néo-adjuvante) peut permettre d'éviter une ablation complète du sein grâce à une réduction du volume tumoral.

B- LA RADIOTHERAPIE

La radiothérapie est née il y a plus d'un siècle avec la découverte de la radioactivité. Elle est avec la chirurgie une des méthodes de traitement les plus anciennes et les plus utilisées dans la lutte contre le cancer. Elle est basée sur l'utilisation des radiations ionisantes pour détruire les cellules cancéreuses. La mort cellulaire peut emprunter la voie du mécanisme apoptotique qui induit la mort cellulaire quelques heures après l'irradiation. Une deuxième voie de la mort cellulaire consiste à compromettre le déroulement des phases de la mitose et par conséquent l'inhibition de la prolifération, ce qui induit ultimement la mort de la cellule. Il est généralement admis que la principale cible de l'irradiation est l'ADN. Certaines études ont cependant montré que le signal induisant l'apoptose peut résulter de l'action des radiations ionisantes entraînant la peroxydation des lipides membranaires (Lamson et Brignall, 1999).

La radiothérapie peut être pratiquée selon trois techniques.

La télé-radiothérapie ou radiothérapie transcutanée ou encore radiothérapie externe qui utilise des faisceaux de radiations pénétrant les tissus à travers la peau.

La curiethérapie, qui consiste à implanter des sources radioactives scellées dans la tumeur.

La radiothérapie métabolique, qui utilise des radioéléments administrés sous forme liquide.

Les radiations les plus utilisées en radiothérapie externe sont les rayonnements électromagnétiques de haute énergie ou photons.

❖ LES RADIATIONS IONISANTES UTILISEES EN THERAPEUTIQUE

Plusieurs types de radiations ionisantes peuvent être employés :

- LES RADIATIONS IONISANTES NON CHARGÉES :

Electromagnétiques :

- Les photons X provenant du réarrangement des électrons du cortège électronique : tubes à Rayons X, accélérateurs.

- Les photons gamma d'origine nucléaire, émis lors de désintégration nucléaire. Les sources les plus utilisées sont : Cobalt60, Ir192, Cs137, ...

Les radiations ionisantes non chargées :

Particulaires : neutrons

Ces particules sont produites de façon artificielle par les cyclotrons, leur parcours est rectiligne dans la matière. Ils agissent en arrachant les protons des milieux traversés. A doses égales, leur efficacité biologique est trois fois plus élevée que celle des radiations électromagnétiques.

- LES RADIATIONS IONISANTES CHARGÉES :

Rayonnement β : Il est émis par certains noyaux radioactifs. Il est constitué d'électrons, qui agissent en mettant en mouvement les électrons des milieux traversés, par répulsion électrostatique. Leur parcours est plus ou moins sinueux, dépendant de leur énergie initiale. Leur efficacité biologique est très voisine de celle des rayons X et γ .

Electrons accélérés :

Produits par les accélérateurs, ils possèdent les mêmes caractéristiques physiques que les électrons du rayonnement β^- . Leur énergie est choisie selon la profondeur à laquelle

se trouve la lésion à traiter, ce qui offre un grand avantage sur le plan dosimétrique, permettant d'épargner les tissus profonds.

Rayonnement α :

Il est constitué de particules lourdes, chargées positivement, qui sont des noyaux d'Hélium. Ces particules sont émises spontanément par des noyaux instables et agissent dans les milieux qu'elles traversent en mettant en mouvement des électrons et des protons. Leur parcours est très faible, de l'ordre de quelques millimètres dans l'eau. Leur efficacité biologique est de l'ordre de 5 à 10 fois celle des rayons X et des photons γ , mais leur pénétration faible ne permet pas de les utiliser en clinique (DeVita et al., 2008 ; Kavanagh et al., 2006).

Protons :

Produits par les cyclotrons, ils vont agir en cédant leur énergie au cours des collisions avec les électrons des tissus traversés. La distribution de dose en profondeur se fait sous la forme d'un pic très étroit (pic de Bragg), adapté au traitement de tumeurs profondes, de petite taille, au voisinage de tissus sains radiosensibles. Les indications principales en sont les mélanomes choroïdiens et les tumeurs de la base du crâne et du canal rachidien, le chordome et le chondrosarcome. L'efficacité biologique des protons serait proche de celle des neutrons (Kavanagh et al., 2006).

Ions légers :

Produits également par les synchrotrons, ces ions légers permettraient une pénétration comme les protons et une efficacité biologique comme les neutrons. Ils constituent une voie de recherche très intéressante (Schulz-Ertner et al., 2006).

❖ LES SOURCES DE RADIATION

Curiethérapie :

Les matières radioactives employées en curiethérapie sont entre autres les suivantes : le césium, l'or, l'iode, l'iridium, le palladium, le cobalt et ruthénium.

Radiothérapie systémique :

Les radio-isotopes employés en radiothérapie systémique sont entre autres l'iode, le strontium et le phosphore.

❖ MODES D'ADMINISTRATION

Scalpel gamma

C'est un appareil qui dirige avec précision environ 200 faisceaux de rayons gamma, habituellement le cobalt, vers la tumeur. Les rayons sont émis vers le point où les faisceaux se croisent. En général, on administre une seule séance à forte dose. Cette technique porte parfois le nom de chirurgie au scalpel gamma (Olsen et al., 2007).

Accélérateur linéaire (LINAC) :

Le LINAC est un appareil qui émet des radiations sous forme de nombreux faisceaux de rayons X qui suivent un arc. Le traitement peut être administré en plusieurs séances. Chaque séance peut durer 30 minutes ou plus (Connell and Hellman, 2009).

CyberKnife (cyberbistouri)

Le Cyberknife est un type perfectionné d'accélérateur linéaire. Un système robotique dirige l'accélérateur dans diverses positions. On a recours à plusieurs caméras à rayons X, ou dispositifs d'imagerie, et ordinateurs pour connaître la position de la tumeur à traiter. Le système robotique peut s'ajuster en repositionnant l'accélérateur linéaire par rapport à la tumeur avant que le faisceau de radiations ne soit émis. Ce type de traitement peut être administré sur une période de quelques jours.

L'emploi du CyberKnife est utilisé pour les tumeurs du cerveau et pour celles situées dans d'autres parties du corps, comme la colonne vertébrale et les poumons. Il semble que ce soient les petites tumeurs locales qui bénéficient le plus de ce type de traitement (Brada et al., 2007).

Administration de la radiothérapie externe

Les accélérateurs linéaires (LINAC) et les appareils au cobalt-60 permettent d'administrer la radiothérapie externe. Divers modèles d'accélérateurs linéaires produisent différentes quantités d'énergie, ou voltage. Le type d'appareil employé dépend de l'emplacement, de la profondeur, du type et de l'étendue de la tumeur devant être traitée (Lam et al., 2007).

Les appareils d'orthovoltage émettent des faisceaux de basse énergie qui ne pénètrent pas très en profondeur dans la peau. On les utilise pour traiter les tumeurs superficielles, comme les cancers de la peau (Brada et al., 2007).

Les appareils de mégavoltage émettent des faisceaux de haute énergie qui pénètrent plus en profondeur dans le corps. On les utilise pour traiter les tumeurs internes profondes.

Il existe d'autres types de radiothérapie externe dont ceux-ci :

Radiothérapie conformationnelle

Il existe 2 types principaux de radiothérapie conformationnelle :

la radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle (RC 3D)

- En RC 3D, les faisceaux de radiations modelés provenant de différentes directions sont dirigés vers la tumeur.

- Les faisceaux ont tous la même intensité.

la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI)

- La RCMI requiert un équipement spécialisé et permet d'administrer la radiation de façon ciblée.

- L'intensité des faisceaux varie dans la zone de traitement. La tumeur reçoit la radiation en provenance d'une série de petits faisceaux d'intensités différentes.

- On a recours à un collimateur multilames pour modeler et émettre ces petits faisceaux. Les barres du collimateur multilames se déplacent quand on administre la radiation. On emploie la technique à feux croisés (faisceaux émis d'au moins 2 directions différentes au même moment), ce qui permet d'administrer une dose constante tout en épargnant les tissus voisins (Lam et al., 2007).

- La RCMI sculpte les faisceaux de façon très précise et permet à la dose de radiation d'être ajustée selon les différentes parties de la zone de traitement.

Toutes ces particules provoquent des ionisations, essentiellement en arrachant des électrons aux atomes et aux molécules qu'elles traversent. Il n'existe pas (ou peu) de spécificités biologiques de l'effet des radiations ionisantes, en particulier entre cellules saines et cellules cancéreuses. Les cellules saines ont une aptitude à se réparer que n'ont pas les cellules cancéreuses.

Les doses sont exprimées en grays (Gy) : 1 Gy = 1 joule absorbé dans une masse de 1 kg.

❖ MECANISMES D'ACTION SUR LES CELLULES

- Action directe : les cellules subissent instantanément des altérations atomiques et moléculaires engendrées par le passage des rayonnements ionisants.

- Action indirecte : des réactions chimiques (lyse des molécules d'eau) aboutissent à la création de radicaux libres, qui vont ensuite interagir avec les autres molécules. L'action sur les cellules est alors indirecte, via les radicaux libres. La majorité des lésions surviendraient via ces mécanismes. La cible principale est l'ADN chromosomique des cellules (DeVita et al., 2008).

Au niveau de l'ADN, l'irradiation peut entraîner des ruptures simple-brin ou double-brin. Les ruptures simple-brin sont souvent sub-létales, mais leur accumulation peut dépasser les capacités de réparation cellulaire. Les ruptures double-brin sont peu réparables et représentent le mécanisme dominant de la mort cellulaire radio-induite. Il est à noter que ces lésions sont identiques que les cellules soient ou non cancéreuses : ce sont les capacités de réparation plus importantes des cellules normales qui sont à l'origine de l'effet différentiel (Schulz-Ertner et al., 2006).

Types de lésions créées au sein de la double hélice de l'ADN

- Lésions des bases et des sucres.
- Pontages inter ou intra brins.
- Rupture de l'un des « montants » de l'échelle d'ADN = cassure ou lésion simple brin.
- Rupture des deux montants = cassure ou lésion double brin. Ce sont les lésions les plus complexes à réparer pour la cellule (DeVita et al., 2008).

Facteurs influençant les effets des radiations ionisantes :

Le rapport efficacité/toxicité de la radiothérapie peut être impacté par un certain nombre de facteurs, dont l'oncologue radiothérapeute tient compte pour optimiser la prise en charge de chacun des patients traités par irradiation.

- La radiosensibilité intrinsèque : elle varie selon la nature des tissus et organes sains ou tumoraux. Une dose seuil est calculée en fonction de l'organe ou du tissu concerné et du volume irradié, au dessus de laquelle des lésions surviennent, celles-ci s'aggravant ensuite avec la dose (tolérance des principaux organes à risques et des tissus sains).
- Le cycle cellulaire : les cellules sont plus radiosensibles en phases G2 et M de leur cycle (Olsen et al., 2007).
- L'effet oxygène : l'oxygène joue un rôle clé dans la survenue de lésions indirectes, grâce à une action conjointe avec les radicaux libres. Des cellules peu alimentées en oxygène

(hypoxie) sont donc moins sensibles aux rayonnements ionisants. Des études sont en cours pour pallier cette situation (DeVita et al., 2008).

- Le facteur temps: l'étalement du traitement et le fractionnement de la dose sont deux notions clés. Un temps court de traitement et des doses importantes d'irradiation sont des facteurs de complications aiguës et tardives pour les tissus sains. Un étalement trop important du traitement et une dose trop faible délivrée par séance profiteraient aux tumeurs à prolifération rapide.

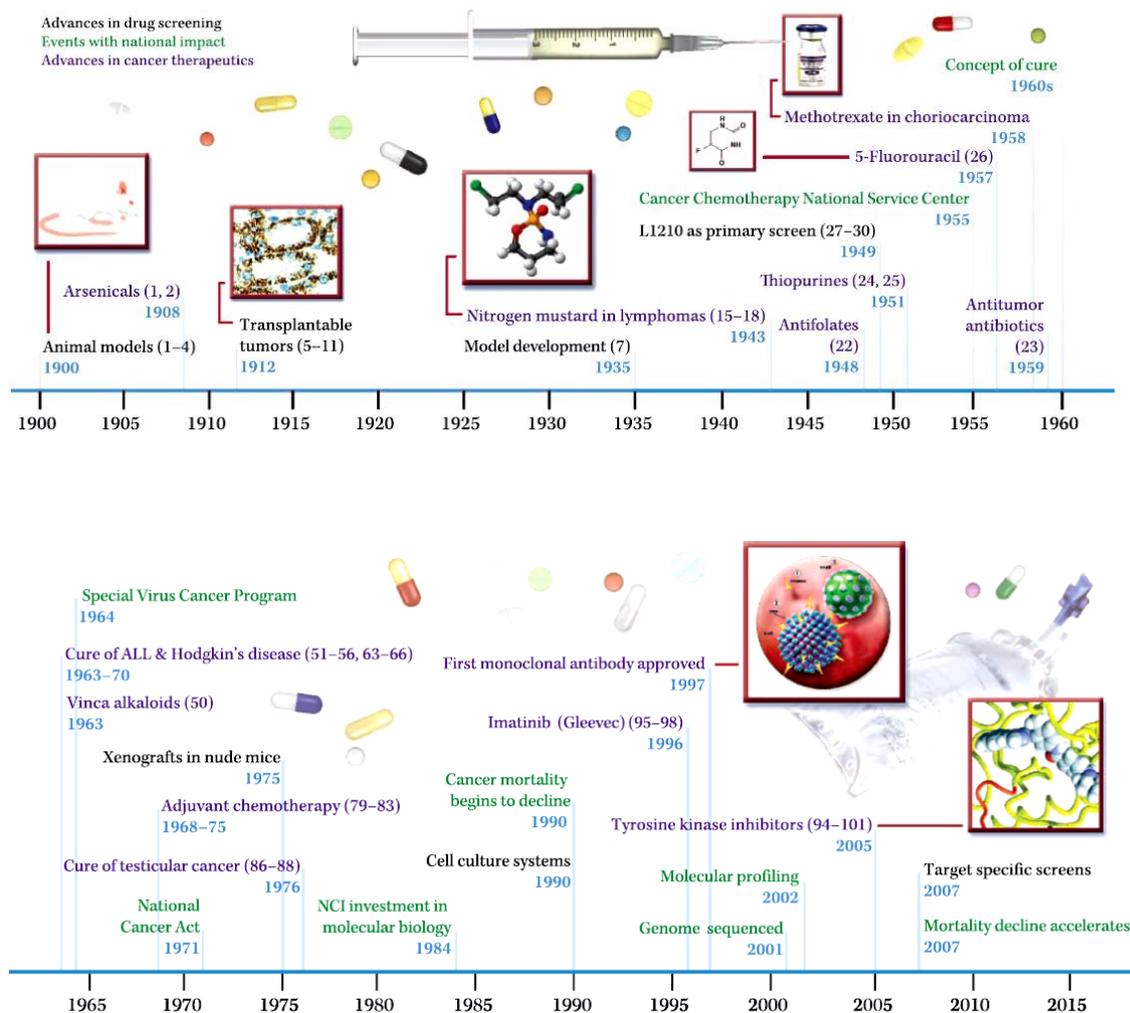


Figure 7 : Historique de la chimiothérapie anticancéreuse (DeVita et Chu, 2008).

Quels sont les effets secondaires possibles de la radiothérapie?

La radiothérapie peut provoquer effets secondaires à la fois précoces (aiguë) et tardifs (chroniques). Les effets secondaires précoces surviennent pendant ou immédiatement après le traitement. Les effets secondaires chroniques se produisent des mois ou même des années après la fin du traitement (Olsen et al., 2007).

Ces effets dépendent de la région du corps traitée, de la dose administrée journalière et totale, de l'état de santé général du patient, et des traitements simultanés à la radiothérapie. La variété des problèmes encourus va de l'irritation cutanée, aux problèmes urinaires en passant par les dommages aux glandes salivaires, la fatigue générale, les nausées et l'épilation (DeVita et al., 2008).

L'utilisation de certains radioprotecteurs aide à palier à ce genre de problèmes. La plupart des effets aigus disparaissent après la fin du traitement, bien que certains (comme les dommages de la glande salivaire) peuvent être permanents (Schulz-Ertner et al., 2006).

En fonction de la zone du corps à traiter, les effets secondaires tardifs peuvent inclure de la Fibrose, des dommages aux intestins, la perte de mémoire, l'infertilité ou plus rarement des cancers secondaires qui se développent après une radiothérapie dépendent de la partie du corps qui a été traitée. Certains médicaments de chimiothérapie, les facteurs de risque génétiques et les facteurs liés au mode de vie (comme le tabagisme) peuvent également augmenter le risque d'effets secondaires tardifs. Il s'agit de peser soigneusement les risques des traitements contre les avantages potentiels pour chaque patient (DeVita et al., 2008).

C- L'HORMONOTHERAPIE

Les hormones, sont des substances chimiques produites par les glandes et secrétées dans la circulation sanguine. Elles provoquent des effets dans certains tissus bien ciblés de l'organisme. L'utilisation d'un traitement hormonal pour lutter contre le cancer est basée sur l'observation que les récepteurs spécifiques des hormones se trouvent sur la surface de certaines cellules tumorales (Lawrence et al., 2008).

En effet, certains cancers sont hormono-dépendants. C'est le cas du cancer du sein dépendant des œstrogènes et celui de la prostate qui est dépendant des androgènes. La modification de l'environnement hormonal chez les patients porteurs de tumeurs dépendantes des hormones est à la base de l'hormonothérapie. De la même façon que la chimiothérapie, l'hormonothérapie peut être utilisée avec une visée curative (le plus souvent en phase adjuvante) ou avec une visée palliative (chez les patients métastatiques) (Rove, 2013).

L'hormonothérapie peut être mise en œuvre en adoptant différentes stratégies :

- En arrêtant la production d'une certaine hormone,

- En bloquant des récepteurs d'hormones,
- En remplaçant l'hormone par des agents chimiques semblables à l'hormone active qui ne peut pas être utilisée par la cellule tumorale.

Les différents types de thérapie hormonale sont classés selon leur fonction et/ou le type d'hormone qui est considérée (Untch and Thomssen, 2010). On peut ainsi distinguer :

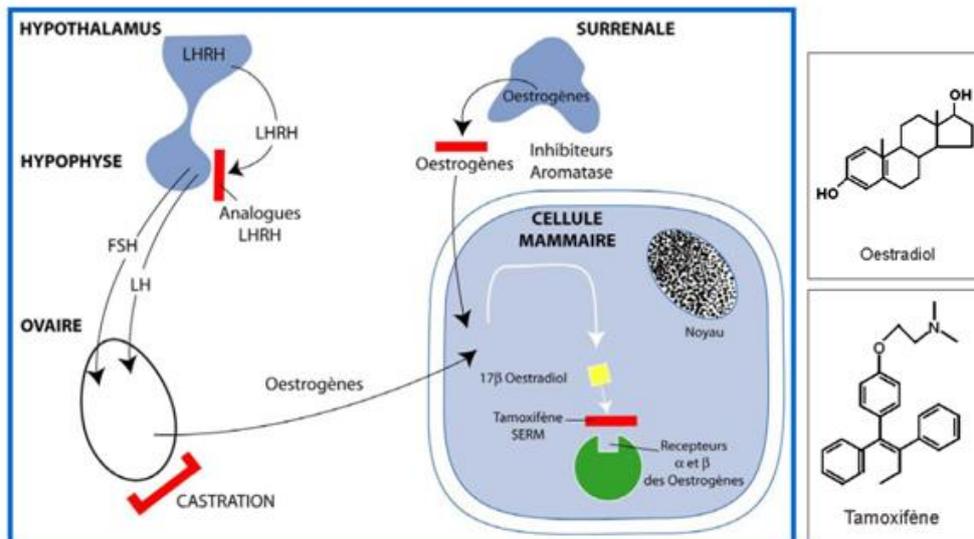
Les inhibiteurs de stéroïdes surréniaux :

Ce type de traitement hormonal interfère avec les hormones produites par la glande surrénale. La partie externe de la glande surrénale (le cortex surrénalien) produit des hormones appelées corticostéroïdes. Lorsque la production de ces corticostéroïdes est bloquée, ils ne sont pas en mesure d'induire la production ou la sécrétion d'autres hormones telles que les œstrogènes, les androgènes, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. La diminution résultante des œstrogènes et des androgènes interfère avec la stimulation de la croissance du cancer dans les tumeurs qui sont influencées par ces hormones. Parmi les substances utilisées pour ce type de traitement on trouve l'aminoglutéthimide le mitotane (Lawrence et al., 2008).

Les anti-œstrogènes :

Les androgènes sont des hormones telles que la testostérone et l'androstérone qui produisent ou stimulent le développement de caractères masculins (Figure 8). Chez la femme, les androgènes sont utilisés pour s'opposer à l'activité des œstrogènes, ce qui ralentit la croissance des cellules tumorales. Dans ce cadre on peut citer la fluoxymestérone, la testostérone, la testolactone.

D'autres substances agissent aussi comme des anti-œstrogènes. Ils se lient aux sites récepteurs des œstrogènes sur les cellules cancéreuses, bloquant ainsi l'entrée de l'œstrogène dans la cellule cancéreuse. Ceci interfère avec la croissance cellulaire et conduit par la suite à sa mort. Le tamoxifène et le torémifène font partie des substances utilisées dans ces cas (Dunnwald et al., 2007).



Note: Le mode d'action des agonistes de la LH RH s'explique par un rétrocontrôle au niveau de l'hypophyse aboutissant à un « épuisement » de celle-ci et donc une privation des stéroïdes sexuels.
 → dans un premier temps: augmentation de sécrétion FSH/LH et donc intérêt d'administration préalable d'anti-estrogènes

Figure 8: Mode d'action du traitement hormonal du cancer du sein.

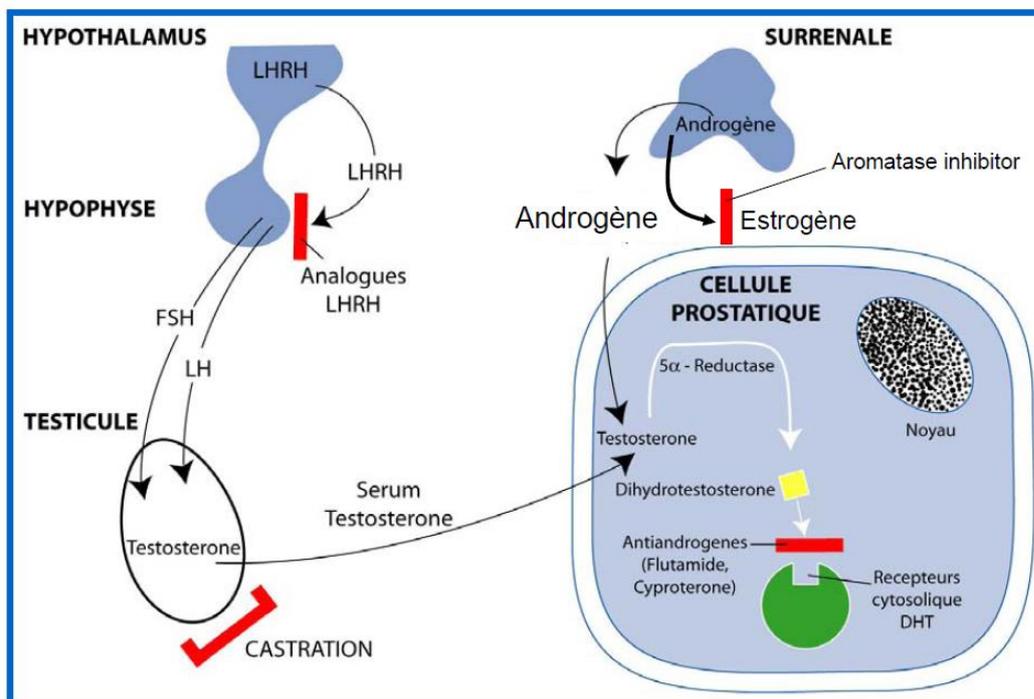


Figure 9: Mode d'action du traitement hormonal du cancer de la prostate.

Les antiandrogènes :

Ce sont des substances qui bloquent les effets de la testostérone (Figure 9). La réduction de la quantité de testostérone entraîne le ralentissement du cancer de la prostate qui est

dépendant de cette hormone. On utilise dans ce cas le bicalutamide, le flutamide et le nilutamide (Dunnwald et al., 2007).

Les inhibiteurs de l'aromatase.

Ce sont des substances qui bloquent l'aromatase, enzyme qui se trouve dans les muscles, la peau, le sein et de la graisse du corps, et qui intervient dans la conversion des androgènes (hormones produites par les glandes surrénales) en œstrogènes. En l'absence d'œstrogènes, la croissance des tumeurs dépendantes de cette hormone va diminuer. L'anastrozole, l'exémestane, et le létrozole sont des inhibiteurs de l'aromatase (Mauri et al., 2006 ; Schröder, 2008).

Les œstrogènes qui sont des hormones femelles utilisées vont concourir pour les sites récepteurs des androgènes, ce qui diminue l'influence des androgènes (testostérone et androstérone) sur le cancer de la prostate qui est androgène dépendant. C'est le cas de DES (diéthylstilbestrol), de l'estradiol (estrace) et du premarin.

Les agonistes de la LHRH (L'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires) (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) appelée aussi parfois lulibérine², gonadolibérine (GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone), ou encore LHRH, est une hormone peptidique responsable de la synthèse et de la sécrétion de la FSH (à un degré moindre) et surtout de la LH (qui lui vaut son nom de LHRH) par l'antéhypophyse (Massie et al., 2011). C'est une neuro-hormone, car ce sont des neurones de l'hypothalamus qui la synthétisent.

Des agonistes de la LHRH agissent en induisant la glande pituitaire située dans le cerveau à arrêter de produire l'hormone lutéinisante, qui (chez les hommes) stimule les testicules à libérer la testostérone et (chez les femmes) stimule les ovaires libérer l'œstrogène. Le manque de testostérone (chez l'homme) et d'œstrogène (chez les femmes) résultant interfère avec la stimulation de la croissance des cellules cancéreuses dépendantes de la testostérone ou œstrogène. L'acétate de gosérelina, l'acétate de leuprolide et la triptoréline pamoate sont utilisés pour cette fin.

Les agents progestatifs sont des substances dont l'effet est celui de la progestérone, une hormone féminine qui a des effets anti-œstrogènes. L'acétate de médroxyprogestérone, le caproate d'hydroxyprogestérone et le mégésterol sont des progestatifs.

Les modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes (SERM) :

Le terme «SERM» décrit les médicaments qui agissent comme des œstrogènes dans certains organes et comme un anti-œstrogène dans d'autres. Par exemple: raloxifène agit comme l'œstrogène pour prévenir la perte osseuse et améliorer le profil lipidique (diminue cholestérol total et LDL sans augmenter les triglycérides), mais il a le potentiel pour bloquer certains effets d'œstrogènes tels que ceux qui mènent au cancer du sein et le cancer de l'utérus.

D'autres produits chimiques, tels que l'amifostine, le dexrazoxane et le mesna, sont connus comme agents chimioprotecteurs. Ces médicaments peuvent être utilisés avec certains programmes de chimiothérapie pour réduire ou minimiser les effets de la chimiothérapie sur le corps (Massie et al., 2011).

D- LA CHIMIOThERAPIE

L'utilisation des médicaments pour le traitement des cancers est relativement récente. En effet les premières études cliniques en chimiothérapie anticancéreuse datent de 1942. Depuis les années 1960 des combinaisons de drogues (poly-chimio-thérapies) ont été utilisées avec une certaine efficacité pour faire régresser (Figure 7), voire guérir des cancers avancés. Ces médicaments sont employés seuls, combinés entre eux, ou alors en association de manière adjuvante avec d'autres traitements tels que la chirurgie, la radiothérapie ou l'immunothérapie pour lutter contre le cancer (Chauvergne et Hoerni, 2001). L'exemple de combinaison est celui du cisplatine et du paclitaxel utilisés pour le traitement des tumeurs solides comme le cancer cervical et le cancer ovarien. Le cisplatine s'attache à l'ADN, compromet la réplication et induit l'apoptose. Le paclitaxel est cytotoxique par son attachement et par la stabilisation des tubules polymérisés. Les modes d'action de ces deux drogues étant différents et donc sans compétition pour leurs cibles respectives, il en résulte que les taxanes et les composés du platine sont souvent utilisés en chimiothérapie anticancéreuse combinée (Ben Doherty et al., 2014).

La chimiothérapie anticancéreuse repose sur le principe général du traitement systémique. Elle vise à traiter les cellules cancéreuses présentes dans l'ensemble de l'organisme. Elle est très utilisée contre les cancers du sang (leucémies, lymphomes) et aussi contre les tumeurs solides, en particulier le cancer de l'ovaire, du sein et du colon

(DeVita et al., 2008). Le but recherché est soit de réduire la taille de la tumeur avant une chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante), soit de compléter l'action des autres traitements (chimiothérapie adjuvante), soit encore dans le but de freiner l'évolution d'un cancer avancé (chimiothérapie palliative) (DeVita et al., 2008). La chimiothérapie est de plus en plus utilisée précocement en combinaison avec d'autres thérapies locorégionales des cancers. Elle est souvent utile pour le traitement préventif des micro-métastases non décelables.

Les mécanismes d'action des substances chimio-thérapeutiques sont assez diversifiés. Ils induisent la destruction des tissus tumoraux, en principe plus sensibles aux dommages causés par ces drogues, que les tissus constitués de cellules normales. Les protéines du cytoplasme, notamment la tubuline, les mitochondries, les protéines membranaires, peuvent être les sites d'action des cytotoxiques. Bien que l'ensemble des constituants de la cellule puisse être la cible de ces substances, l'ADN en reste la principale cible (DeVita et al., 2008). Divers agents de chimiothérapie d'usage clinique comme le camptothécine, l'étoposide et la doxorubicine les anti-topoisomères I et II créent de grands nombres de cassures de l'ADN double hélice qui sont des lésions de l'ADN très cytotoxiques (Weinstein et al. 1997).

Ces drogues peuvent induire des perturbations fatales de la structure, du métabolisme et de l'expression du génome des cellules traitées. Ainsi, les chimiothérapies choisies doivent en l'occurrence être en mesure de satisfaire des rapports fiables de l'efficacité à la toxicité et des bénéfices aux risques, selon les drogues employées et les tumeurs traitées.

Les Types de chimiothérapie :

Les buts de la chimiothérapie varient en fonction du stade du cancer traité. On définit ainsi :

- **la chimiothérapie néo-adjuvante** (appelée également "première" ou "d'induction") : Elle est utilisée avant le traitement local et régional d'une tumeur localisée. Le but de ce traitement est d'une part de réduire le volume tumoral afin de favoriser un traitement conservateur et de faciliter ainsi le geste d'exérèse. D'autre part, il permet de lutter contre les micrométastases à distance (Chabner et Roberts, 2005 ; Craig et al. 2002).

- **La chimiothérapie adjuvante:** Elle est utilisée après le traitement loco-régional (chirurgie et/ou radiothérapie) à priori curatif, afin d'éviter une récurrence métastatique. Elle a clairement fait la preuve de son efficacité et est utilisée en particulier dans les cancers du sein, du côlon, de l'ovaire etc. (Chabner et Roberts, 2005). Elle est prescrite en présence de facteurs de mauvais pronostic définis notamment par la taille tumorale, le statut ganglionnaire et les critères histo-pronostiques (Conroy et al. 2011).

- **La chimiothérapie au stade métastatique:** dans ce cas, la chimiothérapie n'a pas toujours pour objectif la guérison du patient. Son but est l'obtention d'une rémission, la prolongation de la durée de vie ou encore l'amélioration de la qualité de vie en diminuant les conséquences de la masse tumorale (douleur, fatigue, essoufflement...) (Conroy et al. 2011).

- **La chimiothérapie palliative:** elle est destinée aux cancers métastatiques. Son but est d'obtenir une rémission partielle ou complète, afin de prolonger la survie du patient et de réduire les symptômes liés à la maladie. En phase métastatique, seules les tumeurs germinales peuvent faire l'objet d'un traitement à visée curatrice (Edwards et al. 2011) .

Modes d'action en chimiothérapie :

Selon leur mode d'action, les molécules utilisées en chimiothérapie peuvent être classées en plusieurs catégories. On distingue ainsi plusieurs Types de médicaments de chimiothérapie :

Ces médicaments peuvent être divisés en plusieurs groupes en fonction de facteurs tels que leur mode d'action, leur structure chimique et leur interaction avec un autre médicament. Certains médicaments n'obéissent pas à ce classement par ce qu'ils ont plusieurs modes d'action, et peuvent donc appartenir à plus d'un groupe.

Savoir comment agit le médicament est important pour la prévision des effets secondaires. Cela aide les médecins à décider quels médicaments sont susceptibles de bien agir ensemble. Si plus d'un médicament sera utilisé, cette information contribue également à planifier exactement quand chacun des médicaments devrait être administré (dans quel ordre, à quelle dose et à quelle fréquence).

Agents alkylants :

Les agents alkylants endommagent directement l'ADN et empêchent la cellule de se

multiplier. Ces médicaments agissent dans toutes les phases du cycle cellulaire et sont utilisés pour traiter de nombreux cancers différents, y compris la leucémie, le lymphome, la maladie de Hodgkin, le myélome multiple et le sarcome, ainsi que les cancers du poumon, du sein et de l'ovaire (DeVita et Chu, 2008).

Parce que ces médicaments ciblent l'ADN en s'y liant par des liaisons covalentes, ils peuvent causer des dommages à long terme à la moelle osseuse. Dans de rares cas, cela peut conduire à une leucémie aiguë. Le risque de leucémie causée par des agents alkylants est «dose-dépendante». Cela signifie que le risque est faible avec des doses faibles, mais il augmente à mesure que la dose du médicament utilisé est élevée. Le risque de leucémie après avoir reçu les agents alkylants reste élevé pendant les 5 à 10 ans après le traitement.

Les agents alkylants sont divisés en différentes catégories, on y distingue :

- Les moutardes d'azote: tels que la méchloréthamine (moutarde à l'azote), le chlorambucil, le cyclophosphamide (Cytosan®), l'ifosfamide et le melphalan.
- Les Nitrosourées: tels que la streptozocine, la carmustine (BCNU) et la lomustine.
- Les sulfonates d'alkyle busulfan.
- Les triazines: la dacarbazine (DTIC) et le témozolomide (Temodar®).
- Les éthylènimines: le thiotépa et l'altretamine (hexaméthylmélamine).

Les sels de platine (tels que le cisplatine, le carboplatine et l'oxaloplatine) sont parfois regroupées avec des agents alkylants parce qu'ils tuent les cellules d'une manière similaire. Ces médicaments sont moins susceptibles que les agents alkylants de causer la leucémie comme résultat de leurs effets secondaires (Lacave et al., 2005).

Anti-métabolites :

Ce sont des types de composés utilisés en chimiothérapie qui sont similaires à certains composés chimiques normaux de la cellule et interfèrent avec eux. En s'incorporant au métabolisme de la cellule, celle-ci est empêchée de se diviser. Les anti-métabolites sont spécifiques aux différentes phases du cycle cellulaire (Figure 10). Ils sont aussi des inhibiteurs des voies de synthèse de l'ADN. Ils sont classés selon les substances respectives avec lesquelles ils interfèrent (Chabner et Roberts 2005). Ainsi nous avons les exemples suivants:

Antagoniste de l'acide Folique: Methotrexate.

Antagonistes de la Pyrimidine: 5-Fluorouracil, Foxuridine, Cytarabine, Capecitabine et Gemcitabine.

Antagonistes de Purine: 6-Mercaptopurine et 6-Thioguanine.

Inhibiteurs de l'Adenosine desaminase: Cladribine, Fludarabine, Nelarabine et Pentostatin.

Antifolate Drugs

Antifolates **inhibit** cell division, DNA/RNA synthesis and repair, and protein synthesis.

Some antifolates — such as **proguanil**, **pyrimethamine** and **trimethoprim** - selectively inhibit folate in microorganisms.

The majority work by inhibiting **dihydrofolate reductase**.

Folate is **essential** in first trimester of pregnancy, hence antifolates are strongly contraindicated.

Low doses of methotrexate **deplete** folate stores — recommended to consume high-folate diet and supplements.

Antifolates

Methotrexate
Pemetrexed
Proguanil
Pyrimethamine
Trimethoprim

Antifolate	Indications
Methotrexate	Malignancies, ectopic pregnancy, autoimmune conditions
Pemetrexed	Non-small cell lung carcinoma, mesothelioma
Proguanil	Prevention and treatment of malaria
Pyrimethamine	Malaria, toxoplasmosis and pneumocystis pneumonia
Trimethoprim	Innumerable infections — from malaria to urinary tract



 @PharmaFactz

Figure 10 : Exemples d'antimétabolites antifolates.

Antibiotiques anti-tumoraux :

Ces médicaments ne sont pas comme les antibiotiques utilisés pour traiter les infections bactériennes. Ils agissent en modifiant l'ADN dans les cellules cancéreuses pour les empêcher de croître et de se multiplier (Figure 11). Parmi les antibiotiques antitumoraux, on a les exemples suivants :

Anthracyclines : Les anthracyclines sont des antibiotiques anti-tumoraux qui interfèrent avec les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN. Ces médicaments agissent dans toutes les phases du cycle cellulaire. Ils sont largement utilisés contre plusieurs variétés de cancers.

Les anthracyclines ont quatre mécanismes d'action:

1. L'inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN en intercalant entre les paires de bases du brin d'ADN / ARN, empêchant ainsi la réplication des cellules cancéreuses à croissance rapide. (Zunino et Capranico 1990).
2. Inhibition de l'enzyme topoisomérase II, ce qui empêche le relâchement de l'ADN superenroulé et bloquant ainsi la transcription de l'ADN et la réplication. En d'autres termes, les inhibiteurs de la topoisomérase II stabilisent le complexe topoisomérase II après qu'il a rompu la chaîne d'ADN. Cela conduit à un clivage de l'ADN médié par la topoisomérase II produisant des cassures d'ADN. (Zunino et Capranico 1990 ; Jensen et al., 1993)

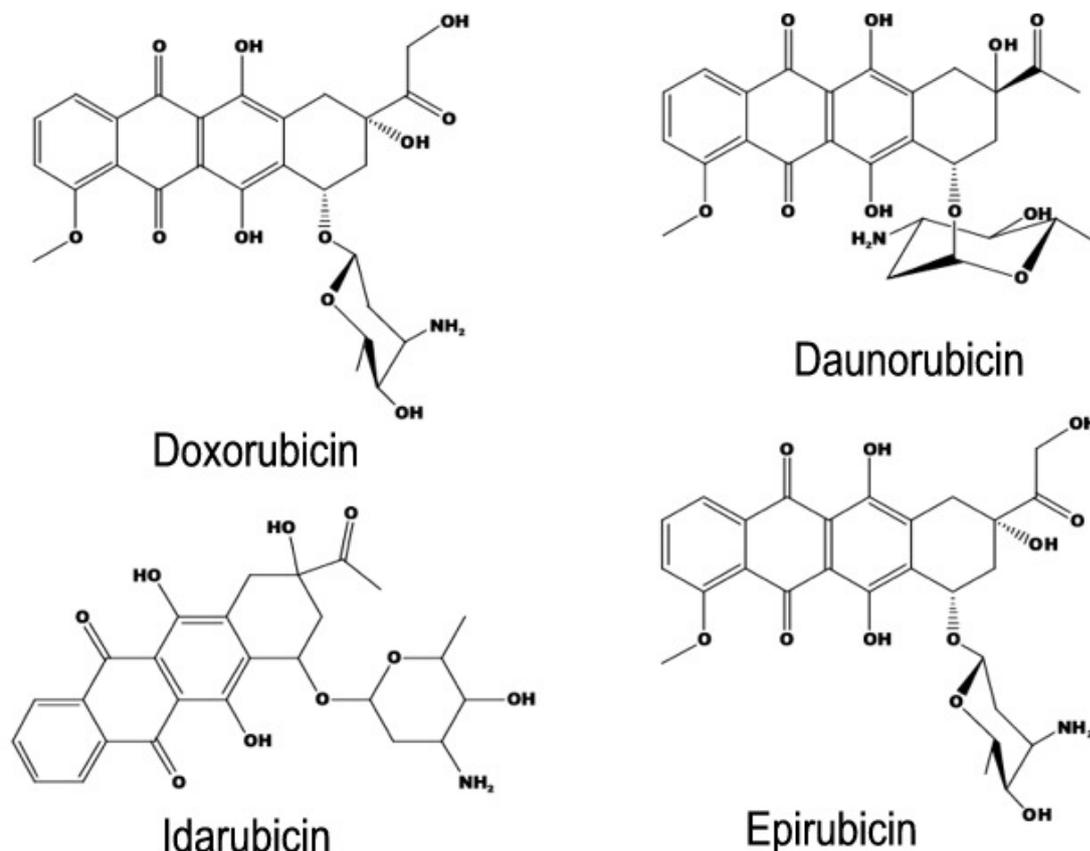


Figure 11: Exemples d'Antibiotiques anti-tumoraux.

Anthracyclines (doxorubicine et analogues) et dactinomycine qui sont des agents intercalants et inhibiteurs de la topoisomérase II

La bléomycine est un chélateur du fer qui produit ROS via interaction avec l'O₂, favorisant des cassures de l'ADN.

La mitomycine est un agent alkylant.

3. Génération par l'intermédiaire du fer, des radicaux libres d'oxygène (ROS) qui endommagent l'ADN, les protéines et les membranes cellulaires (Szwed et al., 2016). (Szwed et al., 2015).

4. Induction de l'expulsion d'histone de la chromatine ce qui dérègle la régulation des réponses aux dommages de l'ADN, de l'épigénome et du transcriptome.

Les exemples d'anthracycline comprennent la daunorubicine, la doxorubicine (Adriamycin®), l'épirubicine, et l'idarubicine. Les dommages de surdosage au niveau cardiaque sont d'une préoccupation majeure lors de l'utilisation de ces composés. (Minotti et al., 2004).

D'autres antibiotiques anti-tumoraux non anthracycliques comprennent l'actinomycine-D, la bléomycine, la Mitomycine-C, et la mitoxantrone (agit également comme un inhibiteur de la topoisomérase II).

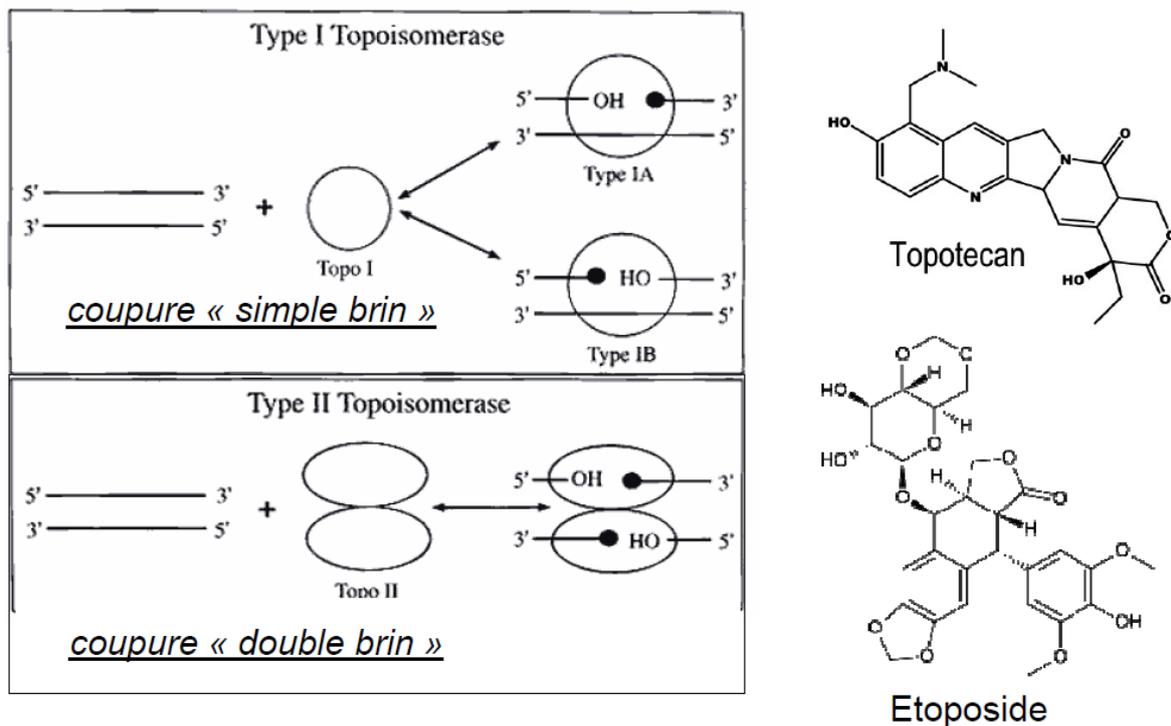


Figure 12 : Les inhibiteurs de topoisomérase.

L'activité topoisomérase introduit transitoirement une coupure dans l'ADN pour permettre la rotation d'un brin sur l'autre et éviter la torsion de l'ADN au cours de la réplication. Les inhibiteurs pharmacologiques des topoisomérases empêchent la religature du brin coupé. Il s'en suit une cassure définitive de l'ADN. L'irinotecan et le topotecan sont des exemples d'inhibiteurs de la topoisomérase I. L'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II.

Les inhibiteurs de topoisomérase

Ces médicaments interfèrent avec des enzymes appelées topoisomérases, qui aident à séparer les brins d'ADN afin qu'ils puissent être copiés pendant la phase S de la mitose. Les inhibiteurs de la topoisomérases (Figure 12), sont utilisés pour traiter certaines

leucémies, ainsi que les cancers du poumon, de l'ovaire, gastro-intestinal, et d'autres cancers. Ils sont regroupés en fonction du type d'enzyme ils affectent. On distingue ainsi, les inhibiteurs de la topoisomérase I qui comprennent le topotécan et l'irinotécan (CPT-11). Les inhibiteurs de la topoisomérase II comprennent l'étoposide (VP-16), le téniposide et la mitoxantrone (agit également comme un antibiotique anti-tumoral). Les inhibiteurs de la topoisomérase II peuvent augmenter le risque d'un second cancer - la leucémie myéloïde aiguë (LMA) - dans un délai de 2 à 3 ans après le traitement par ce médicament (Lacave et al., 2005).

Les inhibiteurs mitotiques :

Les antimitotiques sont souvent des alcaloïdes d'origine végétale et d'autres composés dérivés de produits naturels. Ils agissent en arrêtant la mitose dans la phase M du cycle cellulaire, mais ils peuvent endommager les cellules dans toutes les phases en bloquant les enzymes de synthèse des protéines nécessaires à la multiplication des cellules (Lacave et al., 2005).

Des exemples d'inhibiteurs mitotiques incluent (Figures 13 et 14):

Les taxanes: le paclitaxel (Taxol) et le docétaxel (Taxotere®)

Les épothilones: ixabépilone (Ixempra®)

Les Vinca alcaloïdes: vinblastine (Velban®), vincristine (Oncovin®), et vinorelbine (Navelbine®)

L'estramustine (Emcyt®).

Ils sont utilisés pour traiter plusieurs types de cancer, notamment du sein, du poumon, les myélomes, les lymphomes et les leucémies. Ces médicaments peuvent causer des dommages nerveux, ce qui peut limiter les doses à administrer au patient.

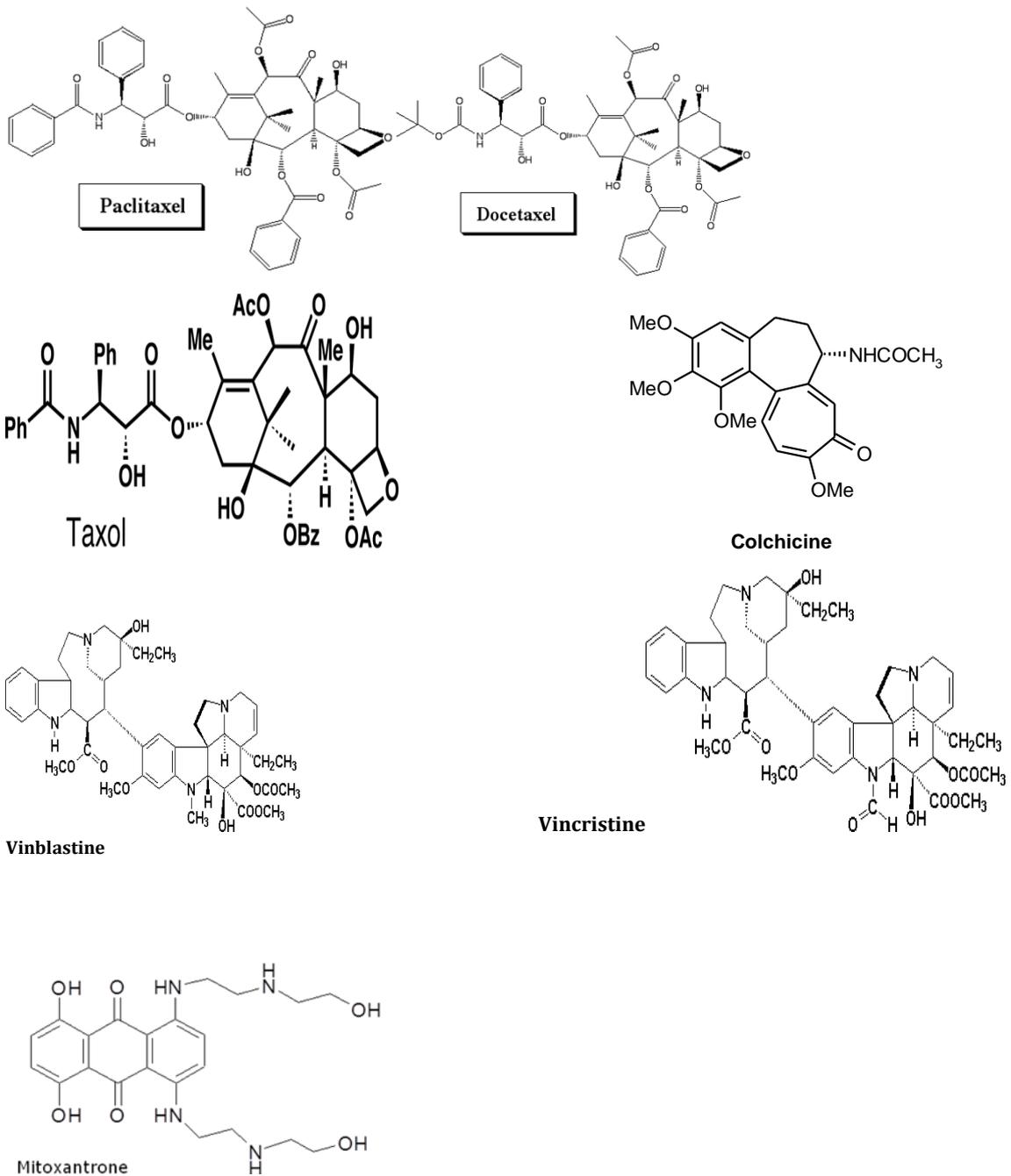


Figure 13 : Exemples d'inhibiteurs mitotiques utilisés en chimiothérapie.

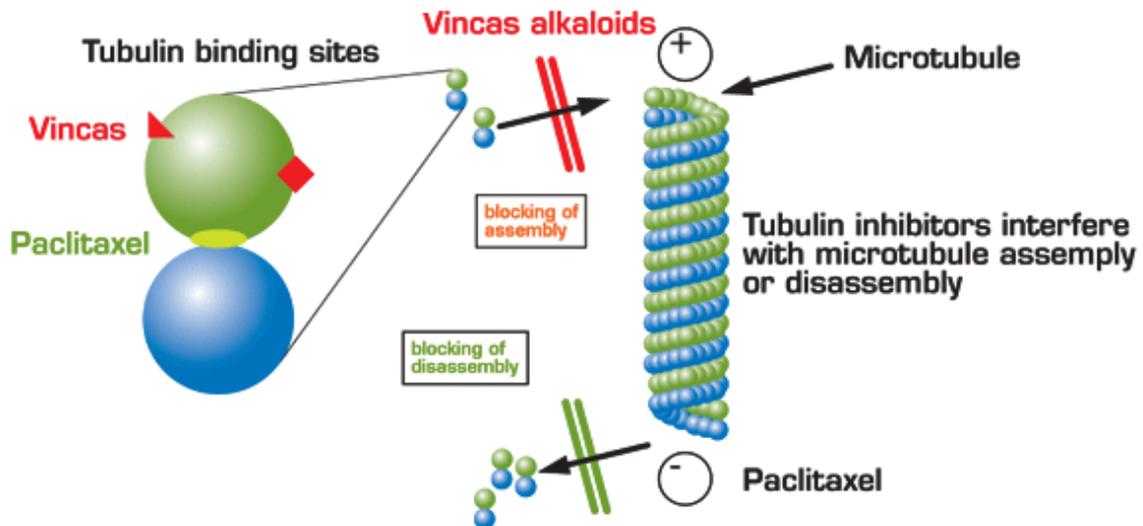


Figure 14 : Mécanismes d'action des inhibiteurs des microtubules.

Les microtubules résultent de la polymérisation de dimères de tubuline. Présents dans l'ensemble des cellules eucaryotes, ils constituent des structures dynamiques, constamment en cours de polymérisation et de dépolymérisation. Les inhibiteurs des microtubules exercent leurs effets anti-tumoraux en altérant le fuseau pendant la division cellulaire. Les alcaloïdes de la pervenche bloquent la polymérisation alors que les taxanes empêchent la dépolymérisation.

Inhibiteurs de la croissance des cellules cancéreuses :

Un inhibiteur de la croissance des cellules cancéreuses bloque les facteurs de croissance qui permettent le développement des cellules cancéreuses. Chaque facteur de croissance a son propre récepteur sur la cellule cancéreuse (Chabner and Roberts, 2005).

Les différents facteurs de croissance agissent différemment (Figure 15). Certains incitent les cellules à croître et à se diviser en nouvelles cellules. D'autres disent aux cellules de cesser de croître ou de mourir. Des exemples de facteurs de croissance sont entre autres ceux qui contrôlent:

- la croissance cellulaire
 - facteur de croissance épidermique (EGF)
 - facteur de croissance fibroblastique (FGF)
- la formation des vaisseaux sanguins
 - facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)
 - facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

Certains inhibiteurs de la croissance des cellules cancéreuses sont des médicaments antiangiogéniques (ils empêchent la formation de vaisseaux sanguins) et d'autres sont des anticorps monoclonaux. Les inhibiteurs de la croissance des cellules cancéreuses

sont nommés selon le facteur de croissance qu'ils bloquent. Il y a 3 principaux types d'inhibiteurs de la croissance des cellules cancéreuses.

Inhibiteurs de la tyrosine kinase :

Les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) bloquent les enzymes appelées tyrosines kinases. Ces enzymes font partie du processus de signalisation qui se déroule dans les cellules. Lorsque ce processus est bloqué, les cellules cessent de croître et de se diviser. Des exemples d'inhibiteurs de la tyrosine kinase sont entre autres (Tableau 2 et Figure 16): Erlotinib (Tarceva) ; Imatinib(Gleevec) ; Gefitinib (Iressa) ; Dasatinib (Sprycel). Ces inhibiteurs de la tyrosine kinase sont pris par voie orale.

Inhibiteurs du protéasome :

Les protéasomes sont des facteurs de croissance présents dans toutes les cellules. Ils aident à décomposer les protéines dont les cellules n'ont pas besoin. Une fois les protéines décomposées, les cellules peuvent les réutiliser pour fabriquer de nouvelles protéines dont elles ont besoin.

Tyrosine Kinase Inhibitors

Inhibition of Tyrosine Kinase
TKIs block tyrosine kinase enzyme activity, preventing signal transduction — inhibiting cell growth and enhancing apoptosis.

Dasatinib (*Sprycel*) is used to treat chronic myeloid leukemia (CML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL). Dasatinib inhibits VEGFR, PDGFR, KITs and BCR-ABL.

Erlotinib (*Tarceva*) is used to treat non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. Erlotinib inhibits signals from EGFR (HER1).

Imatinib (*Gleevec*) is used in the treatment of forms of leukemia, particularly CML. The drug inhibits signals from PDGFR, KITs and BCR-ABL.

Sorafenib (*Nexavar*) is used to treat liver cancer, thyroid cancer and renal cell carcinoma. **Sunitinib** (*Sutent*) is used in renal cell carcinoma, pancreatic cancer and gastrointestinal stromal tumour. Both drugs inhibit types 2/3 VEGFR, PDGFR and KITs.

VEGFR — Vascular Endothelial Growth Factor Receptor; PDGFR — Platelet-derived Growth Factor Receptor; KITs — Proteins encoded by the KIT gene

**Dasatinib
Erlotinib
Imatinib
Sorafenib
Sunitinib**

Figure 15 : Exemples d'inhibiteurs de la Tyrosine Kinase.

Quand on bloque les protéasomes, les protéines s'accumulent et les cellules cancéreuses meurent. L'exemple de produit utilisé dans ce sens est le bortezomib (Velcade), il exerce

indirectement des effets pro-apoptotiques et inhibe la croissance cellulaire. Il est administré par voie intraveineuse.

Inhibiteurs des récepteurs de facteurs de croissance :

Les inhibiteurs des récepteurs de facteurs de croissance se fixent aux récepteurs situés à la surface d'une cellule et empêchent les facteurs de croissance présents dans le sang de se rendre à la cellule. Cela bloque la croissance et la division cellulaires.

Des exemples d'inhibiteurs des récepteurs de facteurs de croissance sont entre autres ceux-ci :

- bévacizumab (Avastin)
- cétuximab (Erbix).
- Les corticoïdes :
- Les corticostéroïdes, souvent appelées simplement stéroïdes sont des hormones naturelles et des médicaments analogues aux hormones qui sont utiles dans le traitement de nombreux types de cancer, ainsi que d'autres maladies. Lorsque ces médicaments sont utilisés dans le cadre du traitement du cancer, ils sont considérés comme des médicaments de chimiothérapie.
- Des exemples de corticostéroïdes comprennent la Prednisone, la Méthylprednisolone (Solumedrol®) et dexaméthasone (Decadron®).
- Les stéroïdes sont également couramment utilisés pour aider à prévenir les nausées et les vomissements causés par la chimiothérapie. Ils sont utilisés avant la chimiothérapie pour aider à prévenir les réactions allergiques sévères.
- D'autres médicaments de chimiothérapie
- Certains médicaments de chimiothérapie agissent de façon légèrement différente et ne cadrent pas bien dans l'une des autres catégories.
- Des exemples comprennent des médicaments tels que la L-asparaginase, qui est une enzyme, et le bortézomib inhibiteur de protéasome (Velcade).

Tableau 2 : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase et leurs cibles.

INIBS	Nom déposé	Cibles (protéine tyrosine kinase)	Cancer
Imatinib	Glivec	bcr/abl c-Kit (récepteur du stem-cell factor) PDGFR (récepteur du platelet-derived growth factor).	leucémie myéloïde chronique tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)
Dasatinib	Sprycel	bcr/abl	leucémie myéloïde chronique
Erlotinib	Tarceva	EGFR (tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique de type I)	cancer bronchique non à petites cellules (NSCLC)
Sorafenib	Nexavar	VEGFR2 (Raf Kinase, PDGFR, c-Kit)	carcinome rénal métastasé
Sunitinib	Sutent	VEGFR2 (PDGFR, c-Kit)	tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) cancer du rein avancé et/ou métastasé

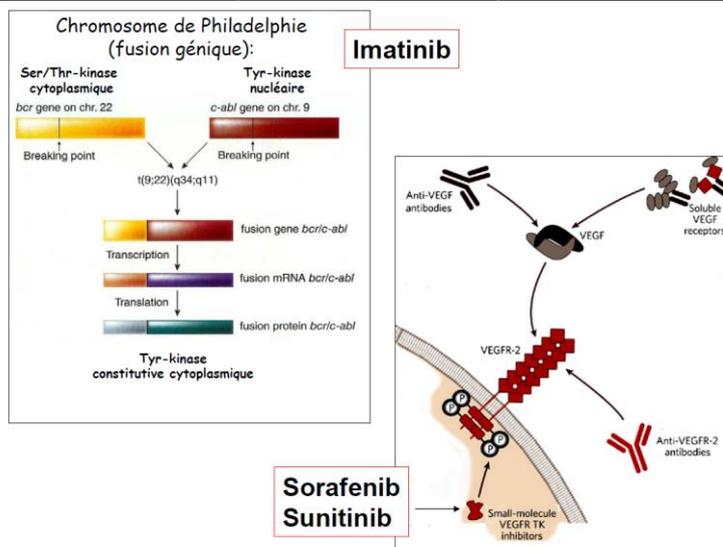


Figure 16 : Exemple d'inhibiteurs de signalisation cellulaire.

- Imatinib, Utilisé dans les leucémie inhibiteur de signaux de PDGFR, Kits et BCR-ABL.
- Sorafenib et Sunitinib anti-VEGFR2, inhibiteurs de (Raf Kinase, PDGFR, c-Kit).

Problèmes de l'utilisation de la chimiothérapie

L'inconvénient majeur de ces traitements est leur manque de sélectivité pour les cellules malignes. Les effets secondaires, observés sur les tissus sains actifs, sont dus à l'absorption des drogues par les cellules qui se multiplient rapidement, notamment les cellules sanguines, les cellules de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau et des muqueuses. Ces effets qui résultent de la toxicité excessive des traitements empêchent l'utilisation de doses suffisamment élevées pour éliminer définitivement les tumeurs.

Par ailleurs, les phénomènes de résistance, spontanée ou acquise, de certaines tumeurs aux drogues de chimiothérapie limitent leur efficacité thérapeutique. Il apparaît donc incontournable de développer de nouveaux agents anticancéreux efficaces et aux effets secondaires réduits.

Il est démontré qu'à chaque cure, on observe une chute importante du nombre de cellules cancéreuses, mais également une petite aplasie. A la fin du cycle, la moelle osseuse récupère tandis que les cellules cancéreuses vont progressivement diminuer en nombre. Dans le cas où il y a développement d'une résistance l'apport de nouvelles cures est inefficace (Chauvergne et Hoerni, 2001b).

Problèmes de toxicité

La chimiothérapie anticancéreuse présente de nombreuses toxicités qu'on peut classer en deux grandes catégories:

Les toxicités aiguës, qui, pour la plupart, sont assez communes aux différents médicaments.

Les toxicités chroniques, qui, au contraire, pour la plupart, sont particulières à une famille thérapeutique donnée.

Les principales toxicités aiguës communes à la plupart des drogues à effet antiprolifératif atteignent l'appareil digestif (nausées et vomissements, diarrhées ou constipation, mucites), la peau et les phanères (troubles cutanés, alopecie) et le système hématopoïétique (neutropénie, thrombopénie, anémie).

Il existe également des toxicités spécifiques du type de drogue utilisée. Ainsi par exemple, des atteintes de l'appareil cardiovasculaire (myocardiopathie responsables d'insuffisance ventriculaire retardée) sont principalement observées lors de l'utilisation d'anthracyclines, tandis qu'une neuro-toxicité sera plutôt observée avec des agents tubulo-affins, des agents alkylants et des agents antimétabolites.

La chimio-résistance

La chimiorésistance est un problème majeur dans le traitement des cancers. Les tumeurs peuvent présenter une résistance intrinsèque ou acquise. La chimiorésistance peut impliquer plusieurs mécanismes, comme l'influx diminué et l'afflux augmenté des substances actives, l'inactivation du médicament, la modification des cibles moléculaires, la réparation ou la réversion des modifications cellulaires induites par les molécules actives ou l'abolition de l'apoptose.

Plusieurs types de résistance à la chimiothérapie ont été observés dans la pratique clinique:

- La résistance intrinsèque survient d'emblée lors de l'administration des premières séances de chimiothérapie, sans phase de sensibilité initiale. De nombreuses tumeurs sont ainsi d'emblée résistantes : c'est le cas du mélanome, de nombreux sarcomes et de tumeurs cérébrales notamment.

- La chimio-résistance acquise : après une phase initiale de grande chimio-sensibilité, apparaît secondairement une progression de la maladie témoignant d'une résistance acquise. C'est le cas de nombreuses tumeurs solides comme les cancers du sein et de l'ovaire. Les mécanismes moléculaires expliquant ces phénomènes de résistances ont été mis en évidence, et les plus importants sont les suivants (Figure 17):

a) La surexpression de protéines membranaires, comme la gp170. Ces protéines sont des pompes entraînant un flux du cytotoxique du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire du médicament est donc diminuée, réduisant ainsi son efficacité. Le gène MDR (multidrug résistance) codant pour la gp170, est amplifié dans la cellule cancéreuse ayant acquis une résistance, aboutissant à la surexpression de cette protéine membranaire. Cette protéine de membrane est retrouvée sur certains tissus sains notamment sur les cellules de Kupfer jouant un rôle physiologique dans la détoxification de l'organisme. (Szabo et al., 2000)

b) Les cibles des médicaments anti-cancéreux peuvent subir des modifications qualitatives ou quantitatives. En effet la cible peut muter, elle n'est alors plus reconnue par le cytotoxique (modification qualitative). La cible peut également être produite en grande quantité dans la cellule cancéreuse (modification quantitative) en raison d'une

amplification du gène codant pour cette cible. Dans le premier cas le médicament ne reconnaît plus sa cible, tandis que dans le second cas la quantité du médicament est insuffisante pour entraîner une cytotoxicité significative.

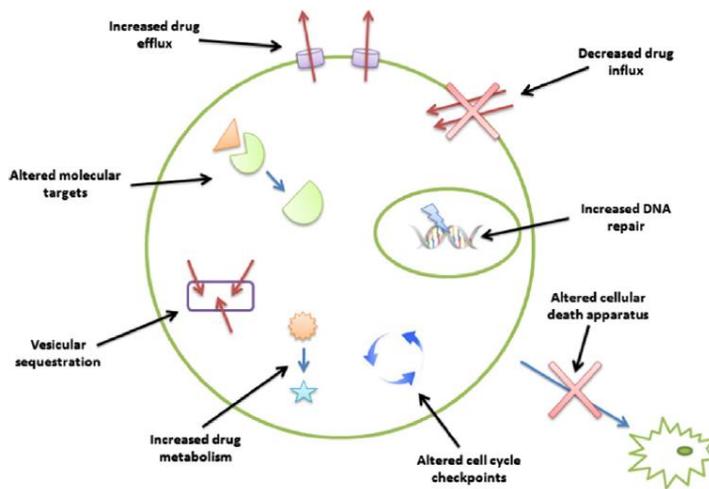


Figure 17 : Mécanismes de la résistance aux drogues de chimiothérapie (Gong et al., 2012).

c) Les phénomènes de réparation de l'ADN peuvent être dérégulés aboutissant ainsi à la réduction de la cytotoxicité par réparation accélérée des lésions créées sur l'ADN, grâce notamment à l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation dont le niveau est nettement amplifié.

Le phénomène de chimio-résistance minimise l'action des médicaments utilisés en chimiothérapie et oblige les chercheurs à trouver en permanence de nouveaux produits actifs et/ou de nouvelles cibles cellulaires.

1-5-2-TRAITEMENTS NON CONVENTIONNELS

A-Immunothérapie :

L'immunothérapie regroupe les actions obtenues par les modificateurs de la réponse biologique, les facteurs stimulateurs de colonies et les vaccins antitumoraux.

Les modificateurs de la réponse biologique (Biologic Réponse Modifies, BRM), sont des agents utilisés en immunothérapie. Cette dernière est un type de traitement qui mobilise le système immunitaire du corps pour lutter contre le cancer. La thérapie consiste principalement en la stimulation du système immunitaire pour l'aider à réagir plus efficacement aux tumeurs. Les vaccins anti-tumoraux fonctionnent également pour stimuler le système immunitaire du corps. Pour aider à comprendre le rôle que jouent les agents biologiques dans le traitement du cancer une certaine compréhension de la

façon dont le système immunitaire (comme les lymphocytes, les cellules dendritiques et les macrophages) fonctionne est utile.

Les modificateurs de la réponse biologique sont des substances qui sont capables de déclencher le système immunitaire pour influencer indirectement sur les tumeurs. Ceux-ci comprennent des cytokines telles que les interférons et les interleukines. Cette stratégie repose sur une compréhension des réactions des composants du système immunitaire comme les lymphocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.

Effets secondaires des modificateurs de la réponse Biologique

Comme les autres formes de traitement du cancer, les immunothérapies peuvent causer un certain nombre d'effets secondaires. Ces effets secondaires peuvent varier considérablement d'un patient à l'autre. Les modificateurs de la réponse biologique, peuvent causer des symptômes ressemblant à la grippe, y compris la fièvre, des frissons, des nausées et perte d'appétit. Des éruptions ou gonflement peuvent se développer à l'endroit où ces substances sont injectées. La pression artérielle peut également être affectée, il y a généralement diminution de la pression artérielle. La fatigue est un autre effet secondaire fréquent des modificateurs de la réponse biologique. Les effets secondaires des facteurs de stimulation de colonies peuvent inclure une douleur osseuse, la fatigue, la fièvre et la perte d'appétit.

Facteurs de stimulation des colonies

Dans le corps les cellules sanguines sont produites à partir de la moelle osseuse. Il existe trois types principaux de cellules sanguines; globules blancs qui luttent contre les infections; globules rouges, qui transportent l'oxygène vers et éliminent les déchets des organes et des tissus; et des plaquettes, qui permettent au sang de coaguler.

traitements comme la chimiothérapie et la radiothérapie peuvent affecter ces cellules qui mettent une personne à risque de développer des infections, l'anémie et des problèmes de saignement cancer. Les facteurs de stimulation des colonies sont des substances qui stimulent la production de cellules sanguines et favorisent leur capacité de fonctionner. Ils ne touchent pas directement les tumeurs, mais grâce à leur rôle dans la stimulation de cellules sanguines, ils peuvent être utiles en tant que soutien du système immunitaire des personnes pendant le traitement du cancer.

B-Les vaccins anti-tumoraux

Les chercheurs développent des vaccins susceptibles d'inciter le système immunitaire du patient à reconnaître les cellules cancéreuses. Ceux-ci seraient en théorie travailler de la même manière que les vaccins contre la rougeole ou les oreillons. La différence dans le traitement du cancer est que les vaccins sont utilisés après que quelqu'un a le cancer. Les vaccins seraient donnés pour empêcher le retour du cancer ou pour inciter le corps à rejeter les tumeurs. Ceci est beaucoup plus difficile que la prévention d'une infection virale. L'utilisation de vaccins contre les tumeurs continue d'être étudiée dans des essais cliniques.

C-Traitements innovateurs et non conventionnels

A l'origine, les anticorps monoclonaux étaient utilisés en oncologie essentiellement dans le traitement des leucémies et des lymphomes (Tableaux 3a, 3b et 3c). La thérapie anti cancéreuse basée sur l'utilisation des anticorps monoclonaux a évolué pour devenir la thérapie anticancéreuse ciblée. Cette thérapie comprend les mécanismes lytiques directs et les mécanismes lytiques par médiation immunitaire. Le ritixumab par exemple, est un anticorps chimère anti-CD20 (Figure 18). IL est l'un des premiers anticorps monoclonaux avec une grande efficacité clinique et servait de standard en immunothérapie contre les lymphomes à cellules B. L'association anticorps monoclonaux et la chimiothérapie, ou encore les anticorps monoclonaux conjugués et chimiothérapie, permet d'améliorer les taux de réponse au traitement, de retarder la

Tableau 3a : Anticorps monoclonaux et leurs cibles en immunothérapie anticancéreuse.

Anticorps "Mabs"	Nom déposé	Antigènes	Cibles	Indications	Remarques
Bévacizumab	Avastin	VEGF	Cellules endothéliales angiogéniques	cancer colorectal métastasé	association à une chimiothérapie
Trastuzumab	Herceptin	HER-2 (Neu)	Cellules tumorales	Cancer du sein métastasés HER-2 surexprimé	aussi traitement précoce de certains cancers du sein non métastasés avec surexpression de HER-2
Cétuximab	Erbix	EGFR	Cellules tumorales	cancer colorectal métastasé et carcinome épidermoïde de la tête et du cou.	
Alemtuzumb	Mabcampath	CD52	Lymphocytes B et T	leucémies lymphoïdes chroniques	
Rituximab	Mabthera	CD20	lymphocytes B	lymphomes folliculaires, en cas d'échec de la chimiothérapie,	aussi dans l'arthrite rhumatoïde résistante aux autres inducteurs de rémission
Ibritumomab tiuxétan	Zevalin	CD20	lymphocytes B	lymphomes non hodgkiniens chez l'adulte après traitement au rituximab	

Tableau 3b : Anticorps monoclonaux et leurs cibles en immunothérapie anticancéreuse.

Anticorps	Cible	Expression	Indication principale
Rituximab (Mabthera®)	CD20	Lymphocytes B	Lymphome non-hodgkinien
Yttrium-90 Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®)			
Trastuzumab (Herceptin®)	HER-2neu	Différents tissus, notamment le myocarde	Cancer du sein
Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®) ²	CD33	Cellules immatures de la lignée myéloïde	Leucémie myéloïde aiguë
Alemtuzumab (MabCampath®)	CD52	Lymphocytes B et T	Leucémie lymphatique chronique
Cétuximab (Erbix®)	EGFR-1	Différents tissus, notamment la peau	Cancer du côlon Tumeurs ORL
Bévacizumab (Avastin®)	VEGF	Cellules endothéliales	Cancer du côlon Hypertension (carcinome du rein) ¹ Cancer du sein ¹ Carcinome bronchique non à petites cellules ¹

reprise de la progression de la maladie et, dans certaines situations, de prolonger la survie par rapport aux monothérapies respectives (Fauvel et Yasri, 2014). L'immunochimiothérapie apporte couramment des cures efficaces aux patients souffrant de lymphomes agressifs à cellules B, cependant l'apparition de cas de résistance pose des problèmes à ce genre de thérapie (Aung et al., 2011).

Dans le cas des anticorps conjugués, la toxine ou le radionucléotide conjugués choisis sont d'une importance décisive. La localisation et l'expression de l'antigène cible sont également essentielles et conditionnent l'efficacité du traitement.

Le CD20 est une phosphoprotéine membranaire exprimée avec une forte densité à la surface des lymphocytes B matures et des lymphocytes pré-B normaux et malins. Le CD20 ne se retrouve en revanche pas sur les plasmocytes matures producteurs d'anticorps. Cette protéine joue un rôle dans l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B. En fonction de leur cellule souche. Plus de 90% des lymphomes non hodgkiniens à cellules B expriment le CD20.

Le rituximab (Mabthera®) est un anticorps monoclonal non conjugué chimérique dirigé contre le CD20 et constitue le traitement des formes aussi bien indolentes qu'agressives de lymphomes. Dans les lymphomes folliculaires, le rituximab s'est avéré efficace aussi bien dans le traitement de première ligne que dans les récurrences (Kaminski et al., 2005). Chez les patients souffrant d'un lymphome folliculaire non traité, on constate des taux

de réponse atteignant 70%, dont 30% de rémissions complètes. Chez les patients déjà traités préalablement, on décrit des taux de réponse de l'ordre de 50% avec une durée de rémission allant jusqu'à douze mois (Maloney et al., 1997). Des effets synergiques ont été documentés dans les associations avec des cytostatiques, et de nombreuses études ont mis en évidence une amélioration très nette des taux de réponse et des durées de rémission grâce à l'immuno-chimiothérapie combinée avec le rituximab (Ghielmini et al., 2004).

Dans les lymphomes agressifs, il a été trouvé pour la première fois depuis l'introduction des chimiothérapies combinées (endoxan, adriablastine, vincristine et prednisone), en 1972, une amélioration de la survie globale par l'association avec le rituximab.

Bien que le rituximab s'accompagne d'une déplétion des cellules B (malignes et saines), le traitement est dans l'ensemble bien toléré, et on n'observe que peu d'infections cliniquement manifestes, même lors des traitements de longue durée. Le tositumomab et l'ibritumomab sont également des anticorps dirigés contre le CD20 et conjugués avec des radioisotopes, ce qui

permet une irradiation ciblée des cellules tumorales (radioimmunothérapie). L'yttrium-90 (ibritumomab, tiuxétan, Zevalin®), qui émet un rayonnement bêta dont la demi-vie est de 64 heures et qui est fixé sur l'ibritumomab, un anticorps monoclonal murin pur, permet d'obtenir de meilleurs taux de réponse chez les patients atteints d'un lymphome CD20-positif (80 vs 56%) par rapport aux anticorps non conjugués. La fixation de l'iode 131 à l'anticorps anti-CD20 murin, le tositumomab (131-I-tositumomab, Bexxar®), constitue un autre axe de développement. La réponse est comparable à celle obtenue avec Zevalin® (Bonner et al., 2006).

Les principaux inconvénients des substances marquées à l'iode radioactif sont leur demi-vie plus longue, puisqu'elle est d'environ huit jours. Vu la profondeur de pénétration des rayons bêta émis par (Zevalin®) qui est l'ibritumomabtiuxétan les cellules tumorales antigène-négatives se trouvant à proximité des anticorps fixés à la tumeur sont également exposées aux radiations. Ceci peut être un avantage dans les tumeurs hétérogènes ou les tumeurs volumineuses mal vascularisées. Il va sans dire que des cellules non malignes situées au voisinage sont elles aussi soumises au rayonnement radioactif. Le principal effet indésirable est par conséquent la myélotoxicité, raison pour laquelle le traitement d'un lymphome par radioimmunothérapie CD20+ est contre-indiqué en cas d'infiltration médullaire supérieure à 25% (Kaminski et al., 2005).

Anti CD33

Le CD33 est exprimé à la surface des cellules blastiques leucémiques et des cellules normales immatures de la lignée myéloïde. La fonction du CD33 n'est pas bien connue.

Le gemtuzumab ozogamizine (Mylotarg®) est un anticorps recombinant humanisé, conjugué à un cytostatique (calichéamicine), dont l'objectif est la destruction des cellules CD33-positives.

Le gemtuzumab est utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë récidivante. Une rémission complète est obtenue dans 30% des cas. Comme certaines cellules souches hématopoïétiques saines expriment également le CD33, le traitement induit une myélo-suppression sévère.

Tableau 3c : Anticorps monoclonaux et leurs cibles en immunothérapie anticancéreuse.

Drug	Use	Mechanism
Alemtuzumab	B-cell Leukemia	Targets CD52 on lymphocytes
Rituximab	Non-Hodgkins Lymphoma Chronic Lymphocytic Leukemia	Targets CD20 on B-lymphocytes
Trastuzumab	Breast Cancer	Targets HER2/neu Receptor
Nimotuzumab	Squamous Cell Carcinoma	EGFR Inhibitor
Cetuximab	Squamous Cell Carcinoma Colorectal Carcinoma	EGFR Inhibitor
Bevacizumab	Anti-Angiogenic Therapy	Inhibits VEGF
Bavituximab	Cancer, Viral Infections	Targets Phosphatidylserine

Certains patients, 15% environ, présentent une augmentation des tests hépatiques et des cas de maladie veino-occlusive du foie (VOD – veno-occlusive liver disease). Comme avec tous les anticorps recombinants, on peut être confronté à des effets indésirables

dus à la perfusion, en particulier des états fébriles, des frissons, une hypotension et/ou des arthralgies.

Anti CD52

Le CD52 est exprimé aussi bien sur les lymphocytes T que sur les lymphocytes B. On le trouve avec une densité particulièrement élevée sur les cellules matures de la leucémie lymphatique chronique. La fonction du CD52 n'est pas connue. L'alemtuzumab (Mabcampath®) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le CD52. Sa fixation au CD52 déclenche une réaction cytotoxique passant à la fois par le complément et par la voie cellulaire.

L'alemtuzumab est approuvé pour le traitement de la leucémie lymphatique chronique récidivante après thérapie préalable par la fludarabine (Bonner et al, 2006). D'autres travaux ont trouvé un intervalle libre avant la reprise de la progression tumorale allant jusqu'à 9,5 mois.

L'alemtuzumab est aussi efficace dans la forme rare de leucémie à pro-lymphocytes T, dans les lymphomes cutanés à cellules T et dans le mycosis fungoïde. Plusieurs essais cliniques testent à l'heure actuelle les effets de l'alemtuzumab en combinaison avec la chimiothérapie dans les lymphomes périphériques à cellules T.

Parmi les effets indésirables les réactions allergiques, les états fébriles, les urticaires ou les troubles psychiatriques, ainsi que la suppression médullaire avec lymphopénie et risque accru d'infections par des germes opportunistes. La déplétion en cellules TCD4+ peut durer des mois, ce qui entraîne en particulier une augmentation du risque de réactivation d'un CMV. Il existe aussi un risque augmenté d'infections à *Pneumocystis irovecii*, aux virus de l'herpès et à *Aspergillus*. C'est la raison pour laquelle un contrôle étroit des patients et l'usage préventif d'agents anti-infectieux sont indiqués (triméthoprime/sulfaméthoxazol plus un antiherpétique, comme le famciclovir 250 mg par exemple).

Rituximab

Rituximab is a chimeric monoclonal antibody used in the treatment of lymphomas, leukemias, transplant rejection and autoimmune disorders. It trades under the names Rituxan and MabThera, among others.

Rituximab binds to **CD20** — a protein expressed on B cells. This causes downregulation of B cell receptors, apoptosis induction in CD20+ cells, while mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC).

Medical Uses

Rituximab destroys both healthy and malignant B cells, and is therefore used to treat conditions characterised by too many B cells, overactive B cells or dysfunctional B cells.

General Points

Rituximab has been FDA-approved alongside methotrexate to reduce symptoms in moderate-to-severe rheumatoid arthritis.

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) — a condition caused through activation of the JC virus — has occurred in some patients taking rituximab.

Rituximab is delivered via IV as an infusion. It is usually pre-medicated with acetaminophen, an antihistamine or methylprednisolone.

Adverse Effects

Infusion Reactions
Cardiac Arrest
Hep B Reactivation
Immune Toxicity
Nausea, Vomiting
Fever, Chills, Headache

[@PharmaFactz](#)

Figure 18 : Le rituximab et ses propriétés.

Anti HER-2/neu/EGFR-2

L'antigène HER-2/neu est un récepteur transmembranaire de divers facteurs de croissance qui est exprimé dans différents tissus, notamment le myocarde. 25 à 35% des cancers du sein s'accompagnent d'une surexpression du HER-2/neu, surexpression qui est associée à une croissance tumorale agressive et à un pronostic défavorable. Le trastuzumab (Herceptin®) est un anticorps monoclonal humanisé, qui bloque d'une part la transduction de signaux vers le noyau, inhibant ainsi l'activité du gène, et qui régule d'autre part le récepteur HER-2 vers le bas.

La condition nécessaire à l'utilisation clinique de l'Herceptin est la mise en évidence par l'immuno-histochimie d'une expression accrue du HER-2/ neu à la surface des cellules tumorales (grade III) (Slamon et al., 2001).

En cas d'expression intermédiaire (grade II à l'examen immuno-histochimique), on effectue en plus une analyse FISH pour rechercher une amplification du gène. Le status HER-2/neu qui a une valeur pronostique dans le cancer du sein est aussi par sa surexpression un facteur prédictif de la réponse au traitement par Herceptin® (Piccart-Gebhart et al., 2006).

Son efficacité dans le cancer mammaire métastatique a été démontrée par plusieurs essais de phases III, tant en monothérapie que dans le cadre d'un traitement adjuvant en

combinaison avec des cytostatiques, tels que la vinorelbine (Navelbine®), le paclitaxel (Taxol®) et le docétaxel (Taxotere®).

Combiné à l'une des chimiothérapies mentionnées précédemment, Herceptin® améliore les taux de réponse et prolonge la durée des rémissions par rapport à la chimiothérapie seule. Le traitement combiné est clairement supérieur à la chimiothérapie seule et à la monothérapie d'Herceptin®) (Slamon et al., 2001).

Les effets indésirables aigus d'Herceptin® incluent de possibles réactions aux perfusions, par exemple état fébrile et frissons. Comme le récepteur HER-2/neu est également exprimé sur les cellules du myocarde, la toxicité cardiaque constitue un effet indésirable potentiel sérieux de ce médicament. L'incidence de l'insuffisance cardiaque sous monothérapie d'Herceptin® est de l'ordre de 1,4%. Une dysfonction cardiaque symptomatique ou asymptomatique en association avec le paclitaxel (Taxol®) s'observe chez 13% des sujets. Ce chiffre passe à 27% dans les associations avec les anthracyclines. La combinaison des anthracyclines cardiotoxiques avec Herceptin® est par conséquent contre-indiquée. La cardiotoxicité induite par Herceptin® est toutefois en général réversible après l'arrêt du médicament (Piccart-Gebhart et al., 2006).

Anti EGFR-1

L'EGFR-1 appartient à la famille des récepteurs des facteurs de croissance

HER. Ce récepteur, exprimé dans différents tissus, notamment la peau et les muqueuses, joue un rôle central dans la régulation de la croissance et de la différenciation. De nombreuses tumeurs épithéliales sont caractérisées par un renforcement du signal EGFR, qui est partiellement responsable de la croissance tumorale.

Le cétuximab (Erbix®) est un anticorps monoclonal chimérique contre la partie extracellulaire du récepteur EGFR. Les tumeurs de la région ORL, les cancers du côlon et du rectum, ainsi que les cancers bronchiques non à petites cellules sont caractérisés par une expression relativement forte de l'EGFR.

Dans le cancer métastatique du côlon déjà prétraité, le cétuximab en monothérapie n'est efficace que dans une mesure limitée, avec un taux de réponse de l'ordre de 10%. La combinaison avec une chimiothérapie incluant de l'irinotécan est plus efficace: on a ainsi obtenu, chez des patients atteints d'un cancer métastatique du côlon, des taux de réponse supérieurs à 20% (Cunningham et al., 2004). L'association

irinotécan/cétuximab est aussi partiellement efficace après l'échec d'un traitement d'irinotécan seul.

Il a été récemment montré que le kétuximab améliore l'efficacité de la radiothérapie dans les tumeurs ORL à extension locale. La survie médiane a pu être prolongée de 29 à 49 mois (Bonner et al, 2006).

Les troubles cutanés acnéiformes les diarrhées et l'asthénie constituent des effets secondaires indésirables. La toxicité cutanée et muqueuse s'explique bien par la forte expression de l'EGFR dans ces tissus. Plusieurs études ont montré que l'importance de la toxicité cutanée est corrélée avec les résultats thérapeutiques.

D'autres anticorps monoclonaux inhibiteurs de l'EGF (ABX-EGF, panitumumab) sont entièrement humanisés. Les effets de ces anticorps dans le traitement de première ligne du cancer métastatique du côlon ont fait l'objet d'essais de phase III.

Anti VEGF

Les VEGFR-1 et 2 sont également des récepteurs trans-membranaires de la tyrosine kinase, principalement

exprimés à la surface des cellules endothéliales. Le VEGF lie les VEGFR-1/2/3 avec une forte affinité. Le VEGF est un facteur important de l'angiogenèse tumorale. Le bécavizumab (Avastin ®) est un anticorps monoclonal recombinant humanisé, neutralisant le VEGF et conduisant à une inhibition de la néoformation vasculaire. Plusieurs essais précliniques ont par ailleurs montré qu'il a non seulement un effet anti-angiogénique direct, mais encore qu'il améliore la distribution locale des substances chimiothérapeutiques en lésant la vascularisation tumorale, et qu'il réduit la pression interstitielle qui est normalement élevée dans le tissu tumoral.

Le premier essai de phase III ayant démontré l'efficacité de l'inhibition de l'angiogenèse dans le cancer colorectal a été publié en 2004 par Hurwitz et al., 2004 . Les auteurs ont pu montrer, chez plus de 800 patients, que le bécavizumab (5 mg/kg tous les 14 jours) en adjuvant à la chimiothérapie (irinotécan/5-fluorouracil/leucovorine) entraîne, chez les patients avec un cancer du côlon métastatique, une amélioration significative des taux de réponse (44,8 versus 34,8%, $p = 0,004$), ainsi qu'un allongement de l'intervalle libre sans progression de la maladie et de la survie (10,6 versus 6,2 mois, $p < 0,001$ et 20,3 versus 15,6 mois, $p < 0,001$). D'autres essais sont effectués avec d'autres combinaisons chimiothérapeutiques dans le cancer du côlon, par exemple FOLFOX

(oxaliplatine, leucovorine, 5-fluorouracil) en association avec Avastin®. En résumé, toutes les études de phase III sur le cancer colorectal métastatique ont trouvé que le bévacizumab, en combinaison avec la chimiothérapie, améliore le taux de réponse et prolonge la survie sans progression de la maladie.

L'angiogénèse est une étape essentielle dans le développement de la plupart des tumeurs solides.

Comme on pouvait s'y attendre, le traitement au bévacizumab paraît être efficace dans divers types de carcinomes. Au stade métastatique du cancer bronchique non à petites cellules, le bévacizumab, combiné à une chimiothérapie carboplatine/ paclitaxel, prolonge la survie moyenne d'environ deux mois par rapport à la chimiothérapie seule (Sandler et al., 2006). Les patients souffrant de carcinomes épidermoïdes ou présentant des métastases cérébrales avaient été exclus de cette étude en raison de l'augmentation du risque hémorragique.

Le bévacizumab semble aussi efficace dans des tumeurs rares, réputées jusqu'ici difficiles à traiter, telles que les glioblastomes. Dans un essai de phase II sur le glioblastome récidivant (grade IV selon l'OMS) et le gliome (grade III), l'association bévacizumab plus irinotécan a induit un taux de réponse de 63% après l'échec d'une à deux chimiothérapies. 30% des patients avec un glioblastome et 56% de ceux avec un gliome de grade III ne présentaient aucun signe de progression à six mois (Vredenburgh et al., 2007).

Parmi les effets indésirables les plus fréquents, sont rapportés des cas d'hypertension artérielle et de protéinurie, une tendance augmentée aux saignements, ainsi que des troubles de la cicatrisation des plaies et des accidents thromboemboliques. Il y a aussi un risque légèrement augmenté de perforation gastro-intestinale. Le RPLS (syndrome de l'encéphalopathie postérieure réversible) représente un effet indésirable extrêmement rare qui est caractérisé par des céphalées, une léthargie et une cécité ou d'autres troubles neurologiques et visuels.

Compte tenu de la discrète augmentation du risque de troubles de la cicatrisation, on recommande de reporter toute chirurgie électorale majeure à environ un mois après le dernier cycle de traitement de bévacizumab (Vredenburgh et al., 2007).

CHAPITRE II : LA PROPOLIS

II-1- ORIGINE ET UTILISATION DE LA PROPOLIS

La PROPOLIS désigne des substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance plus ou moins dure selon le niveau de la température. Elles sont recueillies par les abeilles (*Apis mellifera*), sur les bourgeons, les feuilles, les fleurs les écorces de végétaux (arbres principalement) et à partir de leurs exsudats. Ramenées à la ruche, les abeilles additionnent et modifient ces substances par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) pour constituer la propolis proprement dite (Kosalec et al., 2004; Hegazi et al., 2002). La couleur de la propolis est variable en relation avec la composition et la phénologie de la végétation visitée par les abeilles. Elle peut varier du jaune au vert comme elle peut être rougeâtre ou marron brune (Banskota et al., 2002). Son odeur est intense et aromatique (Pietta et al., 2002). Pour les abeilles la propolis sert à protection contre les parasites et les agents microbiens susceptibles d'infester la ruche. Elle tapisse les alvéoles des rayons avant qu'elles ne reçoivent la ponte le pollen ou le nectar. Elle est aussi répandue sur les cadres et les diverses parties des structures de la ruche pour en assurer la protection (scellage) et l'étanchéité. De nos jours, la propolis est un des sous-produits de l'apiculture. Cette substance est connue pour ses diverses propriétés thérapeutiques depuis l'antiquité (Marcucci, 1995).

Au cours du 1er siècle av J.-C., le célèbre savant latin Varron en fait état dans ses travaux ainsi que le poète Virgile dans ses écrits. Au début de notre premier millénaire, les Romains Pline et Dioscoride entretiennent une polémique quant à son origine, le premier écrivait par ailleurs à son sujet :

« Elle retire les aiguillons et ce qui est entré dans la chair, elle réduit les enflures et ramollit les durcissements de la peau. Elle diminue les douleurs nerveuses, guérit les ulcères, abcès, furoncles, souvent incurables ».

Au deuxième siècle, le médecin Galien en fait mention dans ses traités, avant le philosophe et médecin Avicenne, qui au onzième siècle note à son propos: «Elle a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et les épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement ». Connue des Incas chez lesquels elle était utilisée contre les infections fébriles, la propolis est retrouvée également dans les livres de Médecine de Géorgie à partir du douzième siècle où elle entre dans la préparation de nombreux

remèdes. En France, quelques traces de son usage sont retrouvées dans le traitement des plaies aux 18^e et 19^e siècles, et connaît son apogée d'utilisation, dans le cadre de ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes, du fait des excellents résultats qu'elle procure. Son utilisation, sans avoir été permanente, s'est maintenue au fil des siècles. Elle est à nouveau « redécouverte » de façon relativement récente par de nombreux chercheurs qui s'attachent et s'efforcent progressivement, depuis quelques années, d'expérimenter scientifiquement l'ensemble des données empiriques de ce produit. La propolis a récemment regagné beaucoup d'intérêt en Europe, aux Etats Unis, au Brésil et en Asie notamment au Taiwan. Elle est utilisée comme additif nutritionnel et comme produit de diététique et de médecine verte. Elle est aussi connue pour ses intéressantes propriétés assurant le bien être physique et la prévention des maladies graves telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires (Akao et al., 2003; Chen et al., 2004). Ainsi, de nombreuses

recherches et expérimentations qui sont effectuées à ce jour, et qui sont poursuivies très activement permettent de connaître les éléments essentiels suivants :

- la propolis administrée chez l'animal par voie digestive (chiens, rats, cobayes) à très fortes doses n'entraîne aucun effet toxique ou trouble pathologique notable, même à long terme (absorption continue pendant plusieurs mois),
- la propolis est, en règle générale, parfaitement bien tolérée chez l'homme, et son usage selon les modalités et les doses préconisées n'entraîne, sauf exception rarissime, aucun incident ou effet secondaire grave,
- la propolis ne présente pas de propriétés oncogènes chez l'animal, au contraire, elle possède même, des propriétés oncolytiques.
- aucune publication ne mentionne d'actions tératogènes dues à la propolis, D'autre part, la vérification d'un certain nombre de propriétés fort intéressantes, qui sont venues, pour la plupart, expliquer et confirmer les nombreuses données que l'observation empirique nous avait léguées, à savoir :

Les propriétés à la fois bactériostatiques et bactéricides importantes sur de nombreuses souches microbiennes, en particulier sur *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* et *Escherichia coli* (Marcucci, 1995). La propolis possède aussi des propriétés fongicides, anesthésiques anti-inflammatoires, cicatrisantes immuno-stimulantes et antirhumatismales notables (Orsolich et al., 2003; Almeida et al., 2002).

D'autre part la propolis a des propriétés anti-oxydantes qui trouvent des applications intéressantes dans l'industrie alimentaire et cosmétique, en médecine et en biologie (Akao et al., 2003; Chen et al., 2004).

La propolis est un phyto-inhibiteur, de nombreuses expériences ont montré ses actions inhibitrices sur la germination de certains végétaux et tout spécialement sur la laitue et la pomme de terre.

Actuellement, un certain mouvement commercial aurait tendance à faire de la propolis (un peu comme pour la gelée royale à une certaine époque) un remède prétendu universel contre tous les maux. En effet, on assiste à l'étalage par les industries des pharmaceutiques et de diététique, d'une large gamme de produits à base de propolis.

C'est certainement, là encore, le plus mauvais service que l'on puisse rendre à ce produit (riche par ailleurs d'innombrables et excellentes qualités) et à tous ceux qui sont à même de l'utiliser avec bénéfice dans le cadre d'indications parfaitement établies où les résultats s'avèrent pratiquement sûrs et constants.

Il y a donc lieu d'être très prudent dans l'analyse et l'interprétation des éléments de tous ordres qui nous sont proposés . Il ne faut par conséquent s'appuyer que sur des données solides et objectives permettant de dégager la plus juste appréciation possible des choses. C'est cette réalité que nous tenterons de définir au cours de ce travail de thèse spécialement dédié à la contribution à l'évaluation des propriétés anticancéreuses des extraits de la propolis d'origine marocaine.

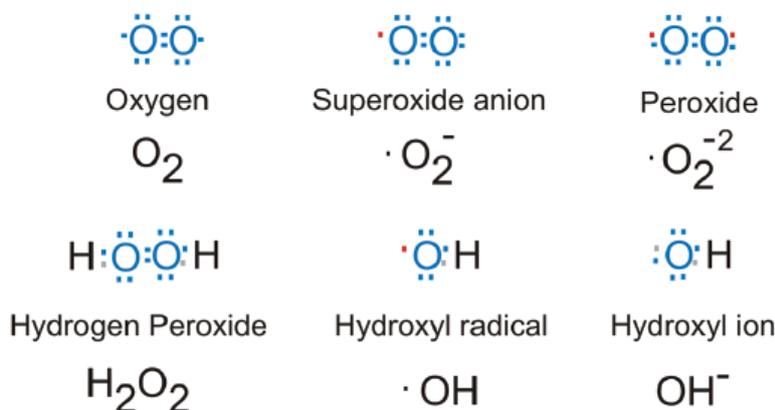


Figure 19: Formules chimiques et structures électroniques des espèces réactives de l'oxygène (ROS). (Le point rouge indique un électron non apparié).

II-2- COMPOSITION CHIMIQUE ET POTENTIEL PHARMACOLOGIQUE

La composition chimique de la propolis est corrélée à la composition de la flore visitée par les abeilles. La propolis brute présente généralement la composition pondérale moyenne suivante : 50% résines et balsame, 30% cire, 10% huiles essentielles et aromatiques, 5% pollen et 5% d'autres substances variées y compris des oligo-éléments minéraux. De 200 à 300 composés chimiques différents sont identifiés dans la propolis (Figures 20,21 et 22). On y retrouve des acides aliphatique, des esters, des acides aromatiques, des acides gras, des aldéhydes, des hydrates de carbone, des acides aminés, des cétones, des chalcones, des dihydrochalcones, des terpenoids, des vitamines, et des minéraux (Marcucci, 1995; Marcucci et al., 1998; De Almeida, 2002). Parmi ces constituants (Tableau 4), des composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et des esters d'acides phénoliques ont été rapportés en tant que constituants principaux de la propolis produite dans les zones tempérées (Marcucci, 1995; Marcucci et al., 1998 ; Popova et al., 2005).

Les composés sont déterminés à l'aide des techniques d'analyse de chromatographie de haute performance en phase liquide et de chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (Popova et al., 2005).

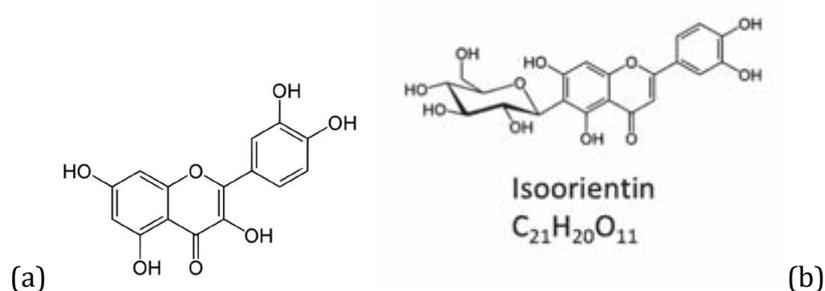


Figure 20 : Structure Chimique du quercetine (a) et de l'isorientine (b).

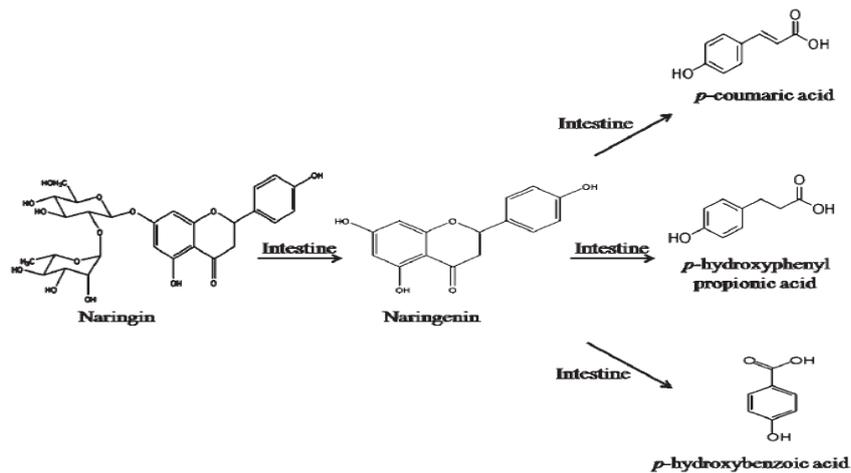


Figure 21 : Le métabolisme du Naringine chez l'homme.

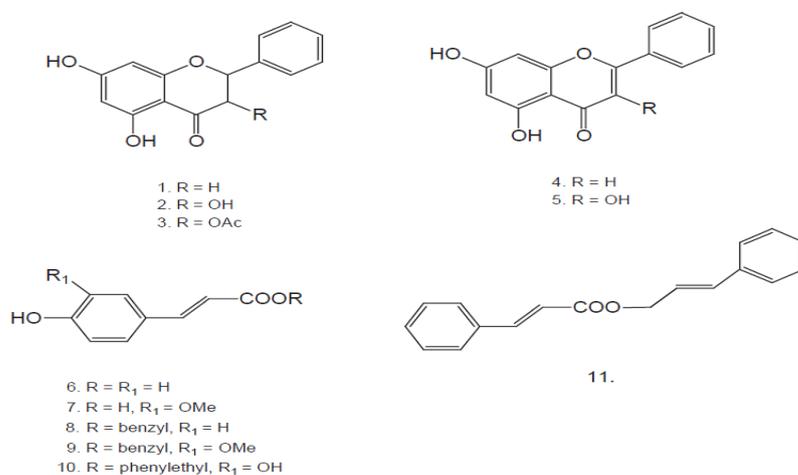
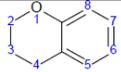
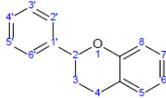
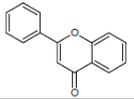
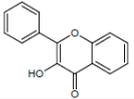
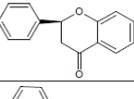
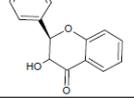
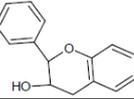
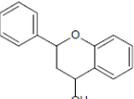
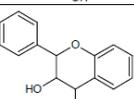
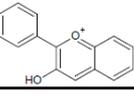


Figure 22: Les constituants chimiques majeurs et habituels de la propolis.

On y trouve les molécules suivantes : (1) pinocembrin, (2) pinobanksin, (3) pinobanksin-3-O-acetate, (4) chrysin, (5) galangin, (6) p-coumarin acid, (7) ferulic acid, (8) benzyl p-coumarate, (9) benzyl ferulate, (10) phenylethyl caffeate, and (11) cinnamyl cinnamate. (Popova et al., 2005)

Tableau 4 : Structures générales et exemples de familles de flavonoides.

		Chromane Ring				
						
		General Structural Formula of Flavonoids (2-Phenylchromane)				
						
Class	Group	C2-C3 Double Bond	3-OH	4-keto	Structural Formula	Example
Anthoxanthins	Flavones	Yes	No	Yes		Apigenin, luteolin.
	Flavonols	Yes	Yes	Yes		Quercetin, kaempferol
Flavanones	/	No	No	Yes		Naringenin
Flavanonols	/	No	Yes	Yes		Taxifolin
Flavans	Flavan-3-ols	No	Yes	No		Catechin and its derivatives.
	Flavan-4-ols	No	No (4-OH instead)	No		Apiforol
	Flavan-3,4-diols	No	Yes (also 4-OH)	No		Leucocyanidin
	Proanthocyanidins	No	Depending on monomers.	No	Figure 3	Dimers and oligomers of flavanols
Anthocyanidins	/	No (aromatic ring)	Yes	No		Cyanidin

Divers solvants tels que l'éthanol, le méthanol, l'éther éthylique, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'eau sont utilisés pour l'extraction des constituants de la propolis. L'éthanol étant le solvant le plus utilisé, mais le choix du solvant ou de la combinaison de solvants est dictée par le degré de polarité recherché en relation avec les composés ou les familles de composés à extraire de la propolis brute. Les préparations pharmaceutiques et cosmétiques utilisent la glycérine, propylène glycol (Marcucci et al., 1998; De Almeida, 2002).

En effet, il a été rapporté que la propolis exerce des effets multiples tels que des effets antibactériens, antifongiques, antiviraux, anti-parasitaires (Marcucci, 1995), anti-inflammatoire, anti-oxydant et des activités anti-cancer (Borrelli et al., 2002; Banskota et al., 2002). Ce produit a également une activité immunomodulatrice (Suzuki et al., 2002), en

particulier par l'activation des macrophages (Orsolich et al., 2003; Almeida et al., 2002). De nombreuses recherches ont montré que les effets thérapeutiques de la propolis sont principalement dus aux flavonoïdes contenus dans cette substance. Ces molécules ont une grande importance thérapeutique de leurs propriétés de régulation du métabolisme cellulaire (Havsteen, 1983).

Il a été montré par exemple que des extraits ethanoliques de propolis ont permis d'accroître significativement l'activité bactéricide des macrophages contre *Salmonella typhimurium* pour des doses variant entre 3 et 100 µg/mL de manière dose dépendante. Cet effet met en jeu le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxyde d'azote (NO), (Orsi et al., 2005).

Certaines expérimentations ont montré que l'effet immunomodulateur par la stimulation de la production d'anticorps est indépendant de la saison et de l'origine géographique de la propolis. L'action de la propolis est le résultat des composés phyto-chimiques synergisant entre eux. Les mêmes composés obtenus séparément à partir des plantes sources de la propolis ne reproduisent pas les effets observés avec les extraits de la propolis (Sforcin et al., 2005).

Les éléments naturels suivants qui sont des constituants de la propolis ont été trouvés pour avoir des effets inhibiteurs sur l'aromatase. Il s'agit de : Apigénine, Catechine, Chalcones, Eriodictyol, Isoliquiritigénine, Mangostine, Myosmine, Nicotine, Resveratrol, Vitamine E, Zinc. (Balunas et al., 2008 ; Kapiszewska et al., 2006. Wang et al., 2006 ; Siler et al., 2004 ; Om and Chung 1996). L'aromatase est localisée dans le réticulum endoplasmique où elle est régulée par des promoteurs spécifiques des tissus qui sont à leur tour contrôlés par les hormones, les cytokines et d'autres facteurs. Elle catalyse les dernières étapes de la biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes (spécifiquement, il transforme l'androstènedione en estrone et de la testostérone en estradiol). Ces étapes comprennent trois hydroxylations successives du groupe 19-méthyle des androgènes, suivies par l'élimination simultanée du groupe de méthyle, comme le formate et l'aromatation de l'anneau-A. L'inhibition de l'aromatase peut provoquer l'hypoestrogénisme (faibles niveaux d'œstrogènes), ce qui est au bénéfice de la lutte contre les types de cancers qui sont œstrogènes dépendants.

CHAPITRE III : L'ARTEMISININE

III-1- ORIGINE DE L'ARTEMISININE

L'Artemisinin, le composé actif de l'espèce *Artemisia annua* L. a été isolé en 1972 par Youyou Tu (Christen et Veuthey, 2001). La structure de cette molécule a été déterminée en 1979 (Figure 23). Cette découverte a été récompensée par l'octroi à son auteur du prix Nobel de physiologie et médecine en 2015. L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique trioxanne. Elle contient un pont endoperoxyde essentiel pour son activité. Le rendement d'extraction de l'artémisinine à partir des plantes du genre *Artemisia* varie entre 0,01% et 0,8% du poids sec (Abdin et al., 2003); (Wang et Tan, 2002). Ce rendement a représenté une sérieuse limitation à la commercialisation de cette molécule. Cependant, des stratégies métaboliques et de génie génétique (Wallaart et al, 1999); (Abdin et al., 2003); (Weathers et al., 2004) ont été développées dans le but d'augmenter la production de l'artémisinine, non seulement dans les cultures de plantes, de cellules ou de tissus, mais aussi dans des plantes transgéniques. En outre, il a été montré récemment que l'acide artémisinique, un précurseur de l'artémisinine, peut être produit et secrété par une levure génétiquement modifiée (Ro et al, 2006).

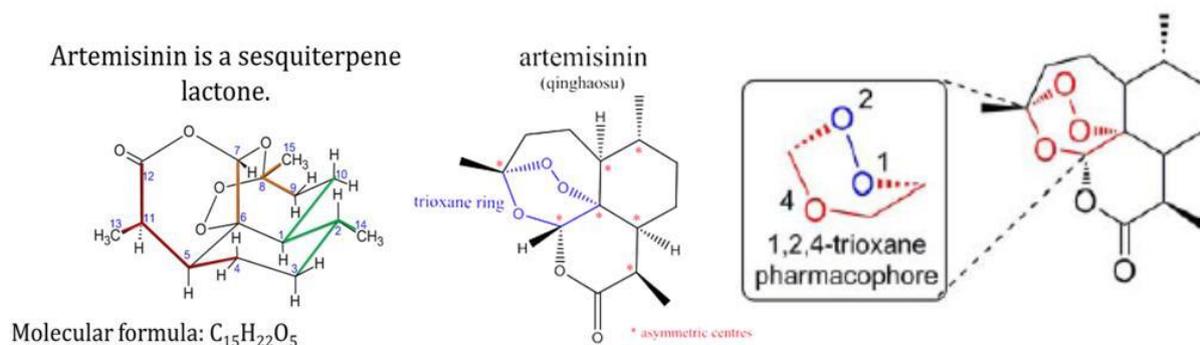


Figure 23 : Structure Moléculaire de l'Artemisinin.

D'autres développements de ces technologies ont été nécessaires afin d'aboutir à un procédé simple et peu coûteux de purification avec des rendements acceptables. L'artémisinine présente une faible solubilité dans l'eau ou dans l'huile, par conséquent, elle ne peut être administrée que par voie orale. Pour résoudre ce problème, plusieurs dérivés semi-synthétiques de l'artémisinine ont été développés (Hampel et al., 2015).

L'artémisinine est connue pour son activité antipaludique puissante, mais de nombreuses études montrent que cette molécule et ses dérivés ont d'autres activités qui leur donnent des intérêts biologiques et médicaux intéressants.

Nous résumons ici les nouveaux aboutissements de la recherche concernant les différentes propriétés pharmacologiques de l'artémisinine, en particulier son activité anticancéreuse potentielle.

1. *Artemisia annua* et artémisinine:

Artemisia annua (qing hao = herbe verte) appartient aux plantes de la classe Magnoliopsida. Le genre *Artemisia* contient environ 400 espèces, y compris les herbes et les arbustes. *Artemisia annua* est un arbuste annuel 50-150 cm de hauteur (Figure 24) Figure 19. La plante pousse dans les régions tempérées, le plus souvent en Chine et au Vietnam. On la retrouve aussi cultivée en Afrique orientale, aux États-Unis, au Brésil, en Inde, en Russie et dans certains autres pays (Bhakuni et al., 1988), (Bhakuni et al., 1990).



Figure 24 : Image d'*Artemisia annua*, plante.

Artemisia annua a été décrite par différents auteurs depuis l'an 168 av. J.-C. (Efferth, 2007). Pendant la guerre du Vietnam (1965-1975), le gouvernement chinois a lancé un programme de recherche pour étudier un remède traditionnel chinois à partir de

plantes pour aider l'armée vietnamienne contre le paludisme. En conséquence, l'artémisinine (qinghaosu) a été découverte en 1972 en tant que composé actif d'*Artemisia annua* contre le paludisme. Elle a depuis constitué le médicament antipaludique couramment utilisé contre les souches de *Plasmodium* résistantes et contre le paludisme chez l'enfant. En plus du traitement du paludisme, l'artémisinine est également décrite pour le traitement du *Pneumocystis carinii* et du *Toxoplasma gondii* (Efferth, 2007).

III-2- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE L'ARTEMISININE

Le mécanisme d'action exact de l'artémisinine n'est encore pas bien élucidé. Cependant, de nombreux mécanismes ont été proposés: Interférence avec le calcium sarcoplasmique/ endoplasmique-ATP-ase, l'interférence avec le transport mitochondrial d'électrons, la production d'espèces réactives, effet sur les fonctions du système immunitaire et l'effet sur l'angiogenèse (Golenser et al., 2006). Contre *Plasmodium*, il a été postulé que l'hème libéré par parasite lors de la digestion de l'hémoglobine réagit avec le pont endoperoxyde de l'artémisinine, cela entraînerait la rupture des liaisons de l'oxygène et provoquerait la production de radicaux libres qui endommageraient le parasite (Pandey et al., 1999). En outre, il a été signalé que l'artémisinine réagit avec le fer pour former des radicaux libres qui peuvent tuer les cellules. Ce processus est considéré comme pouvant être impliqué dans l'effet antitumoral de l'artémisinine. En effet, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'effet cytotoxique de l'artémisinine que les cellules normales en raison de leur capacité d'absorption et leur exigence en grandes quantités de fer. En effet les cellules cancéreuses expriment une forte concentration de récepteurs de la transferrine à leur surface. Cela facilite l'internalisation de la protéine transferrine vers le cytoplasme. Par conséquent l'artémisinine est récupérée de manière sélective et concentrée par les cellules cancéreuses du fait de l'affinité qui se crée avec la transferrine (Lai et al., 1995 ; Lai et al., 2005).

II-2.1 L'activité antipaludique

En 1972, le principe actif de Qinghao, *Artemisia annua* a été identifié et est depuis appelé artémisinine, (Klayman, 1985). Seules deux catégories d'anti-paludéens sont utilisées

pour traiter efficacement le paludisme aigu. Les alcaloïdes de quinquina et l'artémisinine (Dobson, 1998).

Les artémisinines ont une grande efficacité contre les stades sanguins de *Plasmodium*, y compris les stades les plus jeunes (formes cycliques) (Figure 25). Elles ont été reconnues pour réduire le nombre de gamétocytes dans le sang (Kombila et al, 1997 ; Terkuile et al., 1993; Kumar et Zheng, 1990), en raison de leur activité contre les deux précurseurs des stades sexués et gamétocytes précoce (stade I-III). Cette molécule diminue également l'infectivité des gamétocytes survivants (Chen et al., 1994; Targett et al., 2001).

La résistance du parasite à la majorité des médicaments antipaludiques en cours d'utilisation est le problème le plus critique limitant actuellement le traitement du paludisme. Contre la classe artémisinine de médicaments antipaludiques, le parasite ne présentait pas de résistance. Ces médicaments ont aussi été efficaces contre les souches multirésistantes de *Plasmodium falciparum*. Cependant, des mutations dans des gènes associés à la multi-résistance aux médicaments se sont révélés modifier la sensibilité de certaines souches à l'artémisinine (Woodrow et al., 2005).

III-2-2-Effet Anti-viral

Les scientifiques chinois ont rapporté que l'artémisinine pourrait avoir une activité antivirale (Gelb, 2007). Plusieurs études scientifiques *in vitro* ont rapporté que l'artémisinine réduit les taux de répllication des virus de l'hépatite B et C, (Hunt et al., 2007), de certains virus de l'herpès humain (Afonso et al., 2006), du VIH-1 (Puri et Chandra, 2006), du virus de la grippe A (Efferth et al., 2002; Qian et al, 1982) et du virus de la diarrhée bovine virale (Walker et al, 2000).

L'artémisinine est inactif contre l'herpèsvirus humain 6A (Naesens et al., 2006) et a une faible activité contre le cytomégalovirus humain. L'artésunate, une molécule semisynthétique, présente un grand potentiel anti-herpétique (Nagamune et al., 2007).

Comme traitement adjuvant, l'artémisinine pourrait avoir une activité antivirale synergique prononcée sans affecter les cellules hôtes. Ainsi, Paeshuyse et al. (Paeshuyse et al., 2006) ont montré que l'artémisinine a inhibé la replication du réplicon du cytomegalovirus d'une manière dose dépendante. L'Hémine qui est un donneur de fer, inhibe la répllication du réplicon du cytomégalovirus par inhibition de la polymérase virale (Fillebeen et al., 2005). Le traitement par la combinaison de l'artémisinine et de l'hémine pourrait avoir un effet antiviral synergique selon le même auteur.

III-2-3-Effets anti-bactériens :

De nombreuses études ont rapporté que les extraits d'*Artemisia annua* L. ont des activités antibactériennes contre divers agents pathogènes, y compris *Bacillus subtilis*, *Candida krusei*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Les extraits d'*Artemisia annua* L., à l'éthanol et à l'acétone contenant l'artémisinine, ont été efficace contre les maladies parodontales bactériennes (Kim et al., 2015). En outre, des essais d'antibiogramme par diffusion n'ont montré aucun effet antibactérien de l'artémisinine à la dose de 177,10 nM, (diamètres d'inhibition étaient de 6-9 mm) sur des souches de *Salmonella spp* d'origine aviaire (*Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*), (Slade et al., 2009). D'autres études ont montré que l'artémisinine a un effet antibactérien sur des souches de *Salmonella spp* de différentes origines et sur *E. coli* et *Proteus vulgaris* à 1 mg / L (Dhingra et al., 2000).

III-2-4-Effet Antihelminthique

A part l'Artemisinin, les espèces du genre *Artemisia* contiennent des lactones sesquiterpènes et des flavonoïdes à activité antihelminthique avec un très faible effet sur les cellules normales (Kerboeuf et al., 2008). L'artémisinine et les extraits de *Artemisia annua* utilisés comme adjuvants des anthelminthiques commerciaux, améliorent l'hématocrite et le bien-être des ovins infectés par des helminthes. (Cala et al., 2014).

III-2-5-Effet antifongique

L'activité antifongique modérée de l'artémisinine contre *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani* et *Fusarium oxysporum* a été rapporté (Algamal et al., 2013). Le même résultat a été montré par Galal et al. L'artémisinine est testée contre *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (Galal et al., 2005).

Cependant, l'activité fongicide contre les champignons phyto-pathogènes *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* a été montré. En outre, l'artémisinine a été décrite pour présenter certaines propriétés antifongiques *in vitro* contre *Pneumocystis carinii* (Merali et Meshnick, 1991; Ni et Chen, 2001).

III-2-6-Propriétés Anti-inflammatoires

L'activité anti-inflammatoire de l'artémisinine n'est pas largement décrite.

Cependant, l'inhibition par l'artémisinine de la libération de l'interleukine IL-6 a été démontrée dans une étude récente (Yu et al., 2012). Les mêmes auteurs ont montré que la dihydro-artémisinine, un dérivé de l'artémisinine, inhibait significativement la

libération du TNF-alpha induite par les LPS, de l'interleukine IL-6 et de NO par la lignée de cellules macrophage-like murines RAW264.7 chez les souris avec des concentrations de 12,5 à 100 mM, avec une évolution dose dépendante. La régulation négative de la protéine iNOS serait selon les mêmes auteurs à l'origine de ces actions.

2-7- Les propriétés anti-tumorales

Une importante activité antitumorale de l'artémisinine a récemment été documentée. Cela suggère que l'artémisinine, couramment utilisée comme médicament antipaludéen, peut être utile dans la prévention et le traitement du cancer. Il est un médicament relativement sûr, avec la pharmacocinétique connue et des études pharmacodynamiques.

Effets antitumoraux *in vitro*

Les travaux *in vitro* concernant les effets de l'artémisinine sur les cellules de carcinome hépatocellulaire humain, ont montré que l'artémisinine à diverses concentrations, inhibe de manière significative la croissance et la formation de colonies par la voie d'induction de l'apoptose (Deng et al., 2013). De même, cette molécule inhibe la croissance et la viabilité des lignées de cellules cancéreuses humaines de l'ovaire (SK-OV-3 et OVCAR-432) après leur exposition à la dose de 20 µmol/L pendant 24 ou 48 heures, (Jiao et al., 2007). En outre, il a été rapporté que l'artémisinine possède une activité anti-cancéreuse contre la leucémie, le cancer du sein, du poumon, de la prostate, du côlon et d'autres types de cellules cancéreuses. L'Artémisinine semble cependant être moins active sur les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) (Buommino et al., 2009).

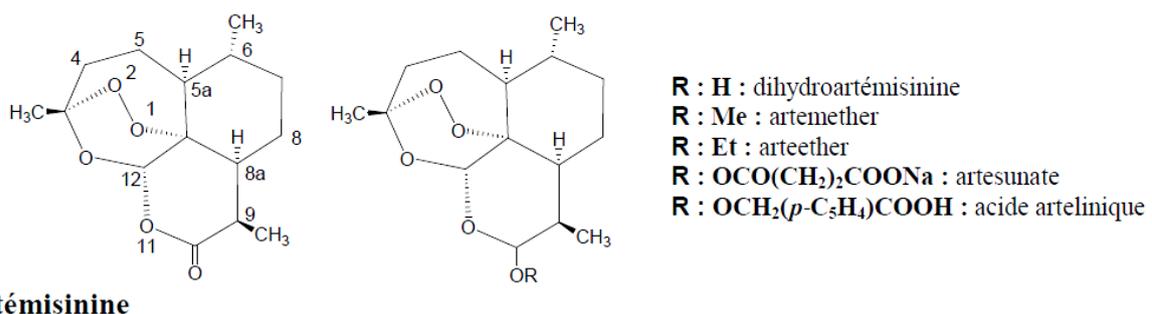


Figure 25 : La molécule artemisinine et ses dérivés.

La réaction de l'artémisinine avec le fer a attiré l'attention d'une équipe de chercheurs de l'université de Washington, à Seattle. Les cellules cancéreuses, tout comme le font les parasites du paludisme, recueillent et stockent le fer dont elles ont besoin pour se reproduire et se diviser. Cela a pour conséquence que les cellules cancéreuses ont une

concentration en fer beaucoup plus élevée que des cellules normales. (Efferth et al., 2004).

Chen et al 2004, ont montré que l'artésunate un dérivé d'artémisinine, à un pouvoir de lutter contre l'angiogenèse tumorale par inhibition de la liaison du VEGF à son récepteur et diminution de l'expression du VEGF et de son récepteur. Le VEGF produit par les cellules néoplasiques étant un facteur angiogénique fortement impliqué dans la néovascularisation de la tumeur, la dihydroartémisinine possède donc un effet antiprolifératif sur les cellules endothéliales et cancéreuses. De même Efferth, 2005, a montré l'effet antiprolifératif sur certaines lignées de cellules cancéreuses, avec des dérivés de l'artémisinine particulièrement actifs contre la leucémie et le cancer du colon, intermédiaires dans les cancers du sein, de l'ovaire, de la prostate et du rein ainsi que les mélanomes et faibles dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (Efferth, 2005). De le même sens, Efferth et al., 2004 ont indiqué que l'artémisinine est responsable de l'induction d'un stress oxydatif en présence de fer avec production de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives auxquels les cellules cancéreuses sont sensibles (Efferth et al., 2004).

Enfin, une des caractéristiques marquantes de l'artémisinine est l'absence de résistance croisée du *Plasmodium* avec les autres antipaludéens ce qui nourrit des espoirs dans le traitement des cancers multi-résistants.

III-3- REACTIVITE ET MODE D'ACTION DE L'ARTEMISININE

a) *Bio-activation dans les parasites*

Lorsque le *Plasmodium* sous forme de mérozoïte pénètre à l'intérieur du globule rouge, il baigne dans l'hémoglobine qu'il utilise pour assurer sa propre croissance.

Le parasite ingère l'hémoglobine par une structure appelée cytotome et l'introduit dans sa vacuole à pH acide. Par ses hydrolases, dont la plasmepsine II, le parasite décompose l'hémoglobine en globine qui apporte des acides aminés, et en hème qui apporte le fer et qui est transformé en hémozoïne par une hème-polymérase. (O'Neill et al., 2010)

Le mécanisme d'action des antimalariques à effet intra-érythrocytaire comme la chloroquine, la quinine, l'amodiaquine, la méfloquine, l'halofantrine et l'artémisinine, reste mal élucidé. Ces antimalariques traversent la membrane du globule rouge puis celle du *Plasmodium* et pénètrent dans la vacuole où ils s'accumulent. Des hypothèses

parfois contradictoires ont été avancées pour expliquer leur effet toxique sur le Plasmodium : inhibition de l'hème polymérase qui transforme l'hème toxique pour le parasite en hémozoïne atoxique, formation d'un complexe de type artemisinine-hème, élévation du pH intravacuolaire et diminution de la disponibilité du fer à partir de l'hème (O'Neill et al., 2010).

b) Model de la scission réductrice de l'époxyde

Les peroxydes antipaludiques tels que celui produit par l'artémisinine tuent sélectivement le parasite par activation du pont peroxyde via le fer de l'hème (Mercer et al., 2007) ou du fer libre induisant alors la rupture de la liaison O-O par transfert électronique. Cette réduction entraîne la formation de radicaux oxygénés qui se réarrangent en radicaux carbonés dont un radical primaire centré sur le carbone C-4 issu de la β -scission de la liaison C3-C4.

Son mécanisme a été explicité par la proposition du mécanisme suivant (Robert et al., 2005): le FeII-hème incubé avec l'artémisinine en présence d'un agent réducteur (le fer à l'état ferreux) est transformé en adduit covalent hème-artémisinine. La coupure homolytique de la liaison peroxyde conduit au radical alkoxy qui se réarrange rapidement en radical alkyl (centré sur C4) via la rupture homolytique de la liaison C3-C4 (β -scission de la liaison C3-C4). Ce radical créé à proximité immédiate de l'hème, alkyle le macrocycle porphyrinique de celui-ci, créant potentiellement quatre adduits covalents isomères de position (mésos). Seule la position β a été détectée. La mesure de la masse moléculaire de ces adduits confirme la substitution d'un hydrogène du cycle de l'hème par l'artémisinine après hydrolyse de la liaison fer-oxygène. Dans la vacuole digestive, l'hème libéré par la digestion parasitaire de l'hémoglobine est à la fois l'agent activant l'artémisinine puis la cible de celle-ci. L'implication de la ferroprotoporphyrine dans le mode d'action de ce médicament est à la base du haut niveau de sélectivité dans l'action de l'artémisinine sur les érythrocytes parasités.

En 1994, l'équipe de Meshnick (Merali et Meshnick., 1991) montra que l'artémisinine et ses dérivés provoquent une réduction du peroxyde (Figures 26 et 27), et par conséquent la formation de radicaux alkyls qui réagissent avec l'hème ainsi qu'avec certaines protéines parasitaires. Ces radicaux alkyles entravent la détoxification de l'hème létal pour le parasite.

Ces radicaux sont donc capables d'alkyler l'hème ou d'autres molécules du parasite conduisant ainsi à une perturbation du métabolisme et à sa mort (Figure 26 et 2).

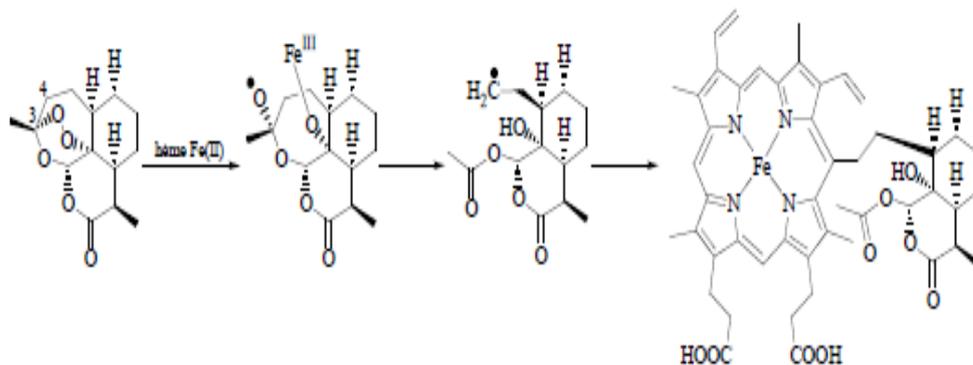


Figure 26: Alkylation de l'hème par l'artémisinine.

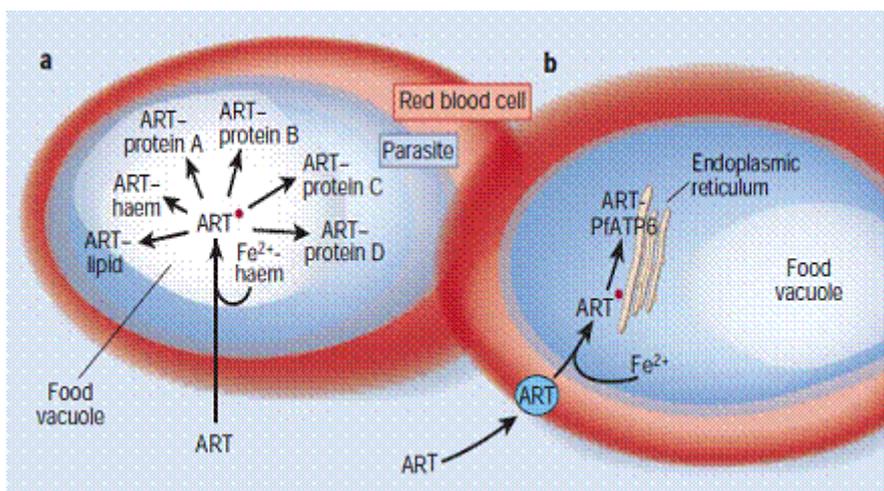


Figure 27: Les cibles de l'Artemisinin dans l'hématie et dans le parasite paludique. (Ridley, 2003)

c) Model d'ouverture du pont endoperoxyde

L'artémisine est une lactone sesquiterpénique portant un groupe peroxyde qui semble être la clé de son efficacité contre le parasite du paludisme. La molécule de peroxyde de l'artémisine réagit avec le fer des globules rouges pour créer des radicaux libres qui, à leur tour, détruisent les membranes du parasite et le tuent. L'ouverture du cycle est entraînée par la protonation du peroxyde ou par la complexation avec Fe^{2+} (Pandey et al., 1999). La molécule de fer se comporte comme un acide de Lewis et facilite l'ionisation du cycle et l'interaction avec la molécule d'eau conduit à la formation d'un hydroperoxyde insaturé capable de modifier d'une façon irréversible et par oxydation directe

les résidus de protéines. Les lipides des membranes sont époxydés, puis hydrolysés et par conséquent il y a désintégration des membranes.

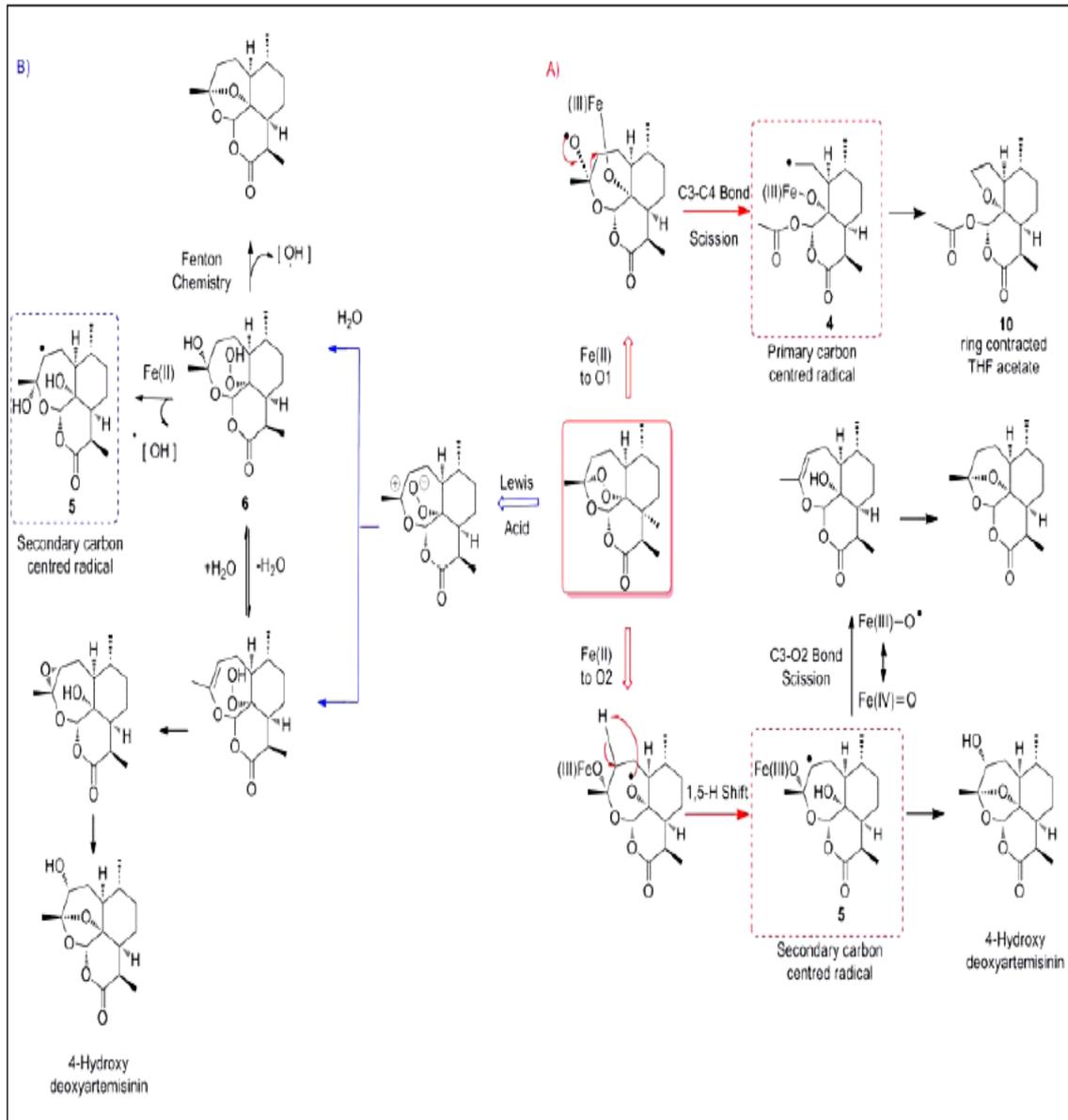


Figure 28: Bioactivation de l'artémisinine; A) Model de la scission réductrice; B) model d'ouverture du pont endopéroxyde. (O'Neill et al., 2010)

DEUXIEME PARTIE

EXPERIMENTATION

A) LA PROPOLIS

Evaluation des propriétés anti tumorales *in vitro* et *in vivo* d'extraits de propolis d'origine Marocaine :

Cette partie de l'étude expérimentale cosacrée à la propolis est le sujet de l'article :

H. Ait Mouse, M.Tilaoui, A. Jaafari, L. Ait M'barek, R. Aboufatima, A. Chait, A. Zyad. (2012) Evaluation of the in vitro and in vivo anticancer properties of Moroccan propolis extracts, Brazilian Journal of Pharmacognosy. 22(3): 558-567.

Résumé: Cette étude vise à évaluer le potentiel antitumoral *in vitro* et *in vivo* des extraits de la propolis marocaine récoltée dans la région de Beni Mellal. Pour les essais *in vitro* Trois lignées cellulaires tumorales de mammifères ont été utilisées: BSR (adénocarcinome rénal du hamster), Hep-2 (carcinome du larynx humain) et P815 (mastocytome murin). L'extrait éthanolique de la propolis, ainsi que son extrait à l'acétate d'éthyle, exercent une activité cytotoxique *in vitro* d'une manière dose dépendante. Les valeurs des IC₅₀ sont comprises entre 15 et 38 µg/mL. Cette activité ne dépend pas seulement de la composition chimique de l'extrait (analyse par HPLC / ESI-MS), mais elle dépend aussi des cellules tumorales cibles.

L'effet cytotoxique de ces extraits sur les cellules mononucléaires du sang périphérique humain normales (PBMC) a été très faible comparativement à celui induit sur les cellules tumorales.

D'autre part, le traitement par voie orale des souris (DBA2 / P815) portant des tumeurs avec l'extrait éthanolique de propolis (5 mg par souris tous les quatre jours, cinq fois pour le groupe A, et 2,5 mg par souris tous les quatre jours, cinq fois pour le groupe B) réduit significativement le volume de la tumeur (1,2cm³ pour le groupe A et 2,7 cm³ pour le groupe B au 22^{ième} jour après la greffe de la tumeur). Ces effets sont statistiquement significatifs par rapport à ceux obtenus avec les souris greffées par la tumeur et non traitées (volume tumoral 3,5 cm³ au 22^{ième} jour).

A1- Matériel et méthodes :

Produits chimiques

Le milieu de culture Eagles modifié de Dulbecco (D-MEM) est obtenu de Gibco BRL, Cergy Pontoise, France,

L'Adriamycine, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le MTT, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, le méthanol (qualité HPLC) et le Ficoll sont obtenus de chez Sigma Chemical Co. Saint Quentin (France).

Les extraits de la propolis

Les échantillons de propolis utilisés dans cette recherche sont collectés de la fin du printemps au début de l'été (Mai et Juin 2010), dans des ruches d'abeilles maintenues par nous-mêmes dans la région de Beni Mellal (Maroc central). Le spécimen est déposé à la Faculté des sciences et techniques Beni Mellal sous la référence: FSTBMCOLL72010.

La végétation sur le site de la collecte de la propolis utilisée dans ces expériences est dominée par des espèces ligneuses telles que *Ceratonia siliqua* (Fabacées), *Olea europaea*, *Olea oleaster* (Oleaceae) et *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae).

L'extrait éthanolique de propolis (EEP) est obtenu par macération à froid de la propolis dans l'éthanol à 95% pendant sept jours, suivie d'une filtration et une évaporation du solvant à sec sous vide. L'extrait de propolis à l'acétate d'éthyle (EAEP) est obtenu par le traitement de la propolis avec l'acétate d'éthyle (95%) dans un Soxhlet, suivie d'une évaporation du solvant à sec sous vide.

L'analyse de EEP et de EAEP par HPLC/ ESI-MS.

Avant l'analyse les échantillons, EEP et EAEP sont dissouts dans du méthanol (grade HPLC) et filtrés par un filtre à seringue de 0,22µm. Les analyses HPLC / ESI-MS ont été effectuées en utilisant une colonne RP C18 (150 x 4,6) x 5 µm avec une pompe Surveyor LC, Surveyor auto-échantillonneur couplé avec un détecteur PDA (200-600 nm), et un LCQ Advantage (ESI) spectromètre de masse à piège à ions (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Le volume injecté était de 20 µL avec du méthanol (grade HPLC) comme phase mobile à un débit de 0,5 mL / min.

Les conditions d'ionisation ESI étaient en pulvérisation sous une tension de 4KV et une température capillaire de 350 °C sous 14 V. Le gaz enrobant (gaine) était de l'azote pur et le gaz de collision était l'hélium pur.

L'analyse complète des données de masse m/z a été obtenue à la fois en modes positif et négatif, le spectre est étalé de 50 à 2000 uma.

La culture des lignées cellulaires

Les cellules BSR (carcinome reinal du hamster ATCC: CCL10), Hep-2 (carcinome du larynx humain ATCC: CCL23) et P815 (mastocytome de la souris DBA2, ATCC: TIB 64) provenaient du stock de cellules du laboratoire de génie biologique à la Faculté des sciences et techniques de l'Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal Maroc. Ces cellules sont cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂ dans un milieu de culture complet (Milieu de Dulbecco modifié par Eagles (D-MEM) supplémenté avec 5% de sérum de veau foetal et 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine et du bicarbonate de sodium à 0,2%).

Mesure de la cytotoxicité de EEP et de EAEP *in vitro*

Ce test a été effectué sur les lignées cellulaires après six passages comme décrit précédemment (Ait M'barek et al., 2007; Mossman, 1983). En bref, les cellules tumorales adhérentes ont été trypsinisées, (0,15% de trypsine, 0,1% d'EDTA) pour les décoller des flasks de culture. Après le lavage et la centrifugation, les cellules ainsi récupérées sont mises en culture et incubées dans des plaques de culture de 96 puits à fond plat, (BIOSTER, Bastia di Rovolon, Italie) à raison de

1 à 1.5 x 10⁵ cellules/mL dans 100 µL de milieu de culture complet par puits.

Des dilutions appropriées de EEP et de EAEP et de l'adriamycine solubilisés séparément dans du DMSO (la concentration finale du DMSO en culture est de 1%) ont été effectuées dans du milieu de culture avant leur addition sur les cellules cultivées (le volume final de culture est 200 µL).

Après 48 heures d'incubation en atmosphère humidifiée à 37° C et 5% de CO₂, 20 µL de MTT (5 mg/mL de PBS) ont été ajoutés dans chaque puits.

Après 3 heures d'incubation à 37 °C et 5% de CO₂, 100 µL de milieu étaient soigneusement retirés de chaque puits et remplacés par 100 µL du mélange HCl-Isopropanol (1 HCl /24 Isopropanol). Après 10 min d'incubation à 37 ° C, le formazan produit par les cellules métaboliquement actives a été solubilisé et mesuré par spectrophotométrie à 540 et à 630 nm en utilisant un appareil Multiskan (LabSystem,

Helsinki, Finlande). L'effet cytotoxique de EEP, de EAEP et de l'adriamycine est obtenu par la formule suivante :

$$\% \text{ lyse cellulaire} = 100 \times (1 - (DO_T / DO_0))$$

Dans laquelle DO_0 et DO_T sont respectivement les densités optiques obtenues pour les cellules non traitées DMSO (1% en culture) et pour celles traitées par EEP, EAEP ou par l'adriamycine. Les expériences sont effectuées en trois répétitions indépendantes en double exemplaires.

Analyse de l'induction de l'apoptose

L'analyse de l'apoptose a été réalisée en utilisant le test Annexin V biotine-streptavidine FITC. Brièvement, la culture dense de cellules tumorales P815 dans des flasks de 25 cm² (3x 10⁶ cellules dans 10 mL de milieu de culture DMEM), ont été traitées avec 40 µg respectivement de EEP ou de EAEP.

Après 12 heures d'incubation les culots cellulaires récupérés comme précédemment ont été lavés au PBS et marquées avec l'annexine V-biotine et traités successivement avec de la streptavidine conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pendant une heure. Ensuite, les cellules ont été traitées avec de l'iodure de propidium (PI) en solution, puis lavées avec du PBS et visualisées avec un microscope équipé d'un filtre à fluorescence (Olympus OM52) en vue de détecter l'induction de l'apoptose. Cette analyse est basée sur la capacité de l'annexine V (fluorescence verte) à se lier à la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules en apoptose (Vermes et al., 1995).

Effet sur les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC)

Ce test a été réalisé afin d'évaluer l'effet des extraits testés sur des cellules humaines normales. Les PBMC sont isolés sur des échantillons de sang (10 ml) en tubes stériles et héparinés recueillies de donneurs volontaires en bonne santé dans le cadre des règles du comité du contrôle éthique et médical.

Des cellules mononucléaires du sang périphérique ont été isolées par centrifugation sur du Ficoll-Hypaque. Les lymphocytes de l'interface ont été récoltés et lavés deux fois avec une solution saline de tampon phosphate stérile (PBS).

Les effets cytotoxiques de EEP, EAEP et de l'adriamycine ont été mesurés dans les mêmes conditions que celles détaillées ci-dessus pour les lignées cellulaires tumorales.

Induction des tumeurs chez la souris et le traitement par EEP et EAEP

Les souris (DBA2/H2d) achetées au centre d'élevage animal d'Orléans (France), ont été maintenues en élevage dans des conditions exemptes d'agents pathogènes spécifiques. Elles sont nourries ad libitum (aliments et eau) sous une photopériode de 12 heures. Les souris qui ont été utilisées dans nos expériences sont âgées de 6 à 8 semaines et ont un poids moyen de 20 g. Toutes les expérimentations animales ont été réalisées selon les principes et les lignes directrices de la Communauté Européenne relatifs aux soins et à l'utilisation des animaux de laboratoire

Une tumeur primitive a été induite dans les souris par l'injection sous-cutanée de 5×10^6 cellules tumorales P815. Lorsque la tumeur primitive a atteint un volume palpable, les souris ainsi devenues donatrices ont été sacrifiées et leurs tumeurs étaient dissociées en petits dés de taille similaire qui vont servir de greffe sur les souris utilisées dans les essais. Les souris étaient laissées au repos pendant six jours pour la cicatrisation de la greffe et la rémission du stress. Au 6^{ème} jour après la greffe les traitements ont été entamés avec un volume tumoral qui était d'environ $0,1 \text{ cm}^3$. Trois lots de six souris chacun ont été attribués à chaque groupe de traitement.

LotA : souris greffées recevant des doses de 5mg d'extrait EEP de propolis par gavage.

LotB: souris greffées recevant des doses de 2,5mg d'extrait EEP de propolis par gavage.

LotC: souris greffées ne recevant pas de traitement (lot témoin).

Le traitement est effectué en administrant par voie orale 5 mg ou 2,5 mg de l'extrait EEP par souris tous les quatre jours, cinq fois respectivement pour le groupe A et le groupe B. Le groupe témoin C a été greffé mais non traité (cet essai est réalisé en triple exemplaire). Par la suite, le volume tumoral pour chaque souris est déterminé (à partir des mesures des dimensions des tumeurs avec un pied à coulisse aux jours de traitement), selon le calcul suivant:

$$\text{Volume tumoral (cm}^3\text{)} = D \times d^2/2$$

où "D" est la longueur de la tumeur et «d» la largeur de la tumeur mesurées au pied à coulisse aux jours des traitements, comme décrit par Yoshikawa et al. (1995) et par Jaafari et al. (2007).

Etude de l'effet antioxydant des extraits EEP et EAEP

Ce test est effectué selon le protocole adopté par (Popovici et al., 2009) avec de légères modifications. En bref, la solution de DPPH de molarité 0,2 mM puis ajoutée à raison de

100µL par puits dans des plaques de 96 puits à fond plat contenant au préalable des dilutions en cascade sur chaque colonne de 8 puits des extraits à tester (la concentration initiale avant cette cascade de dilutions est 62,5 mg/mL) ou de la vitamine C ou du DMSO, respectivement utilisés comme contrôles positif et négatif. Après une incubation de 30 min à l'abri de la lumière, la DO est mesurée à 540 nm. Le pourcentage de neutralisation du DPPH est ensuite calculé de la manière suivante : % DPPH neutralisé = $100 \times (1 - (DO_T / DO_0))$; DO_T étant la densité optique dans les puits contenant les extraits de propolis ou la vitamine C et DO_0 étant densité optique des puits de contrôle contenant le DMSO au lieu des extraits de propolis (les extraits sont solubilisés dans du DMSO). Les résultats obtenus sont des moyennes d'essais effectués en trois répétitions.

Etude de l'effet cytotoxique de la combinaison de EEP et EAEP avec l'artémisinine

Cet essai est réalisé en traitant les cellules de la lignée P815, avec des doses décroissantes d'extraits de propolis commençant à 400µg/mL (400 µg/mL avec 8 dilutions en cascade pour aboutir à la plus faible dilution de 3,125 µg/mL). Ce traitement est effectué simultanément avec l'application d'une dose d'artémisinine au niveau de IC_{30} . Après incubation pendant 48 heures dans les conditions de culture comme il est précisé pour les autres essais, la variation relative du pourcentage de survie des cellules par rapport à celui permis par ART à la dose de IC_{30} est évalué avec le test MTT (DO à 540 nm) et le calcule suivant la relation :

$$100 \times (DO_{ART+EXTRAIT} - DO_{ART}) / DO_{ART}$$

$DO_{ART+EXTRAIT}$ = Densité optique pour les cellules traitées simultanément avec ART et extrait de propolis EEP ou EAEP.

DO_{ART} = Densité optique pour les cellules traitées uniquement avec ART IC_{30} .

Les valeurs sont des moyennes d'essais en trois répétitions.

Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes \pm SEM pour les essais en trois répétitions. La comparaison des moyennes est faite par ANOVA. Les différences sont considérées comme significatives à $p < 5\%$ en utilisant le logiciel STATISTICA.

A-2-Résultats :

L'analyse HPLC/ESI-MS

L'analyse des extraits EEP et EAEP par HPLC/ESI-MS a fourni les données des échantillons représentatifs illustrés par les Figures 29 et 30. Ces figures représentent respectivement (a) Chromatogrammes de balayage en PDA et le courant ionique total (TIC) en mode d'ionisation ESI négatif, et (b) les spectres de masse (MS) en mode d'ionisation ESI négatif.

Ces données ainsi que celles de la littérature relative aux analyses des flavonoïdes HPLC-ESI MS (Références citées dans les Tableaux 5 et 6) ont été exploitées pour la détermination des ions moléculaires déprotonés énumérés dans les tableaux 5 et 6, qui sont attribuables aux molécules aglycones ou glycosylées des flavonoïdes et terpénoïdes.

Tableau 5 : Molécules de flavonoïdes et leurs ions fragments présumés détecté en ionisation négative HPLC MS pour l'extrait EAEP.

Compounds	<i>m/z</i> [M - H] ⁻	References
wogonoside	919	Han et al., 2007
quercetin arabino-glucoside	595 462 301	Engels et al., 2011
apigenin dihexoside	563 443 259	Han et al., 2007; Li et al 2011
rhamnetin hexoside)	477 315 300	Han et al., 2007; Ding et al., 2008
baicalin or wogonin glucoside	445	Han et al., 2007
rhamnetin or isorhamnetin	315 300 271	Engels et al., 2011; Ding et al., 2008
kaempferide or trihydroximethoxyflavone	299 284 255	Han et al., 2007; Engels et al., 2011

Tableau 6 : Molécules de flavonoïdes et leurs ions fragments présumés détectés en ionisation négative HPLC MS pour l'extrait EEP.

Presumable compounds	<i>m/z</i> [M - H] ⁻	References
luteolin	285	Marques et al., 2009
luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	447 287	Han et al., 2007; Marques et al., 2009
kaempferol <i>O</i> -glucoside	447 301 300 271 151	Engels et al., 2011; Ding et al., 2008
apigenin	269	Han et al. 2007; Marques et al. 2009
daphnin or daphninin	339 151 679 Sira	Marques et al., 2009
wogonin or dihydroxy methoxyflavone	283	Han et al., 2007
caffeic acid	389 (195)	Simirgiotis et al., 2012
naringenin or pinobanksin	271	Sun et al., 2007
kaempferide	299	Engels et al., 2011
quercetin 3- <i>O</i> -pentoside	433	Engels et al. 2011
isorhamnetin	315	Engels et al., 2011; Ding et al., 2008
dihydroxyflavone	247	Pietta et al., 2002
afzelekin-catechin dimer	561	Simirgiotis et al., 2012
quercetin dipentoside	565	Engels et al., 2011

La présence présumable de tels composés dans les échantillons étudiés est suggérée par leur absorption dans l'UV et par la végétation à partir de laquelle la propolis a été produite telle que *Olea europaea* (Rovellini et al., 1997) et *Ceratonia silica* (Eldahshan, 2011). Mais évidemment, la détermination exacte des composés nécessite davantage d'analyses chromatographiques et spectrales. Néanmoins, les spectres obtenus indiquent que les compositions de ces extraits sont différentes. Ils indiquent aussi la richesse et la complexité des ces compositions chimiques.

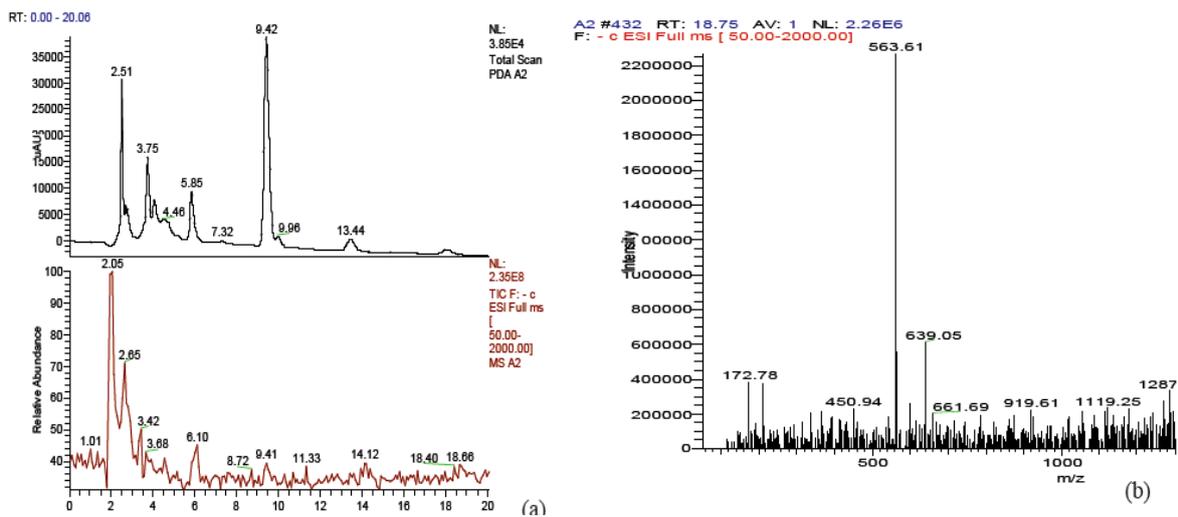


Figure 29: Analyse représentative en HPLC-ESI-MS de l'échantillon de l'extrait EAEP. Respectivement (a) Chromatogramme en PDA (Photo Diode Array) et TIC (Total Ion Chromatogramme) balayage en spectre de masse. (b). Spectre de Masse en Full scan (balayage complet).

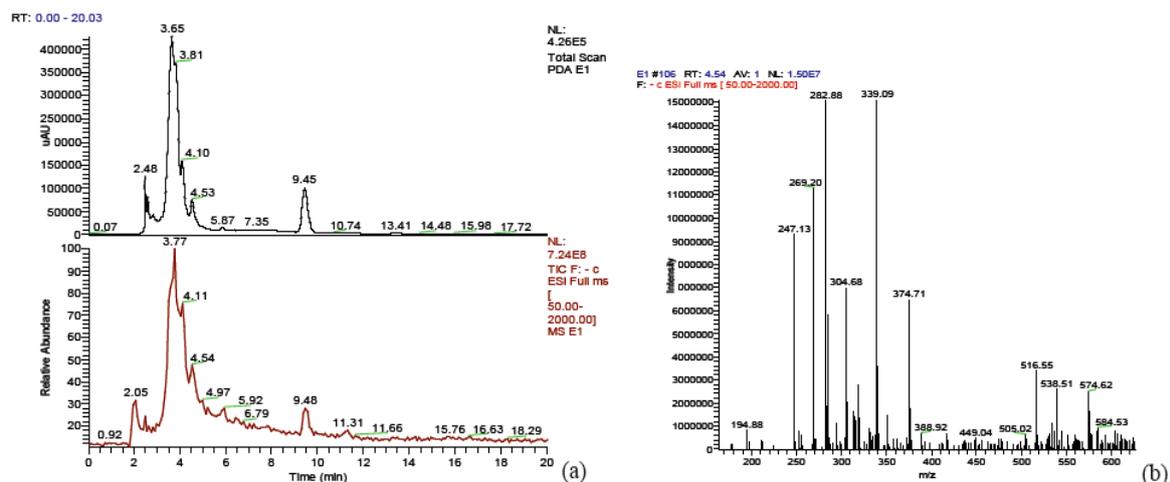


Figure 30: Analyse représentative en HPLC-ESI-MS de l'échantillon de l'extrait EEP. Respectivement (a) Chromatogramme en PDA (Photo Diode Array) et TIC (Total Ion Chromatogramme) balayage en spectre de masse. (b). Spectre de Masse en Full scan (balayage complet).

En effet cytotoxique *in vitro* des extraits EEP et EAEP sur les cellules tumorales :

L'activité cytotoxique *in vitro* de EEP et de EAEP a été évaluée contre les lignées Hep-2, BSR et P815. Les résultats obtenus (Tableau 7) ont montré une activité cytotoxique dose dépendante et différentielle selon la lignée considérée. Le Tableau 7 résume aussi les valeurs des IC₅₀ pour chaque extrait. En effet, alors que les lignées Hep-2 et P815 ont montré une sensibilité comparable à EEP (IC₅₀ 26,01 ± 1,3 et 24,78 ± 1,24 µg/mL respectivement), les cellules BSR sont plus sensibles à cet extrait (IC₅₀ 15,61 ± 0,78 µg/mL).

De la même manière, alors que les niveaux de la cytotoxicité induite par EAEP contre les lignées BSR et Hep-2 étaient similaires (IC₅₀ 18,03 ± 0,9 et 18,31 ± 0,91 µg/mL pour BSR et Hep-2 respectivement), cet effet a été faible pour P815 (IC₅₀ 38,06 ± 1,90 µg/mL). Ces différences sont statistiquement significatives (P < 5%).

D'autre part, pour la même lignée EEP et EAEP ont montré une activité cytotoxique différentielle. En effet EEP est plus cytotoxique contre P815 et BSR (IC₅₀ 24,78 ± 1,24 et 15,61 ± 0,78 µg/mL, respectivement) que EAEP (IC₅₀ 38,06 ± 1,9 et 18,03 ± 0,91 µg/mL, respectivement). Cependant, pour la lignée Hep-2 la cytotoxicité de EAEP était plus importante que celle induite par EEP (IC₅₀ 18,31 ± 0,91 et 26,01 ± 1,3 µg/mL, respectivement).

Ces données indiquent que la cytotoxicité induite par les extraits EEP et EAEP dépend de la composition chimique de chaque extrait et de la lignée cellulaire tumorale cible.

Détection de l'apoptose induite par EEP et EAEP

Afin de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité cytotoxique observée des extraits EEP et EAEP l'essai de détection de l'apoptose a été effectué en utilisant la lignée cellulaire P815.

Les résultats obtenus, (Figure 31) montrent que l'extrait EAEP induit la mort cellulaire programmée, alors que l'apoptose n'a pas été détectée dans les cellules traitées avec l'extrait EEP. En effet, l'observation de cellules traitées à l'EEP, montre une augmentation du volume de ces cellules avec des extensions et ou des fusions membranaires. En effet ces aspects cellulaires sont ceux de la mort par nécrose cellulaire. Ces résultats suggèrent que, EAEP peut contenir des composants qui induisent l'apoptose et qui seraient absents ou inactifs dans l'extrait EEP.

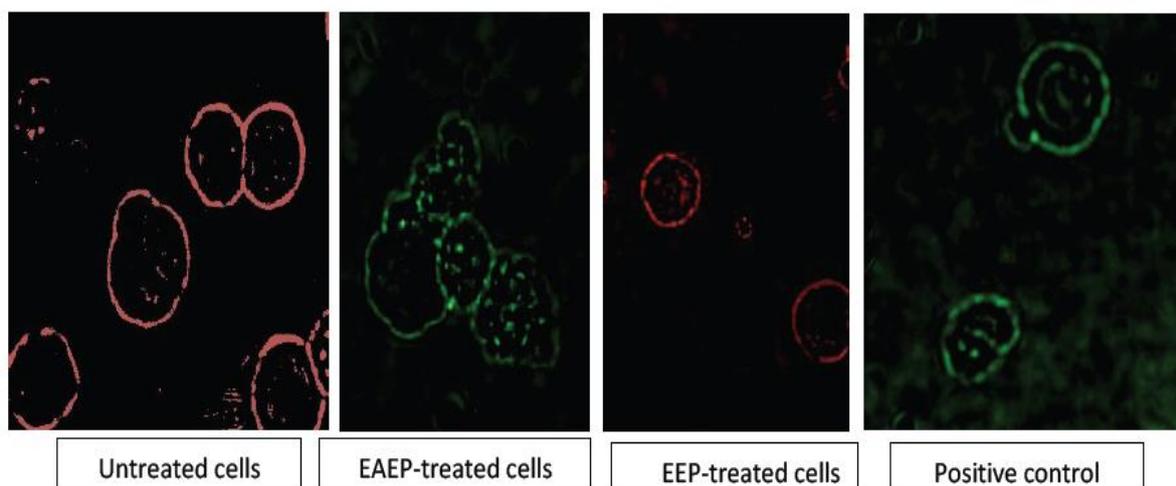


Figure 31 : Analyse de l'induction de l'apoptose dans les cellules P815.

Des cellules tumorales P815 (3×10^6 cells) sont traitées avec $40 \mu\text{g}$ respectivement de EEP ou EAEP. Après 12 h les cellules sont récupérées par centrifugation et lavées au PBS puis marquées à l'annexin V-Biotin et traitées séquentiellement avec la streptavidin-FITC pendant 1 heure. Ensuite les cellules sont traitées à l'iodure de propidium. Après un dernier rinçage au PBS la visualisation est effectuée au microscope à fluorescence. Les cellules apoptotiques apparaissent vertes et celles non apoptotiques apparaissent en rouge. L'essai est basé sur l'aptitude de l'Annexin V (fluorescence verte) de se fixer à la phosphatidylserine exposée à la surface des cellules apoptotiques. Le contrôle positif est réalisé par la culture des cellules sur milieu de culture sans serum.

Évaluation de l'activité cytotoxique de EEP et de EAEP contre les PBMC

Afin d'étudier les effets de l'extrait EEP et de EAEP sur des cellules non tumorales, leur cytotoxicité contre les PBMC a été évaluée. Les PBMC humaines normales étaient mises en incubation avec des concentrations croissantes de ces extraits dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les cellules tumorales. La Figure 33 montre la faiblesse ou l'absence de cytotoxicité induite par EEP et EAEP contre PBMC. En fait Sternberg et al. (2008) ont constaté que la quercétine pure à une concentration de 50 micromolaires induit la réduction de la prolifération de 20% des PBMC. Il est indiqué par nos résultats que les extraits EEP et EAEP présentent une très faible cytotoxicité (à la dose élevée de $65 \mu\text{g/mL}$ jusqu'à $260 \mu\text{g/mL}$) par rapport à celle exercée sur les cellules cancéreuses. En outre, compte tenu des doses appliquées, ces résultats indiquent que les PBMC humaines normales étaient plus résistantes aux actions des extraits EEP et EAEP, que les cellules cancéreuses, et suggèrent que ces extraits peuvent agir sélectivement sur les cellules tumorales.

Effet de l'extrait (EEP) sur l'évolution du volume tumoral chez la souris

Afin de montrer la relevance clinique des résultats obtenus *in vitro*, des expériences *in*

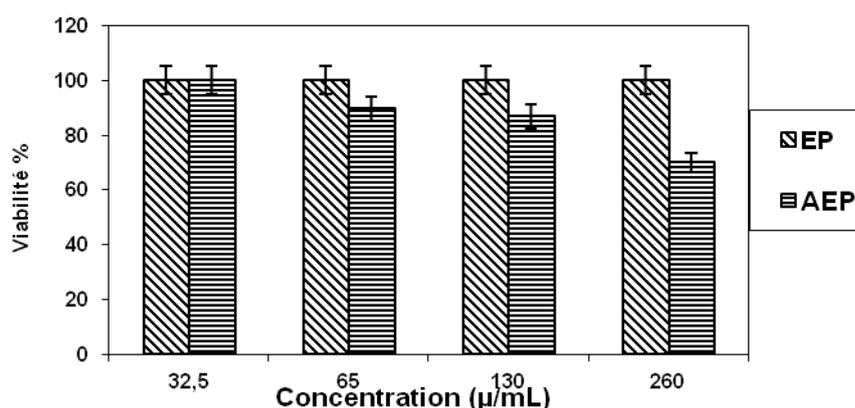


Figure 33 : Pourcentage de viabilité des cellules PBMC traitées avec EEP et EAEP. Les cellules proviennent de donneurs volontaire en bonne santé ont été isolées et cultivées comme décrit dans matériel et méthodes et traitées à des doses élevées de EEP et EAEP. Les données sont des moyennes \pm SEM de trois essais en double.

in vivo ont été réalisées en utilisant le modèle (DBA2/H²d) histocompatible avec la lignée cellulaire tumorale P815 (H2d) (Ait M'Barek et al., 2007).

Puisque l'extrait EEP a été le plus cytotoxique *in vitro* contre la lignée cellulaire P815, il a été utilisé pour valider les observations *in vitro*.

La Figure 34 montre l'effet du traitement avec les deux doses différentes de EEP sur l'évolution du volume tumoral chez les souris porteuses de tumeurs. Il est représenté sur cette figure qu'au jour 6 après la greffe (premier jour du traitement), le volume tumoral moyen était d'environ $0,20 \pm 0,01$ cm³ pour tous les groupes testés. Toutefois, l'administration par voie orale de l'extrait EEP (5 mg/souris et de 2,5 mg/souris tous les quatre jours respectivement pour le groupe A et pour le groupe B,) réduite de manière significative le développement de la tumeur solide dans les groupes traités comparées aux souris non traitées (groupe C) $p < 5\%$ au 17^{ième} jour. Au 22^{ième} jour, (16^{ième} jour du traitement), le volume moyen des tumeurs des animaux témoins était de $3,6 \pm 0,20$ cm³ (groupe C), tandis que pour les animaux traités, il était de $1,30 \pm 0,10$ cm³ et $2,70 \pm 0,16$ cm³ respectivement pour les groupes A et B. Cette différence entre le contrôle et les groupes traités a été significative ($p < 1\%$). Il a aussi été intéressant de constater, une importante différence entre les groupes traités (groupes A et B), à partir du 14^e jour (8^{ème} jour de traitement) ($P < 5\%$). Cette différence devient plus importante au 22^{ème} jour ($p < 1\%$). En parallèle, l'évolution du poids corporel des ces souris (Figure 32) est suivi dans le but de rendre compte de l'influence éventuelle des tumeurs et des traitements sur l'état général des animaux. On constate d'après ce suivi des poids des

animaux, l'existence d'une perte de poids assez marquée chez les souris traitées à forte dose. Il s'agit tout naturellement du fait qu'il faut trouver un équilibre entre le niveau de toxicité recherché pour éliminer la tumeur et le niveau de toxicité tolérable par les animaux traités.

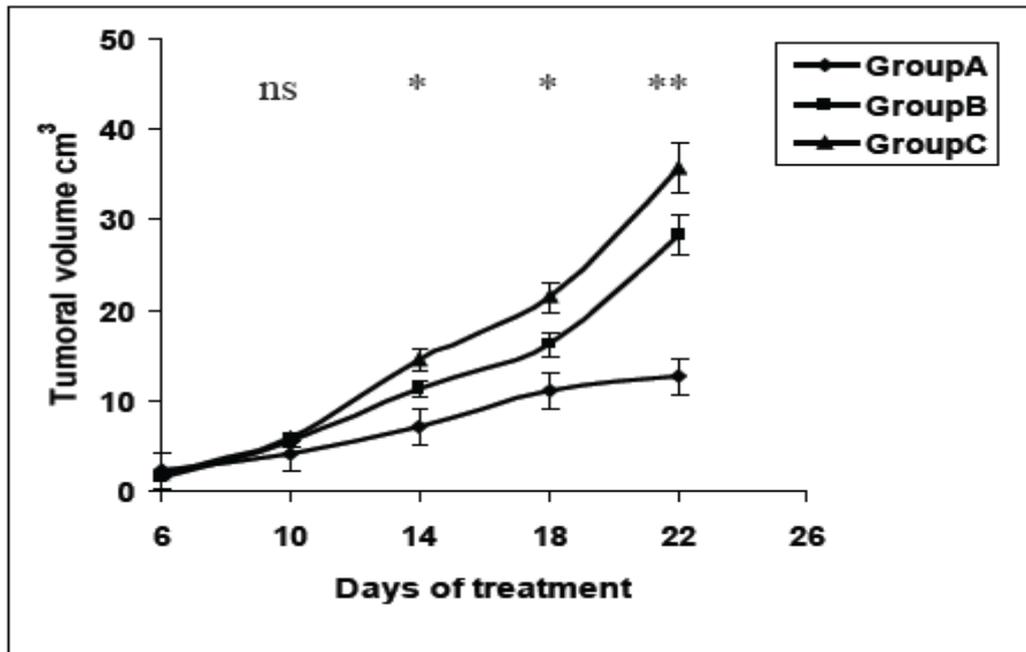


Figure 34. Evolution du volume tumoral chez les souris DBA2 (H2 d) porteuses de tumeurs P815 et traitées par EEP.

Les souris ont été greffées en sous-cutanée par la lignée cellulaire de la tumeur P815 haplotype (H2d). Le Groupe A et le Groupe B sont traités par l'extrait éthanolique de propolis (EEP), aux doses respectives de 5 mg et 2,5 mg / souris tous les quatre jours, cinq fois pendant 22 jours comme décrit dans matériel et les méthodes. Le groupe C est le groupe témoin non traité. (Ns: différence non significative; * différence significative à $P < 5\%$ et ** différence significative $p < 1\%$ par rapport au groupe témoin ANOVA. Les groupes contiennent six souris en triple répétition.

Effet antioxydant des extraits EEP et EAEP

Les résultats de ce test mettent en évidence l'effet antioxydant des extraits de propolis Figure 35. Cet effet est très important comparativement à l'effet de la vitamine C. Comme cette dernière, les extraits de propolis exercent cet effet antioxydant de manière dose dépendante. Nos essais ne révèlent pas de différence significative concernant le niveau de neutralisation du DPPH entre EEP, EAEP et la vitamine C. Cette propriété des extraits de propolis est très importante et participe pour une grande partie aux propriétés protectrices et préventives de la propolis.

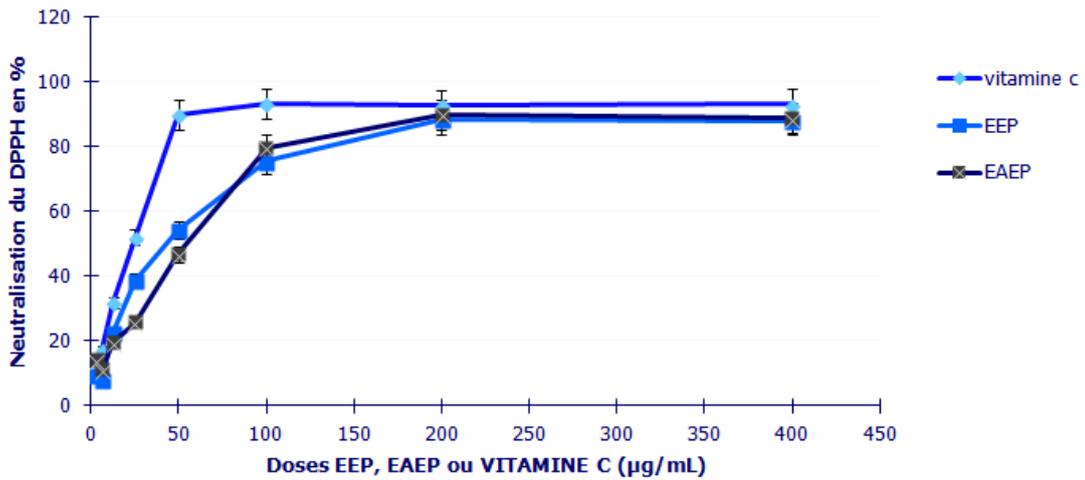


Figure 35: Effet antioxydant des extraits de propolis EEP EAEP, évalué par la méthode de au DPPH.

Effet cytotoxique de la combinaison de EEP et EAEP avec l'artémisinine

La combinaison des extraits de la propolis et de l'ART (Figure 36) a montré un effet antagoniste évident. Cet effet est le résultat de l'apport simultané des extraits EEP et EAEP avec la dose IC₃₀ de l'ART. Ces résultats sont très importants car ils mettent en

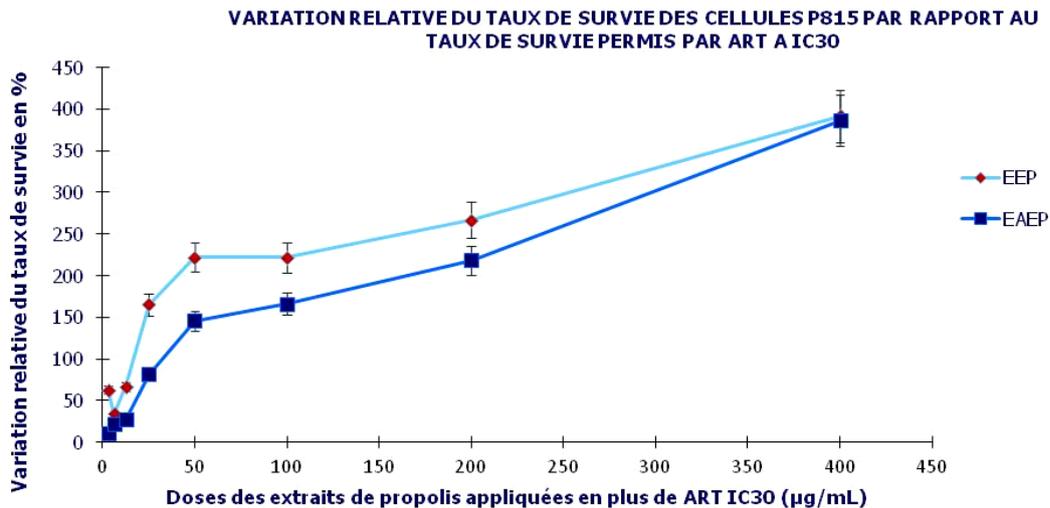


Figure 36 : Effet cytotoxique sur P815 de la combinaison de ART et des extraits de propolis EEP EAEP.

évidence l'effet protecteur antioxydant des extraits EEP et EAEP en faveur des cellules traitées simultanément à l'ART. En montrant pour la première fois avec les extraits de

propolis d'origine marocaine, que la combinaison de l'ART avec EEP et avec EAEP produit de l'antagonisme en ce qui concerne la cytotoxicité de ART vis-à-vis des cellules P815, ces résultats, confirment en même temps le mode d'action cytotoxique de l'ART. Cet effet antagoniste des extraits est dose dépendant en présence d'une dose fixe de l'ART (IC₃₀). En effet, cette molécule produit son effet cytotoxique par la génération de peroxydes (ROS) (Figures 27 et 28) suite à la réaction de son noyau trioxane (endoperoxyde) avec le fer ferreux au sein des cellules. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi produites vont tuer les cellules en oxydant les lipides membranaires et d'autres structures vitales des cellules. Quand ce mode d'action, démontré et prouvé par différents auteurs, est affronté par l'action antioxydante des molécules contenues dans les extraits de propolis, il en résulte cet effet antagoniste évident. Il est aussi important de remarquer la quasi disparition de l'effet cytotoxique des extraits EEP et EAEP. Ce phénomène serait mal admissible si on ne se rappelle pas que les cellules ont la capacité de réagir aux molécules cytotoxiques en mettant en œuvre des récepteurs de différentes natures capables d'internaliser des molécules ainsi que des signaux à même de répondre à leur besoin de réparation et de protection de leur structures et fonctions cellulaire vitales (Tableau 8).

Tableau 8. Effets inducteurs de signaux des flavonoïdes. (Vidak et al., 2015).

		Signaling Pathways (Red = Pathway Inhibition, Green = Pathway Activation)											
Group	Flavonoïd	Ras/MAPK	EGF/PI3K/Akt	NF-κB	Wnt/β-catenin	TNFα/NADPH-oxidase	JAK/STAT	Notch	ER	AHR	Nrf2	Ig-E	IRF-1
Flavonols	Quercetin	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	Kaempferol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	3'-HF	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			Red
Flavan-3-ols	Catechin/CG	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	Epicatechin	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green		
	Epicatechin metabolites	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	ECG	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
PACs	EGCG	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red		Red	
	Dimeric procyanidins	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
Flavones	Hexameric procyanidins	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	Apigenin		Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			
	Luteolin		Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			Red
	Tangeretin		Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red			Red

References: [39–47]; Abbreviations—Signaling pathways: MAPK = mitogen-activated protein kinase, EGF = epidermal growth factor, PI3K = phosphatidylinositide-3-kinase, Wnt = wingless-related integration site, NF-κB = nuclear factor kappa B, TNFα = tumor necrosis factor alpha, NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, JAK = Janus kinase, STAT = signal transducer and activator of transcription, ER = estrogen receptor, AHR = aryl hydrocarbon receptor, Nrf2 = nuclear factor 2, Ig-E = immunoglobulin E, IRF-1 = interferon regulatory factor 1; Flavonoids/groups: 3'-HF = 3'-hydroxyflavone, CG = catechin gallate, ECG = epicatechin gallate, EGCG = epigallocatechin gallate, PACs = proanthocyanidins.

A-3- Discussion et conclusions (1) :

Cette étude a été entreprise pour fournir des données comparatives sur l'activité cytotoxique de deux extraits différents de propolis marocaine contre diverses lignées de cellules tumorales.

Nous rapportons pour la première fois, un effet cytotoxique différentiel de ces extraits contre les trois lignées de cellules tumorales utilisées. Cette activité différentielle était liée non seulement de la composition chimique des extraits, mais aussi à la nature des lignées de cellules tumorales (Tableau 8). En effet, alors que cellules Hep-2 et P815 ont montré une sensibilité comparative à EEP (IC_{50} $26,01 \pm 1,30$ et $24,78 \pm 1,20$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement), les cellules BSR sont plus sensibles à cet extrait (IC_{50} $15,61 \pm 0,78$ $\mu\text{g/mL}$). En outre, alors que niveaux de cytotoxicité induite par EAEP contre BSR et Hep-2 étaient similaires (IC_{50} $18,03 \pm 1,01$ et $18,31 \pm 0,91$ $\mu\text{g / ml}$ pour BSR et cellules Hep-2 respectivement), l'effet contre la lignée cellulaire P815 était faible (IC_{50} $38,56 \pm 1,9$ $\mu\text{g/ml}$).

Enfin, en utilisant les mêmes cellules cibles, les extraits EEP et EAEP ont montré des niveaux de cytotoxicité très différents à l'exception du cas des cellules BSR.

L'effet différentiel de ces extraits sur la même lignée cellulaire peut être lié à la composition chimique différentielle de tels extraits (Tableau 8). Les présentes données sont en accord avec celles de (Akao et al., 2003) et (Chen et al., 2004), qui ont rapporté que l'effet cytotoxique des extraits éthanoliques de plusieurs échantillons de propolis et de leur fractions extraites à l'hexane et à l'acétate d'éthyle dépendent du contenu de ces extraits en flavonoïdes. De plus ces auteurs concluent que cet effet est augmenté par d'autres molécules qui se trouvent dans l'extrait éthanolique.

L'analyse moléculaire de ces extraits de propolis marocaine par des techniques modernes, HPLC-MS, est présentée pour la première fois. La composition présumée est comparable à des molécules et des composés trouvés dans les échantillons provenant d'autres régions (Pietta et al., 2002).

D'autre part, l'interaction entre ces molécules et les composants cellulaires reste à établir. En effet, la quercétine un composé courant de la propolis a été rapportée comme étant un modulateur potentiel de l'expression et de la fonction de la P-glycoprotéine des cellules du carcinome pancréatique humain résistantes à la daunorubicine (Borska et al., 2010). La Biochanin A et le silymarine aussi trouvés dans la propolis peuvent inhiber l'efflux de la digoxine et de la vinblastine médié par la Pgp dans les cellules Caco-2 de l'intestin humain suggérant que ces molécules peuvent accroître la bio-disponibilité de médicaments antitumoraux lors des thérapies anticancéreuses (Zhang & Morris 2003). En outre, si la composition chimique différentielle de ces deux extraits peut expliquer les différents niveaux de sensibilité de la même lignée cellulaire à ces extraits, il ne pouvait

pas expliquer pourquoi chaque extrait (EEP ou EAEP) présente un effet cytotoxique différentiel et sélectif d'une lignée cellulaire à l'autre.

Ce ciblage a également été confirmé à l'occasion du test des extraits EEP et EAEP sur les PBMC (CMSP : cellules mononucléaires du sang périphérique). Ces expériences ont aussi permis de montrer la quasi absence d'éventuels effets secondaires de toxicité. En fait, seule une cytotoxicité minime contre les PBMC a été observée pour les deux extraits étudiés. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dimov et al. (1991), qui fait état d'une activité immuno-modulatrice de la propolis. En effet, la propolis exerce un effet immuno-modulateur sur les cellules du type natural killer qui jouent un rôle très important dans la protection de l'organisme contre le développement des tumeurs (Sforcin et al., 2002), et sur les macrophages (Scheller et al., 1989). Les mécanismes moléculaires de la cytotoxicité de la propolis induite *in vitro* ne sont pas bien documentés. Afin de contribuer à la compréhension de ces mécanismes, l'étude de l'induction de l'apoptose est réalisée en utilisant la lignée cellulaire tumorale P815. Les résultats de cet essai ont montré que l'extrait EAEP induit la mort cellulaire programmée, tandis que l'extrait EEP n'induit pas l'apoptose dans les cellules traitées (Tableau 8). Ces résultats suggèrent que EAEP peut contenir des composants qui induisent l'apoptose et qui sont absents ou inactifs dans l'extrait de EEP. Araujo et al. (2010), a observé que la cytotoxicité de l'extrait éthanolique de propolis peut être directement lié à sa composition chimique et indirectement par l'inhibition de la production de l'oxyde d'azote (NO). EEP, était l'extrait le plus cytotoxique *in vitro*. Par voie orale *in vivo*, il induit une régression significative du volume de la tumeur chez les souris traitées. (de manière temps et dose-dépendante) (Figure 34).

Ces résultats confirment ceux de Scheller et al. (1989), qui a observé un effet cytotoxique

De l'extrait éthanolique de propolis chez les souris portant le carcinome d'Ehrlich. Ils complètent également le travail de Suzuki et al. (2002), qui démontrait que l'administration sous-cutanée d'un dérivé brut de la propolis soluble dans l'eau a donné lieu à une régression marquée de la croissance tumorale chez des souris après l'installation de la tumeur. De la même manière, Orsolich et al. (2005), a rapporté l'effet antitumoral du dérivé de la propolis soluble dans l'eau.

Le mode d'administration *in vivo* de produits anticancéreux est un problème important, et il peut conduire à des résultats différentiels en fonction du mode utilisé.

Hollands et al. (1991) ont rapporté que la propolis à une faible toxicité orale aiguë, comme le montrent les tests de DL₅₀ sur les souris (2000-7300 mg/kg de poids corporel, et des flavonoïdes testés chez le rat (4000-8000 mg/kg de poids corporel).

Decastro & Higashi (1995) n'ont rapporté aucun effet secondaire de la propolis dans en administration par voie orale à des souris à des doses aussi élevées que 4000 mg/kg/jour dans de l'eau potable pendant deux semaines et à 1,4 mg/kg/jour pendant quatre-vingt dix jours (Kannada & Nishina, 1994).

Le mécanisme impliqué dans la cytotoxicité induite des extraits de propolis chez la souris est encore inconnu. Cependant, l'extrait éthanolique peut agir par l'altération des membranes cellulaires sous l'action des flavones naturels (Herrerias et al., 2010) ou par liaison à l'ADN de flavonoïdes aglycones ou des flavoloides glycosilés. Ce genre de liaisons compromet la duplication de l'ADN et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire (Wang et al., 2008). Il peut aussi agir *in vivo* par la stimulation de l'immunité multicellulaire y compris la prolifération des lymphocytes (Sà Nunes et al., 2003), des cellules tueuses naturelles et l'activation des macrophages (Dimov et al, 1991; Orsi et al, 2000). La synergie des effets de ces deux voies, ainsi que la capacité de chacune d'entre elles à neutraliser les cellules tumorales ont besoin de plus d'investigations. Il est tout aussi intéressant de constater l'importance des résultats obtenus pour la première fois lors des essais concernant l'activité antioxydante et l'activité antagoniste des extraits EEP et EAEP contre l'effet cytotoxique l'artémisinine contre la lignée P815. Ces résultats confirment le mode d'action de l'artémisinine. Ils renseignent aussi et de manière très claire et intéressante sur la façon de gérer l'utilisation des antioxydants et des produits naturels de médecine traditionnelle avec les drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

En conclusion, la présente étude démontre que l'activité cytotoxique des extraits d'EEP et EAEP est un phénomène complexe qui dépend non seulement de la nature de l'extrait et de ses composants, mais aussi du type cellulaire de la tumeur. Les présents essais font état d'une réduction évidente et efficace du volume de la tumeur par l'extrait éthanolique de la propolis chez les souris DBA2 porteuses de tumeurs P815. Cet extrait n'induit pas l'apoptose, dans des cellules P815. Par contre l'extrait EAEP induit l'apoptose dans les cellules P815.

En conclusion, la présente étude démontre que l'activité cytotoxique des extraits d'EEP et EAEP est un phénomène complexe qui dépend non seulement de la nature de l'extrait

et de ses composants, mais aussi sur du type cellulaire la tumeur. Les présents essais font état d'une réduction efficace du volume de la tumeur par l'extrait éthanolique de la propolis chez les souris DBA2 porteuses de tumeurs P815. Ils mettent aussi en évidence et confirment de manière très intéressante le mode d'action de l'artémisinine ainsi que les interactions éventuelles entre les produits naturels et les drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

B) L'ARTEMISININE

Etude de l'effet antitumoral de l'artémisinine *in vitro* et *in vivo*

Cette partie de l'étude expérimentale consacrée à l'artémisinine est le sujet de l'article :

M. Tilaoui, H. Ait Mouse, A. Jaafari, A. Zyad (2014) Differential Effect of Artemisinin Against Cancer Cell Lines; Nat. Prod. Bioprospect. 4:189–196.

Effet différentiel de l'artémisinine contre lignées cellulaires cancéreuses

Résumé : La présente étude vise à définir l'effet de cytotoxicité différentielle de l'artémisinine sur les lignées de cellules tumorales P815 (mastocytome murin) et la lignée BSR (adénocarcinome du rein de hamster). La cytotoxicité a été mesurée par l'inhibition de la croissance en utilisant le test MTT. Ces études de cytotoxicité *in vitro* ont été complétées par l'étude de l'apoptose par électrophorèse de l'ADN apoptotique fragmenté et par détection de la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules en apoptose par le marquage à l'annexine V-streptavidine-FITC (Vermes et al., 1995). En outre, nous avons examiné la synergie *in vitro* entre artémisinine et la drogue utilisée en chimiothérapie, la vincristine. L'étude *in vivo* est effectuée sur les souris du modèle murin (DBA2/H2d)/ P815.

Les valeurs des IC₅₀ obtenus lors des essais de cytotoxicité de l'artémisinine sont 12 µM pour P815 et 52µM pour BSR). D'autre part, l'apoptose a été induite chez P815, mais pas induite dans BSR. Ces données révèlent un effet cytotoxique différentiel intéressant en fonction de la concentration, du temps d'exposition et des cellules cibles.

Cela suggère l'existence d'interactions moléculaires différentes entre les lignées de cellules étudiées et l'artémisinine.

In vivo, nos résultats montrent clairement que l'administration orale de l'artémisinine a inhibé le développement des tumeurs solides chez les souris DBA2. Notre étude démontre que l'artémisinine présente des effets cytotoxiques différentiels.

B-1-Matériel et méthodes :

Culture cellulaire

Les lignées de cellules (P815 et BSR) ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM complet contenant 5% de sérum de veau fœtal décomplémenté par la chaleur (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France), complété avec de la pénicillineG-streptomycine (1%) et du bicarbonate de sodium à 0,2% (Sigma). L'incubation a été effectuée à 37° C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

Essais d'inhibition de la croissance cellulaire

Les cellules des lignées BSR et P815 ont été récoltées à partir de cultures en phase de croissance exponentielle. Après un lavage au PBS, les cellules récoltées ont été cultivées dans des plaques de culture cellulaire de 96 puits à fond plat contenant 100µL de milieu de culture complet par puits (à raison de 5 x 10⁴ cellules/mL). 3 heures plus tard, plusieurs dilutions à partir de la concentration initiale de 100µM d'artémisinine dans le DMSO et complété à 100µL avec du DMEM complet sont ajoutées dans chacun des puits contenant les cellules en culture.

Les cellules témoins ont été traitées avec du DMSO seul en respectant les volumes ajoutés. Dans tous les cas, la concentration finale du DMSO n'a jamais dépassé 2% v/v.

Après 48 heures d'incubation dans une atmosphère humidifiée à 37°C et 5% de CO₂, 100 µL de milieu étaient soigneusement retirés de chaque puits et remplacés par 20 µL de la solution de MTT (5 mg/mL de PBS). Après 4 heures d'incubation sous les mêmes conditions de culture, le clivage du MTT en formazan par les cellules métaboliquement actives a été quantifié par la mesure de la densité optique (DO) des puits de chaque plaque à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre Multiskan EX (Finlande).

Trois lots d'expérimentation indépendants ont été réalisés en double répétition. L'inhibition relative de la prolifération cellulaire a été calculée par la formule:

$$\% \text{ D'inhibition} = 100 (1 - A/A_0)$$

où A₀ et A sont respectivement les absorbances du contrôle négatif (cellules non traitées) et des cellules traitées à l'artémisinine.

Les effets cytotoxiques de l'artémisinine contre les deux lignées cellulaires ont été comparés en utilisant les valeurs des IC₅₀ (la concentration de l'artémisinine conduisant à 50% d'inhibition de la viabilité cellulaire).

Étude cinétique de la cytotoxicité

L'effet cytotoxique de l'artémisinine contre les deux lignées cellulaires P815 et BSR a été évalué au bout de 24, 48 et 72 h, en utilisant le test à MTT dans les mêmes conditions décrites ci-dessus.

Essai de détection de l'Apoptose

Electrophorèse de l'ADN fragmenté

Les cellules P815 et BSR (5×10^6 cellules) ont été traitées avec l'artémisinine à la dose de $70 \mu\text{M}$. Après 12 heures d'incubation dans les mêmes conditions décrites pour la culture cellulaire, les cellules ont été lavées dans du PBS et traitées avec le tampon de lyse (TRIS 100 mM, EDTA 0,5 M, SDS à 10%, 5 M de NaCl, proteinaseK 20mg/mL). Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C pendant 3 heures avec agitation. Ensuite, l'ADN a été précipité par l'isopropanol et a été récupéré et remis en solution, dans des tubes Eppendorf pré marqués, dans la solution composée de : Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5. Les échantillons d'ADN ainsi dissouts ont été soumis à l'électrophorèse sur le gel d'agarose à 2% (p/v) contenant du bromure d'éthidium (1 mg/mL), sous une tension de 25 Volts pendant 8 heures. Les bandes d'ADN marquées au bromure d'éthidium (fluorescence à l'UV) ont été visualisés en utilisant un trans-illuminateur UV (310 nm).

Les fragments d'ADN en barreau d'échelle montrent la fragmentation (180-200 paires de bases) de l'ADN qui fournit une confirmation de la mort cellulaire programmée (apoptose). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le λ HaeIII ϕ x 147.

Le test de l'apoptose à l'Anexin V biotine-streptavidine FITC

Pour confirmer les changements apoptotiques dans les lignées cellulaires P815 et BSR, celles-ci étaient visualisée avec un microscope à fluorescence UV (OLYMPUS OM52) après marquage à l'AnexineV-FITC biotine-streptavidine

En bref, les cellules P815 et BSR traitées avec $70 \mu\text{M}$ d'artémisinine ou cultivés dans le milieu sans sérum (comme témoin positif) ont été recueillies après 24 h d'incubation dans des tubes de centrifugation de 15 mL.

Après un lavage dans du PBS, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-biotine et traitées avec la streptavidine conjuguée à FITC.

L'essai est basé sur la capacité de l'annexine V (fluorescence verte) à se lier à la phosphatidylsérine exposée sur la surface des cellules subissant l'apoptose.

Etudes de synergie artemisininine-vincristine

L'étude de l'effet cytotoxique de la combinaison artémisinine-vincristine a été réalisée en utilisant l'analyse de CI (combinaison index) à rapport ou ratio non constant (non constant ratio), c'est-à-dire que des combinaisons des deux drogues ont été faites en faisant varier les concentrations de l'une d'entre elles (ici la vincristine) tout en gardant celle de la seconde (artémisinine) fixée dans le cas de notre essai à la dose correspondant à IC₃₀. Un indice de combinaison CI inférieur à 1 indique le synergisme, un CI supérieur à 1 indique l'antagonisme et un CI égal à 1 indique l'additivité (Chou and Talalay 1984).

Effet antitumoral de l'artémisinine *in vivo*

Des souris DBA2 (haplotype H2d), achetés auprès de centre d'élevage animal d'Orléans (France), ont été maintenues dans des conditions exemptes d'agents pathogènes spécifiques et une photopériode de 12 heures.

Les souris ont été nourries ad libitum (nourriture eau stérile) et ont été utilisées à 6-8 semaines d'âge avec un poids moyen de 20-24 g. Toutes les expériences sur les animaux ont été effectuées en vertu des réglementations nationales et les directives de la communauté européenne relatives aux principes acceptés pour l'entretien et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Des aliquotes de cellules P815 (environ 10⁷ cellules/ mL) ont été injectées en sous-cutanée dans la région inguinale gauche de la souris. La croissance de la tumeur et le poids corporel de chaque souris ont été surveillés journallement. Le volume tumoral a été déterminé selon le calcul suivant :

$$\text{Volume tumoral (cm}^3\text{)} = D \times d^2/2$$

comme exprimé lors de l'étude de la propolis ou sous la forme $TV(\text{Cm}^3) = L \times W^2 / 2$ où L est la longueur de la tumeur et W la largeur de la tumeur (Yoshikawa et al. 1995).

Les souris portant des tumeurs palpables ont été réparties au hasard en groupes de traitement et de témoins (N= 6 souris/groupe). L'Artémisinine, dissoute dans l'huile végétale a été administrée à des souris du groupe traité par voie orale (par gavage) à une dose de 80 mg / kg dans un volume final de 100 µL. Cette quantité a été administrée à des souris aux jours 0, 2, 4, 6, 8, 10 (une administration par voie orale toutes les 48 h, six fois). Chaque souris du groupe témoin a reçu 100 µL d'huile végétale seule tous les 2

jours (aux mêmes dates que pour les souris traitées à l'artémisinine). Les essais ont été effectués avec de répétitions en triple.

Effet de l'artémisinine sur Les cellules (PBMC)

Ce test a été réalisé afin d'évaluer l'effet de l'artémisinine sur des cellules humaines normales en utilisant des essais avec les tests colorimétriques au réactif MTT comme décrit ci-dessus.

Pour isoler les PBMC, les échantillons de sang ont été prélevés sur des donneurs humains en bonne santé dans des tubes héparinés et les PBMC ont été isolées par centrifugation sur du Ficoll-Hypaque. Les lymphocytes isolés à l'interface du ficoll ont été lavés deux fois avec du tampon phosphate (PBS). Ces cellules ont ensuite été incubées dans des plaques de culture cellulaire de 96 puits en présence de différentes concentrations de l'artémisinine variant de 0 à 177 μM .

Analyse statistique

Les valeurs individuelles de données sont présentées comme la moyenne arithmétique \pm SD (déviation standard). L'analyse statistique des résultats des études *in vitro* et *in vitro* est effectuée avec le logiciel STATISTICA. Test t de Student ou ANOVA au seuil significatif de p à 5%.

B-2- Résultats et discussion

Cytotoxicité de l'artémisinine sur les lignées cellulaires P815 et BSR

L'activité cytotoxique *in vitro* a été évaluée dans les lignées de cellules tumorales P815 et BSR. Cette activité dépend de la la dose et la durée d'exposition (Figures 37 et 38). Les niveaux maxima de cytotoxicité ont été obtenus à la suite d'un temps d'incubation en présence de l'artémisinine égal à 72 h. Ainsi, dans toutes les expériences qui ont suivi, le temps d'incubation a été fixé à 72 heures.

La plus forte concentration testée avait un effet cytotoxique aigu atteignant une inhibition de la prolifération de 90% pour les cellules de la lignée P815 et un effet inhibiteur partiel d'environ 65% dans les cellules de la lignée BSR. Ces deux lignées cellulaires présentent différents degrés de sensibilité à l'artémisinine. En effet, les concentrations conduisant à 50% de cytotoxicité (IC_{50}) étaient respectivement d'environ 12 et 52 μM pour les lignées cellulaires P815 et BSR. Les valeurs des IC_{50} indiquent que

les cellules P815 sont plus sensibles à l'effet de l'artémisinine que celles de la lignée BSR (Figure 38).

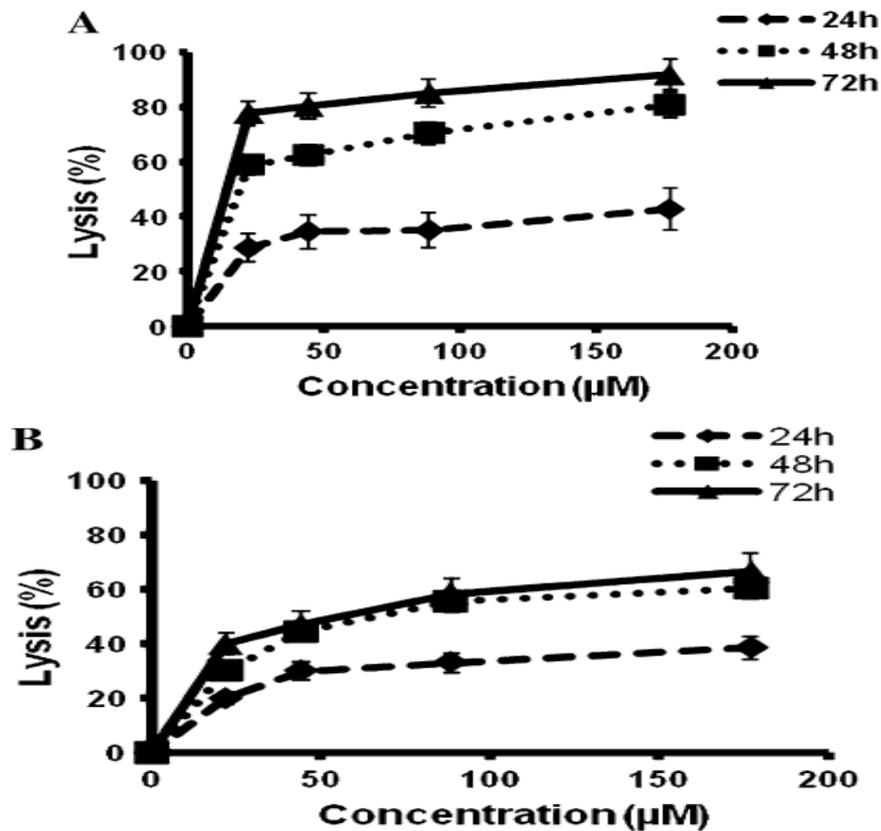


Figure 37 : Cinétique de la cytotoxicité in vitro de l'artémisinine sur les lignées P815 (A) et BSR (B). Les cellules sont traitées à des doses croissantes d'artémisinine et incubées 24, 48 et 72 heures. La cytotoxicité est déterminée comme indiqué dans matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne \pm SD (Déviation Standard) de trois essais indépendants.

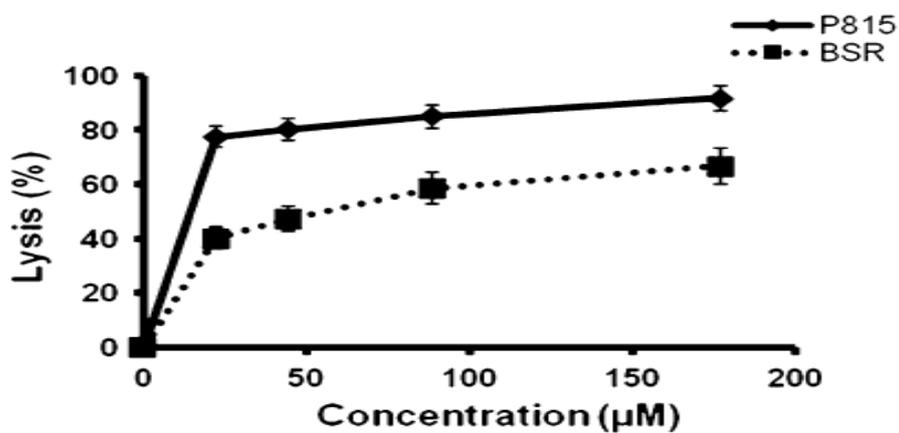


Figure 38 : Cytotoxicité in vitro de l'artémisinine sur les lignées P815 (A) et BSR (B). Les cellules sont traitées à des doses croissantes d'artémisinine et incubées 72 heures. La cytotoxicité est déterminée comme indiqué dans matériel et méthodes. Chaque point représente la moyenne \pm SD (Déviation Standard) de trois essais indépendants.

L'artémisinine induit l'apoptose dans les cellules de la lignée P815

Electrophorèse de l'ADN apoptotique :

La fragmentation de l'ADN a été observée dans les cellules apoptotiques de la lignée P815 traitées avec 70 μM de l'artémisinine pendant 24 h.

Il est remarqué avec intérêt, qu'à la même concentration (70 μM), l'artémisinine n'a pas induit de fragmentation de l'ADN dans les cellules de la lignée BSR (Figure 39, ligne A).

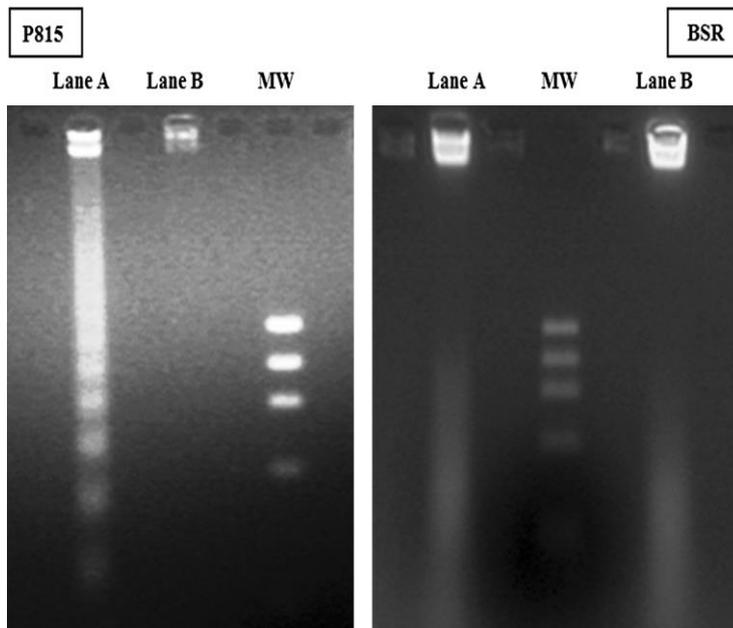


Figure 39 : Electrophorèse sur gel d'agarose montrant L'ADN apoptotique.

Electrophorèse sur gel d'agarose montrant L'ADN apoptotique fragmenté pour les cellules P815 traitées avec 70 μM d'artémisinine pendant 24 heures. Bande A : cellules traitées à 70 μM d'artémisinine ; Bande B : contrôle; MW Marqueur de poids moléculaire 180-200 paires de bases.

Marquage à l'Annexin V- streptavidine FITC :

Le traitement par l'artémisinine (70 μM) a augmenté le pourcentage de cellules positives à l'annexine V dans les lignées cellulaires P815 ($99,2 \pm 0,85\%$). Pendant l'expérience, seulement $2,00 \pm 1,25\%$ des cellules P815 non traitées étaient annexine V-positif à 24 h (Figure 40). D'autre part, les cellules BSR traitées avec l'artémisinine à 70 μM , ont montré un très faible pourcentage de cellules positives à l'annexine V ($19 \pm 1,2\%$). Le contrôle positif présentait $82 \pm 2\%$ de cellules positives à l'annexine V). En outre, l'augmentation de volume des cellules était clairement observée dans les cellules BSR traitées à l'artémisinine, mais pas dans les cellules P815 (Figure 40). Ces résultats indiquent que l'induction de l'apoptose par l'artémisinine dépend de la lignée cellulaire cible.

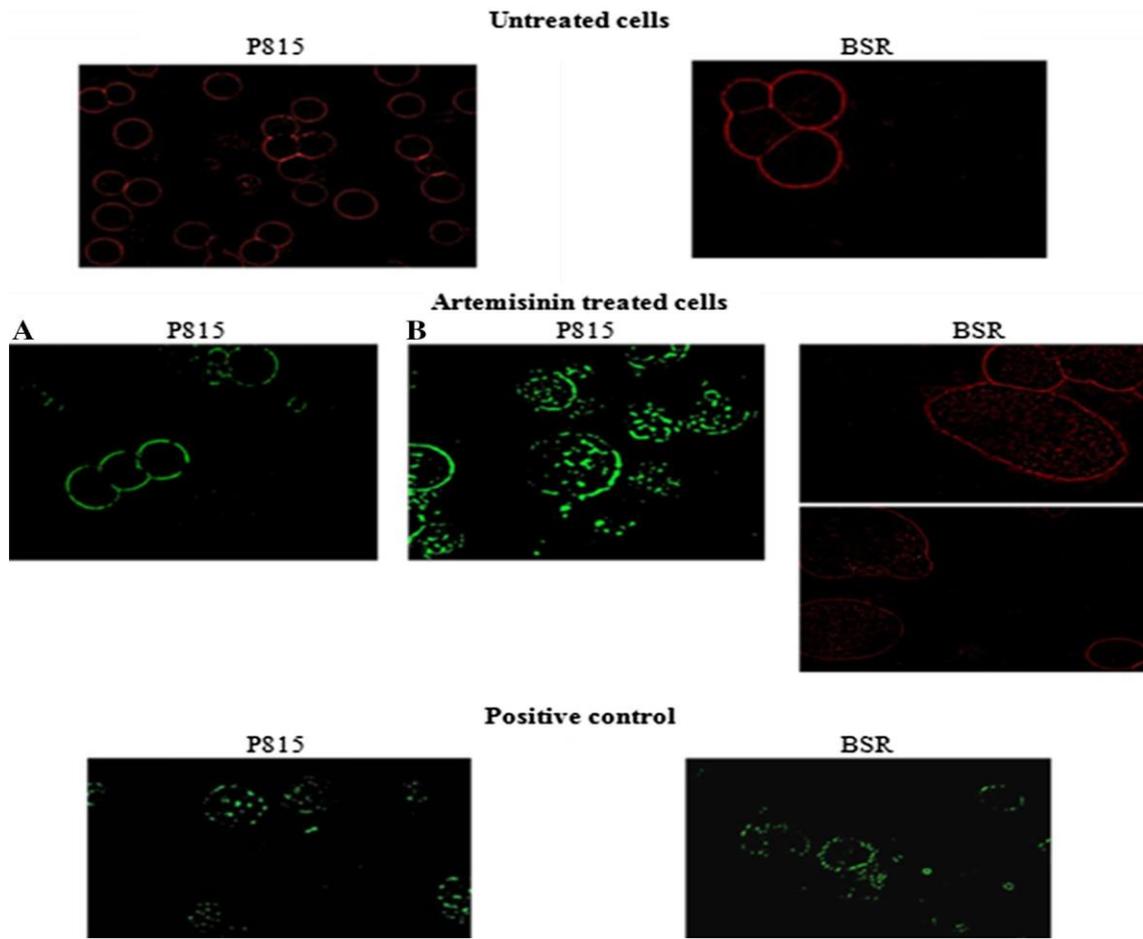


Figure 40 : Induction de l'apoptose par le traitement de P815 et de BSR par l'artémisinine (70 μ M). Les cellules non traitées ou celles traitées uniquement par l'artémisinine sont mises en présence de l'Annexin V biotine et traitées par la streptavidine conjuguée à la FITC comme décrit dans matériel et méthodes. Les cellules ainsi marquées sont visualisées au microscope à fluorescence équipé de filtres adéquats. A : début d'apoptose, B : cellules en apoptose avancée. Le contrôle positif est constitué de cellules cultivées dans du milieu sans serum.

Effet cytotoxique de la combinaison artémisinine- vincristine sur P815 et BSR

Afin de déterminer si la combinaison de l'artémisinine et la vincristine produit une activité cytotoxique synergique contre P815 et BSR, la méthode de l'analyse de l'indice de combinaison (CI) a été utilisée. Pour la lignée cellulaire P815 (Tableau 9), la concentration de l'artémisinine a été fixée à la valeur de la IC₃₀ (3 μ M) et celle de la vincristine variait de 0,42 à 54 μ M. Cette analyse a montré que la combinaison induit un effet additif à la concentration 13,5 μ M et un effet antagoniste aux concentrations inférieures à 13,5 μ M de la vincristine. L'effet synergique a eu lieu pour des concentrations allant jusqu'à 27 μ M de vincristine combinée avec l'artémisinine à la concentration de 3 μ M.

Tableau 9 : Tableau 9 : Analyse de l'indice de combinaison CI, vincristine 3 μ M Artemisinine (IC 30) contre la lignée P815.

Vincristin (μ M)	Artemisinin (μ M)	Fa (A + V)	CI	Description ^a
54	3	1	0.59	Synergy
27	3	1	0.78	Synergy
13.5	3	0.99	1.32	Slight additive
6.75	3	0.92	1.95	Antagonism
3.37	3	0.76	1.82	Antagonism
1.68	3	0.73	2.20	Antagonism
0.84	3	0.69	3.82	Antagonism
0.42	3	0.68	4.83	Antagonism

Fa affected fraction, *A* artemisinin, *V* vincristin, *CI* combination index

^a CI = 1.00, additive effect; CI < 1.00, synergistic effect; CI > 1, antagonistic effect

Tableau 10 : Analyse de l'indice de combinaison CI, Vincristine 10 μ M Artemisinine (IC 30) contre la lignée BSR.

Vincristin (μ M)	Artemisinin (μ M)	Fa (A + V)	CI	Description ^a
54	10	0.93	1.15	Nearly additive
27	10	0.89	1.3	Nearly additive
13.5	10	0.86	1.4	Antagonism
6.75	10	0.83	1.935	Antagonism
3.37	10	0.81	2.94	Antagonism
1.68	10	0.80	4.605	Antagonism
0.84	10	0.80	7.89	Antagonism
0.42	10	0.76	9.945	Antagonism

Fa affected fraction, *A* artemisinin, *V* vincristin, *CI* combination index

^a CI = 1.00, additive effect; CI < 1.00, synergistic effect; CI > 1, antagonistic effect

En utilisant la lignée cellulaire BSR, la concentration de l'artémisinine a été fixée à 10 μ M (valeur de IC₃₀) et la concentration de la vincristine variait de 0,42 à 54 μ M (Tableau 10). Aux concentrations inférieures à 27 μ M, l'indice de combinaison CI a indiqué une interaction antagoniste. Toutefois, lorsque la vincristine a été ajoutée à des concentrations croissantes commençant à partir de 27 μ M, l'interaction qui en résulte était à tendance additive.

Effet de l'artémisinine sur la croissance tumorale chez la souris

Afin d'évaluer si nos résultats *in vitro* ont une pertinence clinique, l'artémisinine a été utilisée pour des essais *in vivo* en utilisant le modèle de souris DBA2 / P815 (H2d). Comme on le voit sur la Figure 41, au jour zéro du traitement le volume tumoral était d'environ $0,2 \pm 0,06 \text{ cm}^3$ pour tous les groupes testés ($P < 0,05$). Le volume tumoral a augmenté de façon très sensible dans les souris témoins entre le jour 0 et le jour 6 pour atteindre $1,7 \pm 0,08 \text{ cm}^3$. Chez les animaux traités ce volume a atteint $1 \pm 0,08 \text{ cm}^3$. Après le 6^{ème} jour, les volumes de tumeurs des souris non traitées continuent à croître pour atteindre au jour 20 le volume de $2,2 \pm 0,1 \text{ cm}^3$, cela a conduit à la mort des souris non traitées porteuses de tumeurs.

Cependant, chez les animaux traités, le volume de la tumeur a commencé à diminuer pour atteindre $0,26 \pm 0,06 \text{ cm}^3$ au jour 10, et avoisiner la régression totale ($0,003 \pm 0,06 \text{ cm}^3$) au jour 14. Cette différence a été très significative entre les groupes témoins et les groupes de souris traitées ($P < 0,05$). Les volumes des tumeurs des animaux traités sont restés constants entre le 14^{ième} et le 20^{ième} jour. Cela suggère une inhibition de la croissance cellulaire au cours de cette période.

Nos résultats démontrent que l'administration de l'artémisinine par voie orale réduit significativement le volume des tumeurs solides chez les souris des groupes traités par rapport au témoin négatif ($P < 0,05$). En plus, ce traitement a permis d'augmenter la durée de survie, des souris porteuses de tumeur comparativement aux souris non traitées (données non montrées).

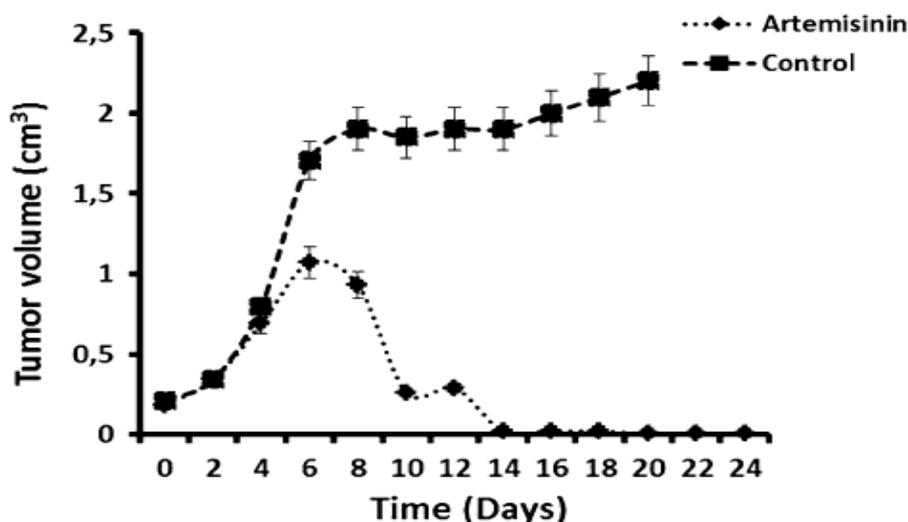


Figure 41 : Effet de l'artémisinine sur l'évolution du volume tumoral chez les souris DBA2.

Effet de l'artémisinine sur Les cellules (PBMC)

La majorité des les médicaments anti-cancéreux cliniquement approuvés sont caractérisés par une fourchette de doses thérapeutiques étroite, qui résulte principalement d'une toxicité systémique élevée de ces drogues. Pour cette raison, nous avons testé l'artémisinine contre des cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC), afin de déterminer ses effets sur les cellules normales (non tumorales). Les résultats obtenus (Figure 42), montrent qu'il n'y a pas d'activité cytotoxique de l'artémisinine contre les cellules(PBMC) normales qui ont été obtenues à partir de donneurs volontaires normaux sous surveillance médicale.

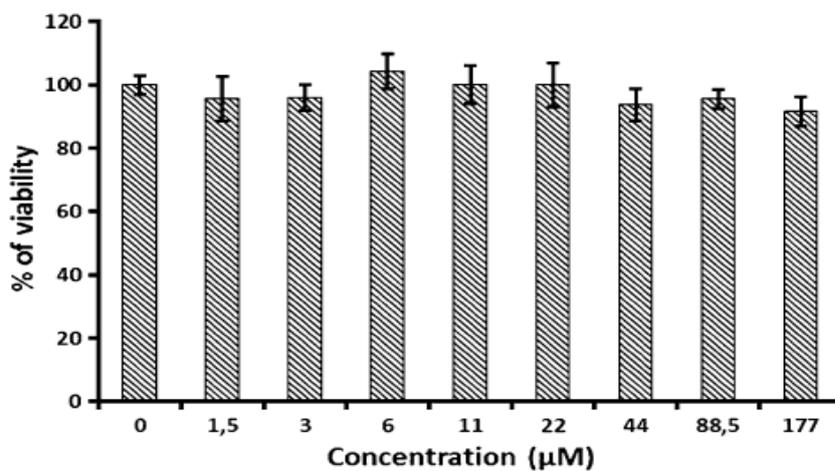


Figure 42: Effet de l'artémisinine contre les cellules PBMC.

La séparation de ces PBMC a été effectuée par centrifugation sur le Ficoll-Hypaque. Elles ont été ensuite incubées pendant 48 h en présence de différentes concentrations de l'artémisinine (0 à 177 µM). Après quoi la viabilité a été évaluée par le test MTT comme décrit dans matériel et méthodes. Les données sont des moyennes \pm écart type de trois expériences en double.

B-2- Discussion et conclusions (2) :

Dans cette étude, les activités antiprolifératives *in vitro* de l'artémisinine ont été testées sur la lignée cellulaire du mastocytome murin (P815) et la lignée cellulaire l'adénocarcinome du rein de hamster (BSR).

Ces activités ont présenté un comportement temps et dose dépendant. D'autres investigations ont conduit à cette conclusion lorsque la cytotoxicité de l'artémisinine a

été testée sur la lignée H69 du carcinome du poumon à petites cellules (SCLC) (Lai and Singh, 2006). D'autre part, nous rapportons ici des propriétés cytotoxiques différentielles de l'artémisinine comme le montre la Figure 37. En fait, la cinétique de cytotoxicité et les valeurs des IC_{50} étaient dépendant des cellules cibles. Comparée à la lignée BSR, la lignée P815 a été la plus sensible à l'activité cytotoxique de l'artémisinine ($IC_{50} = 52 \mu M$ contre $IC_{50} = 12 \mu M$, respectivement).

En effet, les cellules leucémiques contiennent normalement un excès de fer dans leur cytoplasme et la réactivité de l'artémisinine est renforcée par la présence de ces ions de fer. En effet et de manière intéressante, des lymphocytes humains normaux ont présenté une faible sensibilité à l'artémisinine (Lai and Singh 1995). Au niveau moléculaire, les molécules de l'artémisinine sont initialement activées par le clivage de l'endoperoxyde par le fer du hème intracellulaire (Wiesner et al., 2003 ; O'Neill et al., 2010)]. Les événements biochimiques ultérieurs et les cibles cellulaires de l'artémisinine, restent toutefois peu clairs. Il a été proposé que le transfert d'un atome d'oxygène du groupe peroxyde de l'artémisinine à l'ion fer chélaté génère une espèce $Fe(IV) = O$ (O'Neill et al., 2010, Posner et al., 1995). Les radicaux libres intermédiaires qui en résultent peuvent tuer la cellule cible en alkylants et en endommageant les protéines cellulaires (O'Neill et al., 2010, Zhu et al., 2013).

Dans le présent travail, en utilisant deux méthodes différentes, nous avons pu conclure que l'artémisinine induit l'apoptose dans les cellules P815 et non dans les cellules BSR. En fait, les fragments apoptotiques de l'ADN ont été détectés dans les électrophorèses sur gel d'agarose lorsque les cellules P815 ont été utilisées comme cible (Figure 39). Au contraire, aucune fragmentation apoptotique de l'ADN n'a été observée pour les cellules BSR.

Ces résultats ont été confirmés par les essais de marquage à l'annexine-V de l'extériorisation de la phosphatidylserine. L'observation en microscopie de fluorescence montre la liaison de la streptavidine-fluorescéine isothiocyanate (FITC) à l'annexine-V (Figure 40). En effet, un pourcentage élevé de cellules positives à l'annexine V ont été détectées dans les cellules P815 (99,2%) mais dans les cellules BSR, il y avait un faible pourcentage de cellules positives (19%).

Une augmentation de la taille des cellules BSR traitées à l'artémisinine a été observée. Cette augmentation est caractéristique de la voie de la mort cellulaire nécrotique (Healy et al., 1998).

La capacité de l'artémisinine à induire l'apoptose dans les cellules P815 est en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont trouvé que l'artémisinine et ses dérivés induisent l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Singh et al., 2004 ; Mercer et al., 2007). Cet effet peut se produire lors de la phase G1 du cycle cellulaire (Li et al., 2001). Cela est compréhensible puisque l'expression du récepteur de la transferrine ainsi que l'absorption accrue du fer se produit au cours de cette phase.

D'autre part, l'évaluation de la synergie ou de l'antagonisme des agents utilisés en association fait partie intégrante du développement de la chimiothérapie anticancéreuse. Notre investigation s'est intéressée à l'examen de l'effet synergique de l'artémisinine combinée à la vincristine qui est un inhibiteur de l'intégrité des microtubules de la cellule, et donc un inhibiteur de la formation du fuseau achromatique. Cet essai a été mené en utilisant la méthode de Chou et Talalay (Chou et Talalay 1984). Ces deux molécules présentaient une cytotoxicité prononcées *in vitro* lorsqu'elles sont utilisées seules contre les cellules P815 et contre BSR. La synergie de la vincristine (54 et 27 μM) avec artémisinine à la dose IC_{30} (3 μM) a été observée pour les cellules P815. Toutefois, l'effet antagoniste a été montré à des doses plus faibles de la vincristine. En ce qui concerne les cellules BSR, l'interaction entre la vincristine (54 et 27 μM) avec l'artémisinine à la concentration fixe de IC_{30} (10 μM) est du type presque additif. Néanmoins, au-dessous de la dose de 27 μM de vincristine, l'antagonisme survient.

L'interaction entre la vincristine et l'artémisinine n'a pas été décrite dans la littérature. À notre connaissance, la présente étude fournit les premières données sur l'interaction de l'artémisinine et la vincristine. Nous postulons cependant, que ces résultats peuvent révéler l'existence d'un mécanisme (s) d'interactions différentiel (s) de la vincristine et de l'artémisinine dans les cellules P815 et BSR. En outre, ces résultats peuvent avoir un intérêt pharmacologique parce qu'un médicament anticancéreux peut être anti-proliférateur à des concentrations faibles et cytocide à des concentrations élevées (Zhao et al., 2004).

Pour savoir quelle est la pertinence clinique de l'artémisinine *in vivo*, des essais ont été effectués dans le modèle de souris DBA2 / P815 (H2d) de souris porteuses de tumeur.

Nous rapportons qu'une régression du volume de la tumeur a été observée chez les souris traitées par l'artémisinine (Figure 41). L'activité anti-tumorale de l'artémisinine est peu décrite dans la littérature, bien que d'autres auteurs aient rapporté que la prise orale journalière de l'artémisinine pourrait prévenir ou retarder le développement du

cancer du sein chez le rat (Lai et Singh, 2006). En effet artémisinine réduit le nombre et la taille des tumeurs expérimentales induites par l'agent cancérigène (7,12-diméthylbenz [a] anthracène). Récemment, Chen et al., a établi que la dihydroartémisinine, un dérivé de l'artémisinine, inhibe la croissance des cellules du cancer ovarien chez les souris. En effet, aux doses de 10 et 25 mg / kg respectivement, cette molécule a donné lieu à 24 et à 41% d'inhibition de la croissance tumorale par rapport aux souris témoins, dans le modèle A2780 de tumeur xénogreffe ($P < 0,05$), et respectivement de 14 et de 37% d'inhibition de la croissance tumorale dans le modèle OVCAR-3 ($P < 0,05$) (Chen et al., 2009). En outre, l'artésunate, un autre dérivé l'artémisinine, a pu diminuer la densité des micro-vaisseaux de la tumeur et a réduit la croissance tumorale sans toxicité apparente chez des animaux à 50 et à 100 mg /kg/jour, respectivement. D'autres auteurs ont décrit l'effet anti-angiogénique des analogues de l'artémisinine (Chen et al., 2004 ; Lai et al., 2013). Récemment, Steglich et al. (Steglich et al., 2012) ont indiqué que les deux dérivés de l'artémisinine, SM616 et GHP-AJM-3/23, pourrait être un inhibiteur efficace de la Pglycoprotéine pour traiter le cancer (Steglich et al., 2012).

L'artémisinine peut affecter le développement et la croissance du cancer par l'intermédiaire de divers mécanismes. Un mécanisme possible est que cette molécule tue sélectivement les cellules pré-cancéreuses. L'artémisinine réagit avec le fer pour former des radicaux libres qui tuent les cellules. Diverses études ont suggéré l'implication du fer dans le développement de lésions pré-cancéreuses. Par exemple, l'accumulation du fer précède la formation de tumeurs dans le cas de la tumeur du foie induite par le biphenyle polycholiné (Whysner and Wang, 2001).

Conclusion

En conclusion, notre étude démontre que l'artémisinine provoque des effets cytotoxiques différentiels en fonction non seulement de la concentration et du temps d'exposition, mais aussi en fonction de la lignée de cellules cibles. Nous avons signalé pour la première fois que l'artémisinine peut induire une lyse cellulaire par apoptose en fonction du type de cellules cancéreuses.

En outre, nous avons signalé que l'administration orale l'artémisinine a inhibé significativement la croissance tumorale de P815 chez des souris DBA2. Cette activité a été associée à une amélioration de la survie des souris porteuses de tumeurs (données

non présentées). D'autre part, ceci est le premier rapport sur l'interaction *in vitro* entre l'artémisinine et la vincristine. Notre étude fournit une base pour les futures études cliniques de l'artémisinine, utilisée toute seule ou en combinaison avec des drogues anticancéreuses conventionnelles. Nous pensons qu'une thérapie à base de mécanisme adjuvant, de l'artémisinine peut potentiellement améliorer l'efficacité clinique de manière significative.

Cette recherche, ainsi que les résultats antérieurs, contribueront à améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'artémisinine et de ses dérivés utilisables comme des agents anti-cancéreux.

Cette recherche, ainsi que les résultats antérieurs, contribueront à améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'artémisinine et de ses dérivés utilisables comme des agents anti-cancéreux.

TROISIEME PARTIE

CONCLUSIONS GENERALES

Lors de ce travail de thèse, nous avons abordé pour la première fois quelques aspects concernant le potentiel anti-tumoral des extraits de la propolis produite localement. Nous avons aussi procédé à une investigation des effets anti-tumoraux d'une molécule, l'artémisinine, originaire de la plante *Artemisia annua*. Ces études comprennent des essais cellulaires et moléculaires *in vitro* et des essais *in vivo* sur des souris du modèle DBA2/H2D. L'étude de la combinaison des extraits de propolis et de l'artémisinine en cytotoxicité nous ont aussi permis pour la première fois de confirmer le mode d'action de l'artémisinine ainsi que l'effet antagoniste des extraits de propolis contenant des flavonoïdes et autres molécules ayant un grand potentiel cytotoxique sélectif et antioxydant, contre l'action cytotoxique de l'artémisinine essentiellement basée sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Concernant la propolis, cette étude vise à évaluer le potentiel antitumoral *in vitro* et *in vivo* des extraits de la propolis marocaine récoltée dans la région de Beni Mellal. Pour les essais *in vitro* Trois lignées cellulaires tumorales de mammifères ont été utilisées: BSR (adénocarcinome rénal du hamster), Hep-2 (carcinome du larynx humain) et P815 (mastocytome murin). L'extrait éthanolique de la propolis (EEP), ainsi que son extrait à l'acétate d'éthyle (EAEP), exercent une activité cytotoxique *in vitro* d'une manière dose dépendante. Les valeurs des IC50 sont comprises entre 15 et 38 µg/mL. Cette activité ne dépend pas seulement de la composition chimique de l'extrait (analyse par HPLC / ESI-MS), mais elle dépend aussi des cellules tumorales cibles. L'effet cytotoxique de ces extraits sur les cellules mononucléaires du sang périphérique humain normales (PBMC) a été très faible comparativement à celui induit sur les cellules tumorales.

D'autre part, le traitement par voie orale des souris (DBA2 / P815) portant des tumeurs, avec l'extrait éthanolique de propolis (5 mg par souris tous les quatre jours, cinq fois pour le groupe A, et 2,5 mg par souris tous les quatre jours, cinq fois pour le groupe B) réduit significativement le volume de la tumeur (1,2cm³ pour le groupe A et 2,7 cm³ pour le groupe B au 22^{ème} jour après la greffe de la tumeur). Essais effectués avec répétitions. Ces effets sont statistiquement significatifs par rapport à ceux obtenus avec les souris greffées par la tumeur et non traitées (volume tumoral 3,5 cm³ au 22^{ème} jour).

Concernant l'artémisinine (ART), l'étude s'est intéressée à l'effet de cytotoxicité différentielle de l'artémisinine sur les lignées de cellules tumorales P815 (mastocytome murin) et la lignée BSR (adénocarcinome du rein de hamster). La cytotoxicité a été mesurée par l'inhibition de la croissance en utilisant le test MTT. Ces études de cytotoxicité *in vitro* ont été complétées par l'étude de l'apoptose par électrophorèse de l'ADN apoptotique fragmenté et par la détection de la phosphatidylsérine exposée à la surface des membranes des cellules en apoptose par le marquage à l'annexine V-streptavidine-FITC (Vermes et al., 1995). En outre, nous avons examiné la synergie *in vitro* entre artémisinine et la drogue utilisée en chimiothérapie, la vincristine. L'étude *in vivo* est effectuée sur les souris du modèle murin (DBA2/H2d)/ P815.

Les valeurs des IC₅₀ obtenus lors des essais de cytotoxicité de l'artémisinine sont 12 µM pour P815 et 52µM pour BSR). D'autre part, l'apoptose a été induite chez P815, mais pas induite dans BSR. Ces données révèlent un effet cytotoxique différentiel intéressant en fonction de la concentration, du temps d'exposition et des cellules cibles.

Cela suggère l'existence d'interactions moléculaires différentes entre les lignées de cellules étudiées et l'artémisinine.

In vivo, nos résultats montrent clairement que l'administration orale de l'artémisinine a inhibé le développement des tumeurs solides chez les souris DBA2/H2d. Nos résultats démontrent que l'artémisinine présente des effets cytotoxiques différentiels.

Nous montrons pour la première fois que la combinaison de l'artémisinine avec les extraits de propolis d'origine marocaine (EEP et EAEP) aboutit à l'antagonisme en ce qui concerne la cytotoxicité de l'artémisine vis-à-vis des cellules P815. Ces résultats, confirment en même temps le mode d'action cytotoxique de l'ART. Cet effet antagoniste des extraits est dose dépendant en présence d'une dose fixe de l'ART (IC₃₀). En effet, cette molécule produit son effet cytotoxique par la génération de peroxydes (ROS) suite à la réaction de son noyau trioxane (endoperoxyde) avec le fer ferreux au sein des cellules. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi produites vont tuer les cellules en oxydant les lipides membranaires et d'autres structures vitales des cellules. Quand ce mode d'action, démontré et prouvé par différents auteurs, est affronté par l'action antioxydante des molécules contenues dans les extraits de propolis, il en résulte cet effet antagoniste évident. Ce phénomène est du à la capacité des cellules à réagir aux molécules cytotoxiques en mettant en œuvre des récepteurs de différentes natures capables d'internaliser des molécules ainsi que des signaux à même de répondre à leur

besoin de réparation et de protection de leur structures et fonctions cellulaires vitales. Ces résultats mettent aussi en évidence et confirment de manière très intéressante le mode d'action de l'artémisinine ainsi que les interactions éventuelles entre les produits naturels et les drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

Abdin MZ, Israr M, Rehman RU, Jain SK 2003. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med* 69 : 289–299.

Ait Mbarek L, Ait Mouse H, ELAbbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A 2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res* 40: 839-847.

Akao Y, Maruyama H, et al. 2003. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 26(7):1057-9.

Alberghina L, Chiaradonna F, Vanoni M 2004. Systems biology and the molecular circuits of cancer. *ChemBiochem* 5: 1322–1333.

Alfonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC et al. 2006. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 480–489.

Algamal MA, Marei GIK, Saad MM, Abdelgaleil SA 2013. Antimicrobial and Phytotoxic Properties of Artemisinin and Related Derivatives. *World Appl Sci J* 28: 1382–1388.

Allred DC 2010. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 41: 134–8.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al.. 2008. Intercellular Transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10(5):619-24.

American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2015. American Cancer Society: Atlanta, GA, USA, 2015.pp: 56.

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, et al.2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195(10):1303-16.

Arvigo R and Balick MJ 1993. Rainforest remedies: one hundred healing herbs of Belize (Lotus Press).

Araujo Maria José AM, Dutra R Pet al., 2010. Effect of propolis of *Scaptotrigona aff. postica* on the development of the tumor of Ehrlich in mice. *Rev Bras Farmacogn* 20: 580-587.

Aung T et al. 2011. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *PNAS* 108 (37): 15336-41.

Balunas MJ, Su B, Brueggemeier RW, Kinghorn AD 2008. Natural products as aromatase inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 8 (6): 646–82.

Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S 2002. Aniproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 80(1):67-73.

Belmonte FM and Moreno MP 2012. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer* 12: 23-38.

Bhakuni DS, Goel AK, Jain S, Mehrotra BN, Patnaik GK, Prakash V 1988. Screening of Indian plants for biological activity: Part XIII. *Indian J Exp Biol* 26: 883–904.

Bhakuni DS, Goel AK, Goel AK, Jain S, Mehrotra BN, Srimal RC 1990. Screening of Indian plants for biological activity: Part XIV. *Indian J Exp Biol* 28 : 619–637.

Blanpain C 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol* 15 (2): 126-134. DOI: 10.1038/ncb2657

Boing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R 2008. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets* 19(2):96-103.

Bonner J, Harari P, Giralt J, Azarnia N, Shin D, Cohen R, et al. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567–78.

Borrelli F 2002. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia* 73 suppl. 1: S38-S43.

Borska S, Sopel M, Chmielewska M, Zabel M, Driegiel P 2010. Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. *Molecules* 15: 857-870.

Brada M, Pijls-Johannesma M, De Ruyscher D 2007. Proton therapy in clinical practice: Current clinical evidence. *Journal of Clinical Oncology* 25(8):965–970.

Brown EJ, Baltimore D 2003. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes & Development* 17 (5): 615–28.

Buommino E, Baroni A, Canozo N, Petrazzuolo M, Nicoletti R, Voza A, Tufano MA 2009. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating $\alpha\beta 3$ integrin and reducing metalloproteinase 2 production. *Invest New Drugs* 27: 412–418.

Cala AC, Ferreira JF, Chagas ACS, Gonzalez JM et al. 2014. Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts in vitro and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Parasitol Res* 113: 2345–2353.

Chabner BA, Roberts TG Jr 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature reviews Cancer* 5:65–72.

Chauvergne J, Hoerni B 2001b. Chimiothérapie anticancéreuse. Elsevier Masson ed. 116 pp.

Chen CN, Weng MS, Wu CL, Lin JK 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 175-185.

Decastro SL, Higashi KO 1995. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 46: 55-58.

Chen CN, Weng MS, Wu CL, Lin J-K 2004. Comparison of radical scavenging activity, Cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *eCAM1* (2): 175-185.

Chen HH, Zhou HJ, Wu GD, Lou XE 2004a. Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis and on expressions of vascular endothelial growth factor and VEGF receptor KDR/flk-1. *Pharmacology* 71: 1–9.

Chen HH, Zhou HJ, Fang X. 2003. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacol Res* 48:231-6.

Chen PQ, Li GQ, Guo XB, He KR, Fu YX, Fu LC, Song YZ 1994. The infectivity of gametocytes of *Plasmodium falciparum* from patients treated with artemisinin. *Chin Med J (Engl.)* 107: 709–711.

Chou TC, Talalay P 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27–55.

Christen P, and Veuthey JL 2001. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Curr Med Chem* 8 : 1827–1839.

Connell PP, Hellman S 2009. Advances in radiotherapy and implications for the next century: A historical perspective. *Cancer Research* 69(2):383–392.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, et al. 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 364:1817–1825.

Cooper GM 1993. The cancer book: a guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer (Jones & Bartlett Learning).

Craig C, Maroun J, Zuraw L 2002. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable gastric cancer? A practice guideline. Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative. Gastrointestinal Cancer Disease Site Group. *Can J Surg* 45(6): 438–446.

De Almeida EC, Menezes H 2002. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: A Review. *J Venom Anim Toxins* (8) 2: 191-212.

J Venom Anim Toxins (8) 2: 191-212.

Deng, X., Liu, Z., Liu, F., Pan, L., Yu, H., Jiang, J., Zhang, J., Liu, L., and Yu, J. (2013). Holotransferrin enhances selective anticancer activity of artemisinin against human hepatocellular carcinoma cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 33: 862–865.

DeVita Jr. VT and Chu E 2008. A History of Cancer Chemotherapy . *Cancer Res* 68 (21): 8643-53.

DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, Weinberg RA, et DePinho RA 2008. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins. 1680 pp.

Dhingra V, Pakki SR, Narasu ML, et al. 2000. Antimicrobial activity of artemisinin and its precursors. *Curr Sci* 78 : 709–713.

Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Bankova V, Nikolov N, Popov S 1991. Immunomodulatory action of propolis. Influence of anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie* 22: 65-62.

Ding S, Dudley E, Plummer S, Tang J, Newton RP, Brenton AG 2008. Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. *Phytochemistry* 69: 1555-64.

Dobson MJ 1998. Bitter-sweet solutions for malaria: exploring natural remedies from the past. *Parasitologia* 40: 69–81.

Doherty B et al. 2014. Collateral sensitivity to cisplatin in KB-8-5-11 drug-resistant cancer cells. *Anticancer Research* 34: 503 - 508.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 9(1):R6.

Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, and Sykes DP 2011. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer *Colorectal Disease*. The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. 14, e31–e47.

Efferth T 2007. Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—from bench to bedside. *Planta Med* 73 : 299–309.

Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM et al. 2002. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med* 80 : 233–242.

Efferth T, Benakis A, Romero MR et al. 2004. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med* 37: 998–1009.

Eldahshan OA 2011. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of carob leaves grown in Egypt. *Curr Res J Biol Sci* 3: 52-55.

Elmore S 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516.

Engels C, Grater D, Esquivel P, Jimenez VM 2011. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Res Int* doi 10.1016/j.foodres.2011.04.003.

Fauvel B, YasriA 2014. Antibodies directed against receptor tyrosine kinases: Current and future strategies to fight cancer. *MAbs* 6(4): 838–851.

Ferlay J, Randi G, Bosetti C, Levi F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C 2008. Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU international*. 101:11–19.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 *Int. J. Cancer* 127: 2893–2917.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 49: 1374– 1403.

Fillebeen C, Rivas-Estilla AM, Bisailon M et al. 2005. Iron inactivates the RNA polymerase NS5B and suppresses subgenomic replication of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 280 : 9049–9057.

Galal AM, Ross SA, Jacob M, ElSohly MA 2005. Antifungal activity of artemisinin derivatives. *J Nat Prod* 68 : 1274–1276.

Gelb MH 2007. Drug discovery for malaria: a very challenging and timely endeavor. *Curr Opin Chem Biol* 11 440–445.

Ghielmini M, Schmitz S-F H, Cogliatti SB, Pichert G, Hummerjohann J, Waltzer U, et al. 2004. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood* 103:4416–23.

Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisininins. *Int J Parasitol* 36: 1427–1441.

Gong J, Jaiswal R, Mathys, J-M 2012. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treatment Reviews* 38:226–234.

Grifo F, Newman D, Fairfield AS, Bhattacharya B and Grupenhoff JT 1997. The origins of prescription drugs. *Biodivers Hum Health* 131–163.

Grzeschik NA, Parsons LM, Allott ML, Harvey K F and Richardson HE 2010. Lgl, aPKC, and Crumbs Regulate the Salvador/Warts/Hippo Pathway through Two Distinct Mechanisms *Current Biology* 20: 573–581.

Guertin DA and Sabatini DM 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12:9–22.

Hampel B, Efferth F et al. 2015. New efficient artemisinin derived agents against human leukemia cells, human cytomegalovirus and Plasmodium falciparum: 2nd generation 1,2,4-trioxane-ferrocene hybrids. *Eur J Med Chem* 97 : 164–172.

Hanahan D & Weinberg RA 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57–70.

Hanahan D & Weinberg R.A 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.

Han J, Ye M, Sun J, Wang B, Guo D 2007. Characterisation of flavonoids in the traditional Chinese medicine-huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 848:355-362.

Havsteen B 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 32(7): 1141-8.

Hegazi AG, Abd El Hady FK, 2002. Egyptian propolis: 3. Antioxydant, Antimicrobial activities and Chemical Composition of propolis from Reclaimed Lands. *Z Naturforsch* 57c: 395-402.

Herrerias T, Oliveira AA, Belem ML, Oliveira BH, Carnieri EGS, Cadena SMSC, Noletto GR, Martinez GR, Oliveira MBM, Rocha MEM 2010. Effects of natural flavones on membrane properties and cytotoxicity of HeLa cells. *Rev Bras Farmacogn* 20: 403-408.

Hollands I, Vidal A, Gra B, Sotolongo M 1991. Evaluation of the subchronic toxicity of Cuban propolis. *Rev Cubana Cienc Vet* 22: 91-100.

Hunt P, Afonso A, Creasey A, Culleton R et al. 2007. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol* 65 : 27–40.

Hussein MN, Boing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R 2007. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* 98(5):1096-107.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335–42.

Jaafari A, Ait Mouse H, Rakib EM, Ait M'barek L, Tilaoui M, Benbakhta C, Boulli A, Abbad A, Zyad A 2007. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Rev Bras Farmacogn* 17: 477-491.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D 2011. Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin* 61(2):69-90.

Jensen PB et al. 1993. Different modes of anthracycline interaction with topoisomerase II. Separate structures critical for DNA-cleavage, and for overcoming topoisomerase II-related drug resistance. *Biochem Pharmacol* 45(10):2025-35.

Jiao Y, Ge C, Meng Q, Cao J, Tong J, Fan S 2007. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth. *Acta Pharmacol Sin* 28 : 1045.

Kaminski MS, Tuck M, Estes J, Kolstad A, Ross CW, Zasadny K et al. 2005. I-Tositumomab Therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N Engl J Med* 352:441-9.

Kaneeda J, Nishina T 1994. Safety of propolis: acute toxicity. *Honey Bee Sci* 15: 29-33.

Kapiszewska M, Miskiewicz M, Ellison PT, Thune I, Jasienska G 2006. High tea consumption diminishes salivary 17 β -estradiol concentration in Polish women. *British Journal of Nutrition* 95 (5): 989-95.

Kaufmann SH and Hengartner MO 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-534.

Kerboeuf D, Riou M, Guégnard F 2008. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini Rev Med Chem* 8 : 116-128.

Kavanagh BD, Timmerman RD 2006. Stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiation therapy: An overview of technical considerations and clinical applications. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 20(1):87-95.

Kim WS, Choi WJ, Lee S, Kim WJ et al. 2015. Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L. *Korean J Physiol Pharmacol* 19 : 21-27.

Klayman DL 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 228: 1049-1055.

Kombila M, Duong TH, Dufillot D, Koko J, Guiyedi V, Guiguen C, Ferrer A and Richard-Lenoble D 1997. Light microscopic changes in *Plasmodium falciparum* from Gabonese children treated with artemether. *Am J Trop Med Hyg* 57: 643-645.

Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Voknizevic S, 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm* (54) 65-72.

Kroemer G, Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC 2008. To Die or Not to Die: That is the Autophagic Question. *Current Molecular Medicine* 8:78-91.

Kumar N, Zheng H 1990. Stage-specific gametocytocidal effect in vitro of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 76: 214–218.

Lacave R, Larse CJ, Robert J 2005. *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext.438 pp.

Lam MG, de Klerk JM, van Rijk PP, Zonnenberg, BA 2007. Bone seeking radiopharmaceuticals for palliation of pain in cancer patients with osseous metastases. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2007 7(4):381–397.

Lamson DW and Matthew Brignall S 1999. Antioxidants in Cancer Therapy; Their Actions and Interactions With Oncologic Therapies. *Altern Med Rev* 4(5):304-329.

Lansdorp PM 2000. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech. Ageing Dev.* 118:23-34.

Lai H, Sasaki T, Singh NP, Messay A 2005. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sci* 76: 1267–1279.

Lai H, Singh NP 1995. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Lett* 91: 41–46.

Lawrence TS, Ten Haken RK, Giaccia A. Principles of Radiation Oncology. In: DeVita VT Jr., Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008.

Xu L et al. 2016. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 mapk/ jnk activation. *Tumor Biology* p: 1-9.

Li W, Qiu Y, Patterson CA, Beta T 2011. The analysis of phenolic constituents in glabrous canary seedgroats. *Food Chem* 127: 10-20.

Li Y, Shan F, Wu JM, Wu GS, Ding J, Xiao D et al. 2001. Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 5–8.

Maloney D, Grillo-López A, White C, Bodkin D, Schilder R, Neidhart J, et al. 199. IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 90:2188–95.

Marcucci MC, 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutics activity. *Apidologie* 26, 83-99.

Maréchal V, Quignon F 2013. Virus et cancers humains : des virus modèles aux nouvelles étiologies. *Revue Francophone des Laboratoires* 456 : 37- 46.

Marques R, Sousa MM, Oliveira MC, Melo MJ 2009. Characterization of weld (*Reseda luteola* L.) and spurge fax (*Daphne gnidium* L.) by high performance liquid chromatography-diode array detection- mass spectrometry in Arraiolos historical textiles. *J Chromatogr A* 1216: 1395-1402.

Marusyk A, Polyak K 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805(1):105-117.

Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, et al. 2011, The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO Journal* 30(13):2719-2733.

Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JP 2006. Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* ;98(18):1285–1291.

Mause SF and Weber C 2010. Microparticles : Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circulation Research* 29:1048-1057.

Mercer AE, Maggs JL, Sun XM et al. 2007. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds. *J Biol Chem* 282: 9372–9382.

Merali S, Meshnick SR 1991. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to artemisinin in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1225–1227.

Mignatti P et Rifkin DB 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological reviews*. 73:161–195.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56 (2):185–229.

Mirnezami R, Nicholson J, Darzi A 2012. Preparing for precision medicine. *N Engl J Med*, 366(6):489–491.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182):1069-75. doi: 10.1038/nature06639.

Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, Cocca C et al. 2005. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* 29:149-161.

Mossman T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Newman DJ, Cragg GM and Snader KM 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66 : 1022–1037.

Naesens L, Bonnafous P, Agut H, De Clercq E 2006. Antiviral activity of diverse classes of broad-acting agents and natural compounds in HHV-6-infected lymphoblasts. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am Soc Clin Virol* 37 Suppl 1 : S69–S75.

Nagamune K, Moreno SN, Sibley LD 2007. Artemisinin-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* have altered calcium homeostasis. *Antimicrob Agents Chemother* 51 : 3816–3823.

Ni X, Chen Y 2001. [In vitro study of the anti-pneumocystis carinii effect of artemisinin derivatives]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi Chin. J Tuberc Respir Dis* 24 : 164–167.

Olsen DR, Bruland OS, Frykholm G, Norderhaug, IN2007. Proton therapy-a systematic review of clinical effectiveness. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 83(2):123–132.

Om AS, Chung KW 1996. Dietary zinc deficiency alters 5 α -reduction and aromatization for testosterone and androgen and estrogen receptors in rat liver. *The Journal of Nutrition* 126(4):842–8.

O'Neill PM, Barton VE, Ward SA 2010. The molecular mechanism of action of artemisinin; the debate continues. *Molecules* 15: 1705–1721.

O'Neill PM, GH Posner 2004. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* 47:2945-2964.

Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, Bankova V 2000. Immuno-modulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 6: 205-219.

Orsi RO, Sforcin JM, Funari S RC, V Bankova 2005. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology* 5 : 359–368.

Orsolich N, Basic I 2003. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of anti-tumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology* (84) 265-273.

Orsolich N, Terzic S, Sver L, Basic I 2005. Honey bee products in prevention and/or therapy in murine transplantable tumours. *J Sci Food Agric* 85: 363-370.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK 2012: Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation* 45: 487–498.

Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL, Chauhan VS 1999. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *J Biol Chem* 274 :19383–19388.

Passos JF, Saretzki G, Von Zglinicki T 2007. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 35:7505-7513.

Paeshuyse J, Coelmont L, Vliegen I et al. 2006. Hemin potentiates the anti-hepatitis C virus activity of the antimalarial drug artemisinin. *Biochem Biophys Res Commun* 348 : 139–144.

Penfornis P, Vallabhaneni KC, Whitt J and Pochampally R 2016. Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int. J. Cancer*: 138, 14–21.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology* 17:421–433.

Piccart-Gebhart M, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659–72.

Pietta PG, Gardana C, Pietta AM 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1: S7-S20.

Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 12 : 221–228.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 4 : 25-39.

Posner GH, Cumming JN, Ploypradith P, Oh CH, 1995. Evidence for Fe(IV) =O in the molecular mechanism of action of the trioxane antimalarial artemisinin. *J Am Chem Soc* 117: 5885–5886.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, and Gabai VL 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res* 283:1-16.

Puri SK, Chandra R 2006. Plasmodium vinckei: selection of a strain exhibiting stable resistance to arteether. *Exp Parasitol* 114 : 129–132.

Qian RS, Li ZL, Yu JL, Ma DJ 1982. The immunologic and antiviral effect of qinghaosu. *J Tradit Chin Med* 2: 271–276.

Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, Takayama S and Wang HG 1996. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp Med Biol* 406:99-112.

Ridley RG 2003. To kill a parasite. *Nature* 424:887–889.

Robert A, Benoit-Vical F, Claparols C, Meunier B 2005. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 102 : 13676–13680.

Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA et al. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440 :940–943.

Roninson, I.B., E.V. Broude, et B.D. Chang. 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat.* 4:303-313.

Rove KO, Crawford ED 2013. Androgen annihilation as a new therapeutic paradigm in advanced prostate cancer. *Current Opinion in Urology* 23(3):208-213.

Rovellini P, Cortesi N, Fedeli E 1997. Analysis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Rev Ital Sust Gras* 74: 273-279.

Sadava D, Phillips T, Lin C, Kane SE 2002. Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 179: 151-156.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73 (1): 39-85.

Sandler A, Gray R, Perry M, Brahmer J, Schiller J, Dowlati A, et al. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355:2542-50.

Sà Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM 2003. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *J Ethnopharmacol* 8: 93-97.

Sasco AJ 2008. Cancer and globalization. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62:110-121.

Scheller S, Krol W, Swiacik J, Owczarek S, Gabrys J, Shani J 1989. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. *Z Naturforsch* 44c: 1063-1065.

Schröder FH 2008. Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): A review of potential endocrine-mediated mechanisms. *European Urology* 53(6):1129-1137.

Sforcin JM, Kaneno R, Funari SRC 2002. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J Venom Anim Toxins* 8: 19-29.

Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V 2005. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 301-305.

Schulz-Ertner D, Jäkel O, Schlegel W 2006. Radiation therapy with charged particles. *Seminars in Radiation Oncology* 16(4):249-259.

Shackelford DB and Shaw RJ (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. *Nat Rev Cancer* 9(8): 563-575.

Siler U, Barella L, Spitzer V, Schnorr J, Lein M, Goralczyk R, Wertz K 2004. Lycopene and Vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the Dunning prostate cancer model. *FASEB Journal* 18(9):1019–21.

Silva de Souza P, Soares Faccion R, Sabbo Bernardo P, Ciuvalschi Maia R 2015. Membrane microparticles: shedding new light into cancer cell communication. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* p: 1-12.

Simirgiotis MJ, Silva M, Becerra J, Schmeda-Hirschman G 2012. Direct characterization of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS). *Food Chem* 131: 318-327.

Singh NP, Lai HC 2004. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Res* 24: 2277–2280.

Slade D, Galal AM, Gul W, Radwan MM, Ahmed SA et al. 2009. Antiprotozoal, anticancer and antimicrobial activities of dihydroartemisinin acetal dimers and monomers. *Bioorg Med Chem* 17: 7949–7957.

Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs F, Paton V, Bajamonde A, et al. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783–92.

Soussi T, Dehouche K, Bérout C, Soussi T, Sévenet N, Delattre O et Friguet B 2000. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains: le lien entre l'épidémiologie et la carcinogénèse. *médecine/sciences*. 16:1387–96.

Stratton MR 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331: 1553–1558.

Sternberg Z, Chadha K, Lieberman A, Hojnacki D, Drake A, Zamboni P, Rocco P, Grazioli E, Weinstock-Guttman B, Munschauer F 2008. Quercetin and interferon β modulate immune response(s) in PBMC isolated from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 205: 142-147.

Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, et al. 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment, *Cell Death and Disease* 4, e838; doi:10.1038/cddis.2013.350.

Sun J, Liang F, Bin Y, Li P, Duan C 2007. Screening non-coloured phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/ mass spectrometry libraries. *Molecules* 12: 679-693.

Suzuki I, Hayashi I, Takaki T S, Groveman D, Fujimiya Y 2002. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biotherapy & Radiochemicals* (17) 5: 553-562.

Swanson MS 2006. Autophagy: eating for good health. *J. Immunol.* 177:4945-4951.

Szabo D, Keyzer H, Kaisers HE, Molnar J 2000. Reversal of multidrug resistance of tumor cells. *Anticancer research* 20:4261–4274.

Szwed M, Kania KD, Jozwiak Z 2015. Molecular damage caused by generation of reactive oxygen species in the redox cycle of doxorubicin-transferrin conjugate in human leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma* 56(5):1475-83.

Szwed M, Laroche-Clary A, Robert J, Jozwiak Z 2016. Efficacy of doxorubicin-transferrin conjugate in apoptosis induction in human leukemia cells through reactive oxygen species generation *Cell Oncol* 39:107–118.

Targett G, Drakeley C, Jawara M, von Seidlein L et al. 2001. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J Infect Dis* 183 : 1254–1259.

Terkuile F, White NJ, Holloway P, Pasvol G, Krishna S 1993. *Plasmodium falciparum*: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp Parasitol* 76: 85–95.

Thatte U and Dahanukar S 1997. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 54(4):511-532.

Todde V, Veenhuis M and van der Klei IJ 2009. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792(1): 3-13.

Untch M, Thomssen C. Clinical practice decisions in endocrine therapy. *Cancer Investigation* 2010; 28 Suppl 1:4–13.

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 15:1153-1162.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39–51.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR and Berneman ZN 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84:627-639.

Vidak M, Rozman D, Komel R 2015. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on, Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. *Molecules* 20, 19406-19432.

Vredenburgh J, Desjardins A, Herndon J, Dowell J, Reardon D, et al. 2007. Phase II Trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 13(4): 1253–59.

Walker DJ, Pitsch JL, Peng MM, Robinson BL, Peters W, Bhisutthibhan J, Meshnick SR 2000. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrob Agents Chemother* 44 : 344–347.

Wallaart TE, van Uden W, Lubberink HG, Woerdenbag HJ, Pras N, Quax WJ 1999. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin. *J. Nat. Prod.* 62 :430–433.

Wang JW, Tan RX 2002. Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium. *Biotechnol Lett* 24 : 1153–1156.

Wang Y, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK 2006. The Red Wine Polyphenol Resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicological Sciences* 92 (1): 71–7.

Wang Z, Cui M, Song F, Lu L, Liu Z 2008. Evaluation of flavonoids binding to DNA duplexes by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 19: 919-922.

Weathers PJ, DeJesus-Gonzalez L, Kim YJ, Souret FF, Towler MJ 2004. Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugars. *Plant Cell Rep* 23: 414–418.

Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJ Jr, Kohn KW, Fojo T, Bates SE, Rubinstein LV, Anderson NL, et al. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science*. 1997; 275:343–349.

Whysner J, Wang CX 2001. Hepatocellular iron accumulation and increased cell proliferation in polychlorinated biphenyl-exposed Sprague–Dawley rats and the development of hepatocarcinogenesis, *Toxicol Sci* 62: 36–45.

Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M 2003. New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 5274–5293.

Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S 2005. Artemisinins. *Postgrad Med J* 81 : 71–78.

World Health Organization. Traditional medicine. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Accessed January 15, 2010.

Wu M, Ding HF, Fisher DE 2001. Apoptosis: Molecular Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences* / Nature Publishing Group / www.els.net. pages: 1-8.

Xue W, Zender L, Miething C et al. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 445:656-660.

Yang J and Weinberg RA 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the cross roads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14: 818-829.

Yoshikawa T, Kokura S, Naito Y, Kondo MA 1995. Novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res* 55: 1617-1620.

Yu W, Kan W, Yu P, Li M, Song J, Zhao F 2012. Anti-inflammatory effect and mechanism of artemisinin and dihydroartemisinin. *China J Chin Mater Medica* 37: 2618–2621.

Zamzami N and Kroemer G 2003. Apoptosis: Mitochondrial Membrane Permeabilization, The (W)hole Story? *Current Biology* 13: R71–R73.

Zhang S, Morris ME 2003. Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein mediated transport of digoxin and vinblastin in human intestinal Caco-2 cells. *Pharm Res* 20: 1184-1191.

Zhao L, Wientjes MG, Jessie LS 2004. Evaluation of Combination Chemotherapy: Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyses. *Clinical Cancer Research* 10: 7994–8004.

Zou L, Elledge SJ 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300 (5625): 1542–8.

Zunino F, Capranico G 1990. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Res* 5(4):307-17.