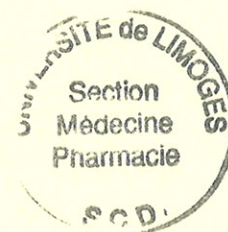


UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2010

THESE N° 3326 / 1

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 239013 0

**SUBSTANCES NATURELLES ANTICANCEREUSES
ET INHIBANT LA CHIMIORESISTANCE : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE ET TRAVAUX PERSONNELS**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 6 octobre 2010 à Limoges

PAR

Sandrine AUGET

Née le 13 janvier 1985 à Limoges (87)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur CHULIA Albert José
Monsieur MACIUK Alexandre, Maître de Conférences
Monsieur LIAGRE Bertrand, Maître de Conférences
Monsieur BOYER Philippe, Pharmacien

Président
Directeur
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2010

THESE N°

**SUBSTANCES NATURELLES ANTICANCEREUSES
ET INHIBANT LA CHIMIORESISTANCE : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE ET TRAVAUX PERSONNELS**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 6 octobre 2010 à Limoges

PAR

Sandrine AUGET

Née le 13 janvier 1985 à Limoges (87)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur CHULIA Albert José
Monsieur MACIUK Alexandre, Maître de Conférences
Monsieur LIAGRE Bertrand, Maître de Conférences
Monsieur BOYER Philippe, Pharmacien

Président
Directeur
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur **DUROUX** Jean-Luc, Professeur

VICE-DOYEN

Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences

VICE-DOYEN

Monsieur **BATTU** Serge, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

LOUDART Nicole

PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRACTICIENS HOSPITALIERS DES

DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN GIRY Karine	PHARMACIE GALENIQUE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BILOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOFTI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRACTICIENS HOSPITALIERS

DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
---------------------------------	-----------------------------------

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

"Le voyage de la découverte ne consiste pas à chercher de nouveaux paysages mais à voir les choses différemment." Marcel Proust

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier...

Mon directeur de thèse et maître de stage, **Monsieur Alexandre MACIUK**, Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour. Je vous remercie de m'avoir proposé un sujet de M2 aussi passionnant et aussi enrichissant. Vous m'avez guidé tout au long de ces six mois de stage et vos conseils m'ont été précieux pour mener à bien ce projet. auprès de vous, j'ai pu acquérir des compétences et des connaissances essentielles à mon avenir. Je vous remercie de la confiance et du temps que vous m'avez accordés.

Monsieur Albert-José CHULIA, Professeur de Pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Limoges, qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir donné goût à cette discipline si passionnante qu'est la pharmacognosie en m'accueillant dans votre laboratoire.

Monsieur Bertrand LIAGRE d'avoir accepté de juger ce travail. Croyez en mes sincères remerciements.

Monsieur Phillipe BOYER d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir accueillie dans votre équipe officinale tout au long de mon cursus universitaire.

L'équipe du laboratoire BioCIS UMR/CNRS 8076 pour son accueil chaleureux et sa disponibilité durant ces 6 mois de stage. Travailler avec vous a été un grand plaisir.

L'équipe de Christine FERNANDEZ sans qui je n'aurais pas pu tester l'activité de mes extraits, fractions ou produits purs. Je la remercie particulièrement d'avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à la culture cellulaire.

Je remercie...

Mes parents : merci de tout l'amour que vous m'avez donné pendant 25 ans. Si je suis arrivée à cette étape de mon parcours c'est aussi grâce à vous...

Mon frère : le paradoxe d'être si différents et d'être nés à 20 min d'intervalle... Je suis fière d'être ta Twin. Merci d'être là pour moi...

Ma sœur qui m'a toujours prise sous son aile... Ensemble nous avons fait tant de choses... J'ai d'innombrables souvenirs gravés dans mon esprit... J'espère que cela continuera encore longtemps...

Mes grands parents pour tous ces moments partagés avec vous...

Ma Jean Mich, tu étais présente en 1^{ère} section de maternelle... je suis sûre que nous nous retrouverons à 60 ans à discuter autour d'un bon repas dans un bon restaurant...

Mes amis, Jean-Charles, Emmanuelle et Antoine, Claire et Chocolat, Laure, Lydie... et tous les autres pour avoir passé de bons moments en votre compagnie et j'espère encore beaucoup d'autres à venir.

J'ai une pensée pour...

Mémé Tine, j'espère que tu vois que j'ai toujours bien appris mon poème....

ABREVIATIONS

A	absorbance
AA	acides aminés
ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	glycoprotéine P = P-gp
ACN	acétonitrile
AcOH	acide acétique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AE	acétate d'éthyle
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APCI	ionisation chimique à pression atmosphérique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BCA	acide bicinchonique
BHE	barrière hémato-encéphalique
BSA	bovine serum albumine
CC	chromatographie sur colonne
CCM	chromatographie couche mince
CDCl ₃	chloroforme deutérié
CDK	kinases cyclines dépendantes
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CMHP	comité des médicaments à usage humain
CMI	concentration minimale inhibitrice
CML	concentration minimale létale
CN	contrôle négatif
COMP	comité des médicaments orphelin
COSY	correlated spectroscopy
Cp	carbone primaire
CP	contrôle positif
CPC	chromatographie de partage centrifuge
Cq	carbone quaternaire
Cs	carbone secondaire
CsA	cyclosporine A
Ct	carbone tertiaire
CYP3A4	cytochrome P450 3A4
d	doublet
DCM	dichlorométhane
dd	doublet dédoublé
DL50	dose létale 50
DMSO	diméthylsulfoxyde amide
DO	densité optique

EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
EMEA	European MEDicines Agency
EP	éther de pétrole
EtOH	éthanol
FDA	Food and Drug Administration
GPNT	cellules GP8 neuro tech
HBSS	hank's balanced salt solution
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
HMBC	heteronuclear multiple bond corellation
HSQC	homonuclear multiple quantum correlation
IP	intrapéritonéale
iPrOH	isopropanol
IRM	imagerie par résonance magnétique
IV	intraveineuse
LMA	leucémie myéloïde aigüe
m	multiplet
MDR	multidrugs resistance
MeOH	méthanol
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium
NBD	nucleotide-binding domain
NCI	National Cancer Institute
OMS	Oragnisation Mondiale de la Santé
PBS	phosphate buffered saline
P-gp	glycoprotéine P = ABCB1
Pi	phosphate
PSA	antigène prostatique spécifique
Rh	rhodamine
RMN	résonance magnétique nucléaire
s	singulet
SA	Sandrine Auget
SC	surface corporelle
SM	spectrométrie de masse
SNC	système nerveux central
SVF	sérum de veau foetal
TMD	trans-membrane domain
UV	ultra-violet
VADS	voies aérodigestives supérieures
Vals	valsopodar
VO	voie orale
VP	vérapamil
λ	longueur d'onde

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	12
PREMIERE PARTIE	
LES PRODUITS NATURELS COMME SOURCE D'ANTICANCEREUX	13
1. Epidémiologie du cancer et surveillance en France	14
2. Les anticancéreux issus des produits naturels	19
3. Conclusion.....	41
DEUXIEME PARTIE	
LA RESISTANCE DES CELLULES CANCEREUSES AUX TRAITEMENTS.....	42
1. Les transporteurs impliqués dans le phénomène de MDR.....	43
2. Le rôle physiologique des transporteurs ABC	44
3. La protéine ABCB1	46
4. Les méthodes d'exploration du fonctionnement et de l'inhibition d'ABCB1	51
5. Les modulateurs d'ABCB1	52
6. Conclusion.....	57
TROISIEME PARTIE	
LES PRODUITS NATURELS COMME SOURCE D'INHIBITEUR D'ABCB1	58
1. Les terpènes.....	60
2. Les saponosides.....	66
3. Les polyphénols.....	73
4. Les alcaloïdes	79
5. Conclusion.....	87
QUATRIEME PARTIE	
TRAVAUX EXPERIMENTAUX PERSONNELS : GANODERMA, UNE SOURCE POTENTIELLE DE MODULATEURS D'ABCB1	88
1. Recherches bibliographiques : présentation de la drogue	89

2. Matériels et méthodes.....	93
3. Résultats	110
4. Conclusion et perspectives	121
CONCLUSION	123
BIBLIOGRAPHIE	125
ANNEXE 1	130
ANNEXE 2	135
ANNEXE 3	139
ANNEXE 4	140
TABLE DES MATIERES	142
TABLE DES ILLUSTRATIONS	148
SERMENT DE GALIEN	152

INTRODUCTION

Le cancer est un fléau mondial. En 2005, selon les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), parmi les 58 millions de décès à travers le monde, 13,1 % seraient imputables au cancer. Afin de diminuer l'ampleur de ce phénomène, il est nécessaire de détecter les cas très tôt et de trouver de nouveaux agents thérapeutiques, de nouveaux protocoles et de nouvelles stratégies.

La nature est l'une des principales sources de nouveaux agents thérapeutiques. Le règne végétal mais aussi le règne animal peuvent être exploités pour combattre le cancer. De nombreuses plantes ont montré une activité anticancéreuse. En effet, plus de 3000 espèces sont décrites comme ayant une activité contre le cancer. Il est estimé qu'environ 60 % des molécules anticancéreuses dérivent d'une façon ou d'une autre de produits naturels : plantes, microorganismes ou organismes marins.

Cependant, un phénomène de résistance aux traitements anticancéreux apparaît de plus en plus, ce qui explique l'échec ou l'échappement thérapeutique aux chimiothérapies. Les cellules cancéreuses sont capables de développer plusieurs mécanismes de survie permettant de lutter contre les médicaments. Certaines cellules sont capables de surexprimer des protéines de résistance aux traitements cytotoxiques. Ces protéines, présentes sur la surface des membranes cellulaires, jouent le rôle de pompes à efflux et sont capables de rejeter les médicaments anticancéreux.

Actuellement, il n'existe aucun médicament ciblant les mécanismes de résistance aux traitements cytotoxiques. Comprendre et élucider ces mécanismes de résistance en étudiant l'ensemble des protéines impliquées dans ce phénomène et en trouvant de nouvelles molécules capables de le contrecarrer, peut permettre d'avoir une nouvelle approche stratégique des traitements cytotoxiques.

Pour découvrir de nouvelles voies thérapeutiques, il est nécessaire d'étudier ce phénomène de façon pluridisciplinaire. L'exploration chimique des produits naturels est une étape fondamentale dans la recherche de nouvelles structures chimiques. L'utilisation du criblage bioguidé permet de déterminer rapidement l'activité biologique d'un produit naturel et d'identifier les molécules responsables. De là, la chimie thérapeutique, par des études de structure/activité, peut améliorer pharmacologiquement la molécule isolée.

PREMIERE PARTIE

LES PRODUITS NATURELS COMME SOURCE D'ANTICANCEREUX

La Nature est l'une des sources principales d'obtention de nouveaux agents anticancéreux. Ces derniers peuvent être issus de plantes mais également d'animaux, d'organismes marins ou de bactéries. L'exploitation efficace de ces différentes sources naturelles permet d'enrichir la connaissance de notre environnement, elle contribue également à la découverte de nouvelles molécules potentiellement actives.

Historiquement, la recherche des anticancéreux a débuté dans les années 50 avec la découverte et le développement des vinca-alkaloïdes et l'isolation des podophyllotoxines. En raison de l'efficacité de ces produits, un programme de recherche intensif axé sur les plantes des régions tempérées a été mis en place par l'Institut National du Cancer (NCI) aux Etats-Unis conduisant à la découverte d'autres molécules actuellement très utilisées en clinique.

1. Epidémiologie du cancer et surveillance en France (Hill et al. 2009)

Le réseau français des registres du cancer (Francim), l'Institut de veille sanitaire (InVS), le Service de biostatistique des Hospices civils de Lyon (HCL) et l'Institut national du cancer (INCa) mènent un programme scientifique en commun pour la surveillance épidémiologique du cancer en France. Ils ont évalué la mortalité provoquée par les cancers entre 1950 et 2006 en France en recensant le nombre annuel de morts par cancer rapporté à un nombre d'habitants. Ils ont aussi déterminé l'incidence, c'est-à-dire le nombre de nouveau cas, survenant pendant cette même période.

1.1. Evolution de la mortalité des cancers entre 1950 et 2006

L'évolution de la mortalité liée aux principales localisations de cancer entre 1950 et 2006 est représentée par la Figure 1. La mortalité des hommes par cancer est environ le double de celle des femmes. En 1950, chez l'homme, le cancer de l'estomac était la première cause de mortalité par cancer, suivi par les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS). Chez la femme, en 1950, le cancer de l'intestin était aussi fréquent que le cancer de l'estomac.

Le recueil des données épidémiologiques durant ces cinquante dernières années a permis d'évaluer l'évolution des cancers jusqu'en 2006. Ces informations démontrent qu'en 2006, le cancer du poumon est, de très loin, le plus fréquent chez l'homme alors que le cancer du sein est le plus rencontré chez la femme.

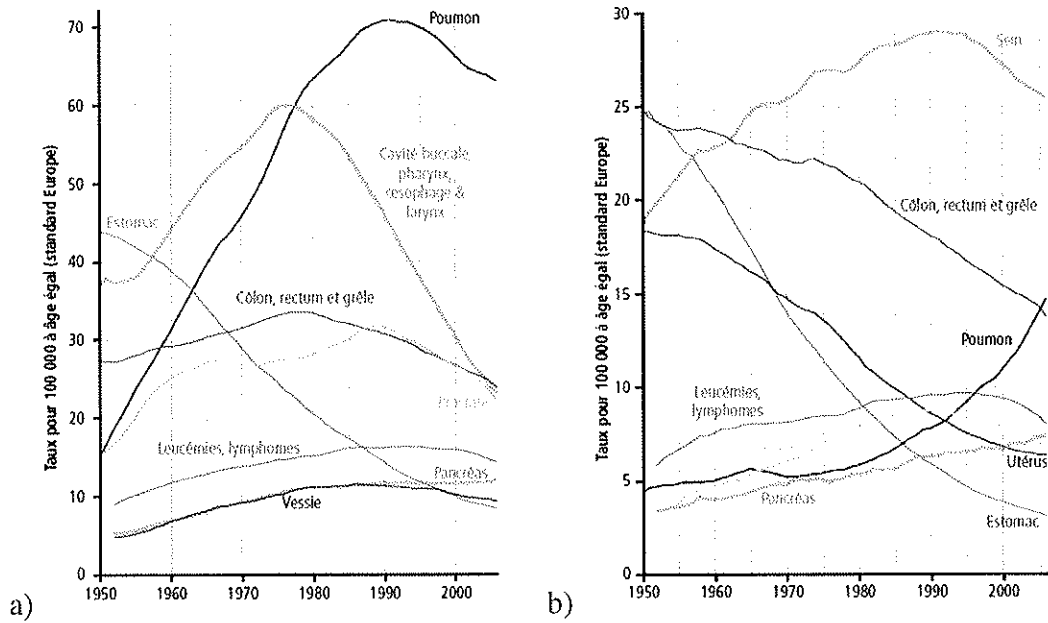


Figure 1 : Evolution de la mortalité liée aux principales localisations de cancer en France (a) chez l'homme et (b) chez la femme (Hill et al. 2009)

Néanmoins, les études démontrent que la mortalité diminue pour la plupart des cancers à l'exception du cancer du poumon chez les femmes (dont l'augmentation importante est liée à la hausse du tabagisme), du cancer de la peau, du myélome et du cancer du pancréas.

1.2. Evolution de l'incidence

L'incidence et la mortalité sont deux indicateurs indispensables à la compréhension de l'évolution d'une maladie. L'incidence dépend beaucoup des pratiques diagnostiques. En effet, au cours des cinquante dernières années, le nombre d'exams diagnostiques possibles et leurs performances ont largement augmentés, décelant ainsi un plus grand nombre de cas. Ainsi, découvrir un cancer précocement est bénéfique surtout si ce dernier était devenu

symptomatique par la suite. Mais cela peut aussi être délétère si les cancers diagnostiqués régressent spontanément ou n'étaient jamais devenus symptomatiques, c'est le surdiagnostic.

L'incidence ne dépend donc pas des progrès thérapeutiques contrairement à la mortalité qui diminue fortement si les traitements sont plus efficaces.

Il existe plusieurs types d'évolutions de l'incidence et de la mortalité :

- L'incidence et la mortalité augmentent pour le cancer du poumon chez la femme (Figure 2) ainsi que le myélome et le mélanome chez les deux sexes. L'augmentation de la mortalité est très probablement la conséquence de l'augmentation de l'incidence. Pour le mélanome, une partie de l'augmentation de l'incidence pourrait être due à l'intensification du dépistage tandis que pour le cancer du poumon chez la femme, la cause est l'augmentation du tabagisme.

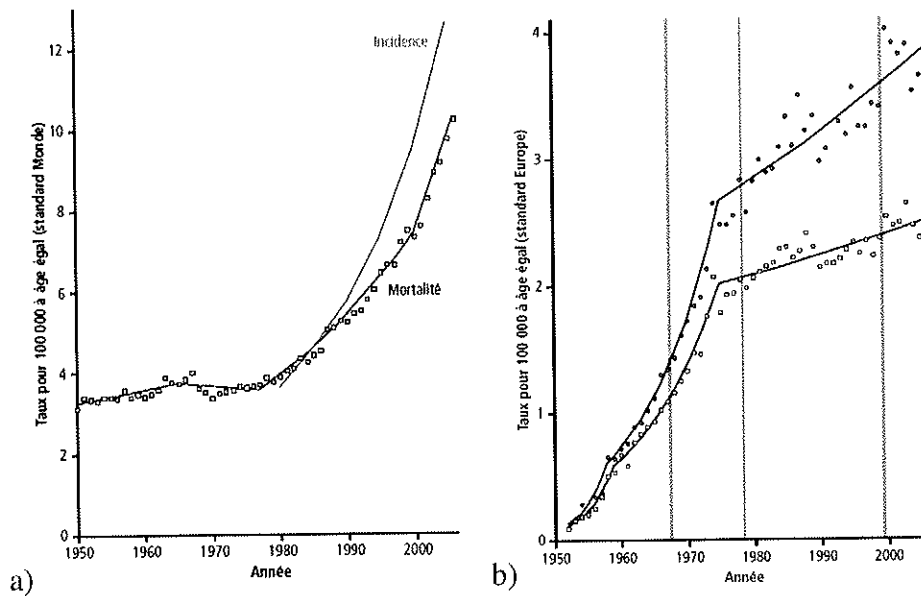


Figure 2: (a) Evolution de la mortalité et de l'incidence du cancer du poumon chez la femme et (b) évolution de la mortalité du myélome multiple chez l'homme (●) et chez la femme (□)

- L'incidence augmente et la mortalité diminue notamment pour les cancers de la prostate et des testicules chez l'homme et le cancer du sein chez la femme (Figure 3). L'augmentation de l'incidence est la conséquence des changements de pratiques diagnostiques, en particulier, avec la généralisation du dosage des PSA (antigène prostatique spécifique) pour la prostate et le dépistage par

mammographie pour le cancer du sein. La mortalité diminue principalement grâce aux progrès de la chimiothérapie.

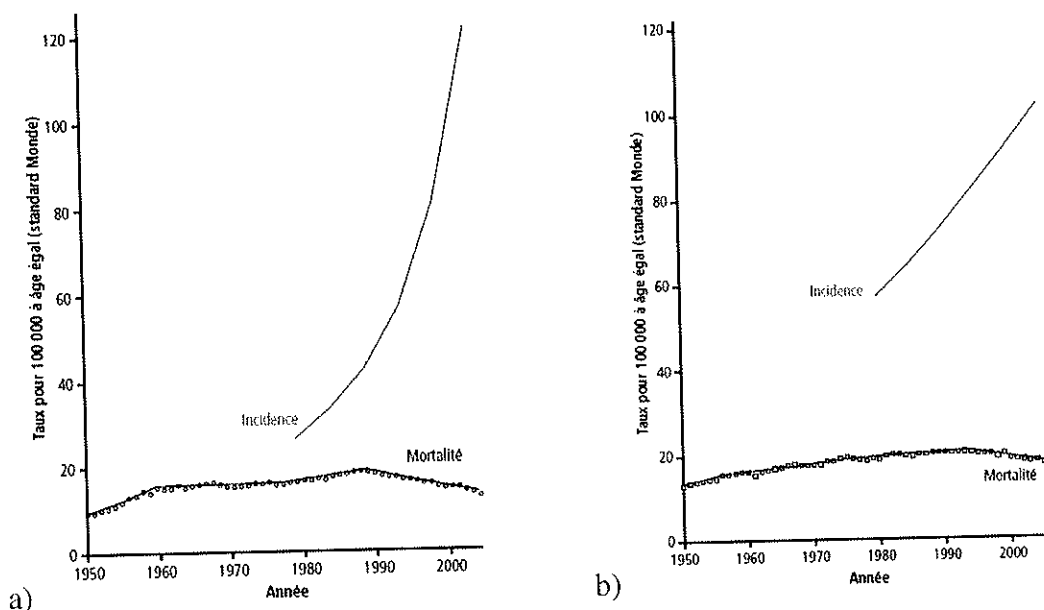


Figure 3 : Evolution de la mortalité et de l'incidence du cancer de la prostate (a) et du sein (b)

- L'incidence et la mortalité diminuent dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS), de l'œsophage, du poumon, du côlon, du rectum et de la maladie de Hodgkin chez les hommes. Cette diminution concerne également le col de l'utérus, l'endomètre, le rein et l'ovaire chez les femmes mais aussi l'estomac (Figure 4) et la vessie pour les deux sexes. La baisse de la mortalité est essentiellement due à la baisse de l'incidence, mais aussi à l'amélioration des traitements anticancéreux. Il est important de signaler que l'incidence des cancers des VADS et du poumon régresse chez l'homme en raison de la diminution des consommations de tabac et d'alcool. De plus, la réduction de l'incidence du cancer du col de l'utérus est principalement liée aux dépistages par frottis qui permettent de détecter, puis de traiter, les lésions précancéreuses.

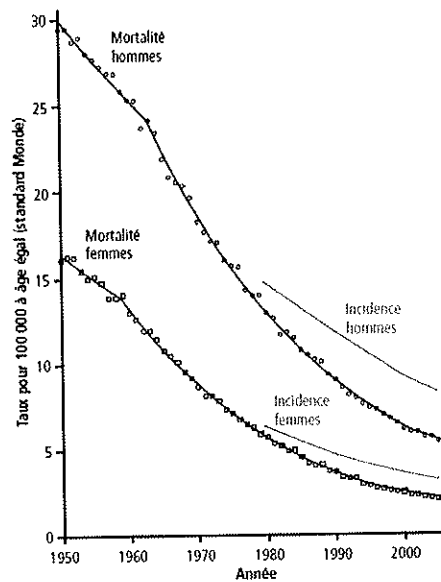


Figure 4 : Evolution de la mortalité et de l'incidence du cancer de l'estomac

1.3. Conclusion

Chez l'homme, la mortalité par cancer diminue, depuis 1989, de 1,5 % par an. Cette diminution résulte surtout de la baisse de la mortalité par cancers des VADS, de la prostate, du poumon, de l'intestin et de l'estomac. Elle s'observe malgré l'augmentation de la mortalité par cancer du foie, de la peau et du pancréas.

Chez la femme, la mortalité diminue depuis 1963, et plus rapidement de 0,7 % par an depuis 1989. Cette diminution résulte surtout de la baisse de la mortalité par cancer de l'intestin, du sein, de l'estomac et de l'utérus, et s'observe malgré l'augmentation de la mortalité par cancer du poumon, du pancréas et de la peau.

Les évolutions de l'incidence et de la mortalité ne concordent pas toujours. En particulier, pour la prostate, les testicules, le sein, la thyroïde et l'encéphale pour lesquels l'augmentation de l'incidence résulte surtout de l'amélioration des pratiques de diagnostic. La diminution de la mortalité par cancer du sein est expliquée par la généralisation du dépistage par mammographie, dont l'efficacité pour réduire la mortalité a été démontrée, mais également par la mise en place de traitements anticancéreux efficaces.

Les résultats obtenus sont encourageants car la mortalité a tendance à diminuer en raison de l'utilisation des anticancéreux.

2. Les anticancéreux issus des produits naturels

Les anticancéreux sont d'origine naturelle, hémisynthétiques ou synthétiques. Ils ont des mécanismes d'action différents (Figure 5 et 6) mais un seul but : celui de tuer les cellules cancéreuses.

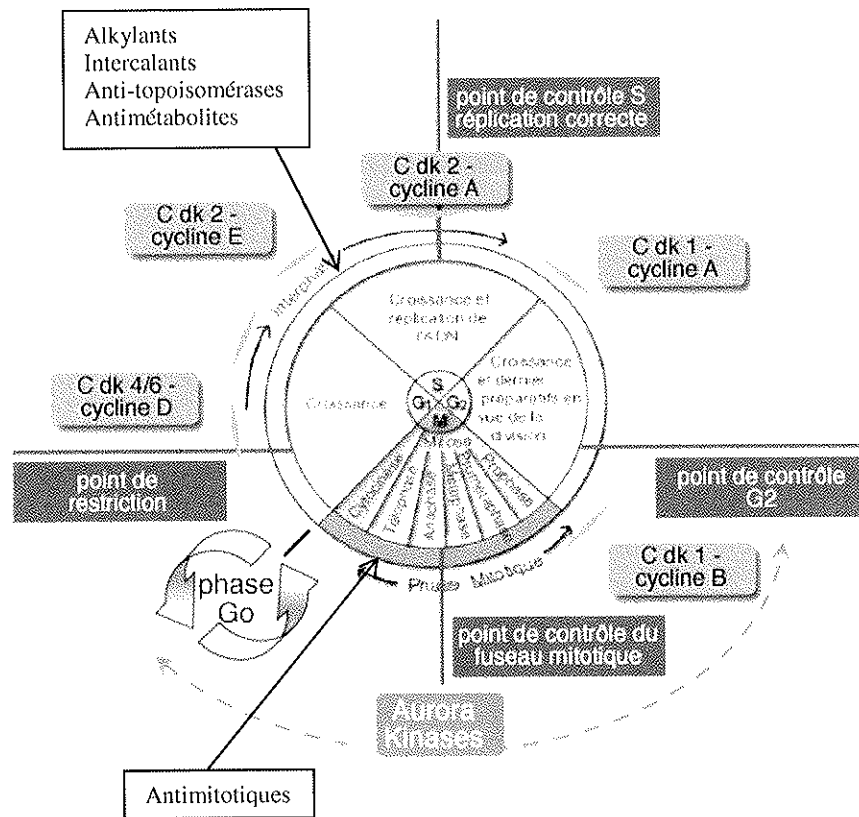


Figure 5 : Le cycle cellulaire et les anticancéreux¹

Seuls les anticancéreux d'origine naturelle et hémisynthétiques seront étudiés dans la suite de ce travail.

¹ http://www.arcagy.org/infocancer/img/339_cycle-cellulaire.jpg; Consulté le 06/09/2010

2.1. Les agents interagissant avec la tubuline

La tubuline est une protéine de 50 kDa existant sous la forme d'hétérodimères associant une molécule de tubuline α et une molécule de tubuline β . Il existe six isoformes pour la tubuline α et sept isoformes pour le type β , avec un profil d'expression particulier selon le tissu ou la tumeur, et des propriétés d'association différentes. Au cours du processus de polymérisation, les hétérodimères constitués de tubuline $\alpha\beta$, disposés de façon polarisée, sont capables de se lier pour former des filaments. Treize filaments peuvent s'assembler pour former des microtubules. Les microtubules sont des structures cytoplasmiques filamenteuses creuses, parfois rayonnant à partir d'un centre organisateur : le centrosome. Ils ont un rôle structural et participent à la constitution du microscaplette cellulaire et du fuseau mitotique intervenant dans les fonctions de sécrétion, de motilité, de transport axonal et la migration des chromosomes au cours de la mitose (Robert 2007).

Certaines molécules sont capables de perturber l'équilibre dynamique existant entre les dimères de tubuline et les microtubules (Figure 6), elles empêchent la polymérisation ou la dépolymérisation du fuseau mitotique au cours de la mitose. Dans les deux cas, la mitose est perturbée, soit parce que les chromosomes ne peuvent pas migrer vers les pôles cellulaires, soit parce que le fuseau chromatique ne se résorbe pas en fin de mitose (Robert 2007).

Les substances naturelles capables d'interagir avec la tubuline sont les vinca-alcaloïdes et les taxanes actuellement très utilisés en thérapeutique. Ces molécules ont été découvertes dès la fin des années 1960 dans le cadre d'un criblage systématique de produits naturels entrepris par le NCI (Cragg & Newman 2005).

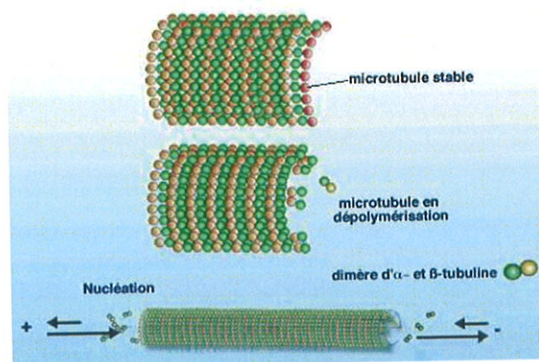


Figure 6 : Représentation de la tubuline²

² http://www.avernes.fr/Oncologie/affich_figure.php3?id_document=634, consulté le 02/09/2010

2.1.1. Les vinca-alcaloïdes

Les premiers anticancéreux utilisés en études cliniques sont les vinca-alcaloïdes comme la **vinblastine** (VELBE®) et la **vincristine** (ONCOVIN®) (Figure 7), isolées de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) [Annexe 1], une plante utilisée traditionnellement pour ses propriétés curatives différentes selon les pays d'utilisation. Dans l'Océan indien, la racine est utilisée pour ses propriétés vermifuges, purgatives et anti-hémorroïdes ; en Inde, les décoctions de ses feuilles calmeraient les piqûres de guêpe ; au Vietnam, ses infusions étaient considérées comme antipaludiques et diurétiques. En médecine occidentale, elle serait antidiabétique. Les premières études de cette plante se sont orientées vers son activité hypoglycémique. Les études *in vivo* sur le rat ont démontré que les extraits de la pervenche de Madagascar entraînaient fréquemment le décès des animaux par infection. Ils réduisaient le nombre de globules blancs et provoquaient une dépression médullaire. Ces extraits se sont ensuite montrés actifs sur les leucémies lymphocytiques de la souris. La découverte de ces molécules actives tient donc au hasard et à la simple observation d'effets secondaires *in vivo* (Bohuon & Monneret 2009).

Des modifications chimiques sélectives de ces deux molécules ont mené à deux analogues hémisynthétiques : la **vindésine** et la **vinorelbine** (NAVELBINE®) (Figure 7). Cette dernière a été identifiée par le professeur Potier (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif/sur/Yvette) lors de ses travaux fondamentaux sur la réaction de Polonowski. Les Laboratoires Pierre Fabre ont pris en charge la production par hémisynthèse de ce composé à l'échelle industrielle (il faut 4 tonnes de plantes pour obtenir 1 kg de principe actif), son développement pharmaceutique, préclinique et clinique jusqu'à l'obtention d'une AMM en France en 1989.

Les vinca-alcaloïdes sont les molécules les plus utilisées actuellement en traitement anticancéreux car elles sont considérées comme le traitement de référence dans le cancer du sein métastatique et le cancer bronchique non à petites cellules. Elles sont associées à d'autres cytotoxiques dans les traitements de nombreux cancers notamment la prise en charge des leucémies, des lymphomes, du cancer avancé des testicules, des ovaires (Nobili et al. 2009).

Les vinca-alcaloïdes font partie des anticancéreux de la classe des antimétabolites dont la cible moléculaire est l'équilibre dynamique tubuline/microtubule. En se fixant sur la

tubuline, ils inhibent la polymérisation de la tubuline en microtubules et bloquent donc le processus mitotique en provoquant une accumulation des cellules en métaphase. Ils agissent préférentiellement sur les microtubules mitotiques mais peuvent parfois toucher les microtubules axonaux à forte concentration entraînant des effets indésirables de neurotoxicité. Le traitement des cellules par ces composés aboutit à l'accumulation de cellules en phase M et G2 et l'effet létal est observé en phase S (Bruneton 2009).

Les vinca-alcaloïdes sont généralement administrés par des injections IV souvent hebdomadaires à raison de 1,4 mg/m² de surface corporelle (SC) chez l'adulte pour l'OCOVIN[®] et de 25 à 30 mg/m² de SC pour la NAVELBINE[®]. Cette dernière est le seul vinca-alcaloïde disponible par voie orale (VO) à une posologie comprise entre 60 et 80 mg/m²/semaine (Vidal 2010).

Les effets indésirables sont généralement liés à une myélosuppression et une neurotoxicité (Nobili et al. 2009).

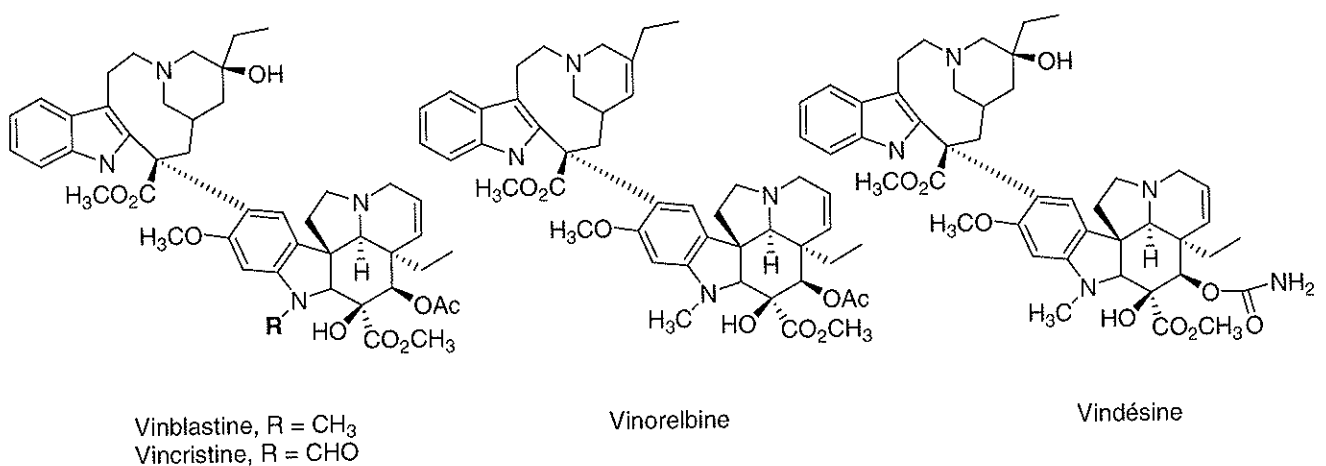


Figure 7: Structure des Vinca-alcaloïdes

Un analogue de synthèse, la **vinflunine** (Figure 8) est actuellement en essai clinique de phase I, II ou III dans des tumeurs solides (clinicaltrials.gov 2010). Il a obtenu une AMM en septembre 2009 sous le nom de JAVLOR[®] dans le traitement, en monothérapie, du cancer de la vessie après un échec aux platines. La présence d'atomes de fluor permet d'améliorer l'activité et la tolérance de la molécule.

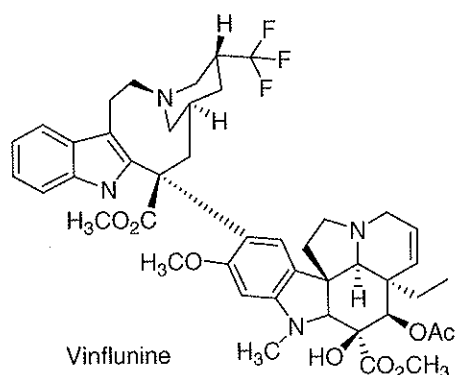


Figure 8: Structure de la vinflunine

2.1.2. Les taxanes

Le **paclitaxel** (TAXOL[®]) (Figure 9) est un diterpène isolé de l'écorce d'un if : *Taxus brevifolia* (Taxaceae) [Annexe 1]. L'utilisation traditionnelle des aiguilles d'ifs (*T. canadensis*, *T. baccata*, ...) par les tribus amérindiennes dans le traitement des maladies non cancéreuses a été rapportée. Celles de *T. baccata* sont également intégrées dans la médecine traditionnelle ayurvédique, Hatwell, en 1982, l'a décrit dans le traitement du cancer (Cragg & Newman 2005). Plus de 300 taxoïdes ont pu être isolés à partir des différentes espèces de *Taxus*. Le paclitaxel est la seule molécule à avoir été développée par le NCI (Srivastava et al. 2005).

Le paclitaxel, utilisé en clinique, est présent en très faible quantité dans les espèces de *Taxus* (150 mg pour 1kg d'écorces sèches). L'utilisation de la chimie organique pour le produire à l'échelle industrielle est rapidement devenue nécessaire. C'est Potier (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif/sur/Yvette) qui a eu l'idée de rechercher un précurseur abondant pour pouvoir mettre au point la synthèse du TAXOL[®]. La découverte de la **désacétyl-baccatine III**, précurseur abondant dans les aiguilles (parties renouvelables) de *Taxus baccata* a permis la production du paclitaxel par hémisynthèse. Par chance, l'un des intermédiaires de l'hémisynthèse, le **docétaxel** (TAXOTERE[®]) (Figure 9) s'est montré plus soluble et deux fois plus actif que le TAXOL[®] (Bohuon & Monneret 2009).

Au cours des essais cliniques de phase I et II, le paclitaxel s'est révélé avoir une activité anticancéreuse prometteuse sur le cancer du poumon, de l'ovaire ou du sein et sur le carcinome de la tête et du cou. En 1992, Bristol-Myers-Squibb a obtenu de cette molécule une

AMM, approuvée par la FDA, dans le cadre du traitement du cancer de l'ovaire, le cancer métastatique du sein, le cancer du poumon et le sarcome de Kaposi (Srivastava et al. 2005). Le paclitaxel a également montré un intérêt dans le traitement potentiel des scléroses multiples, le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde (Cragg & Newman 2005).

Les taxanes sont des poisons du fuseau. Ils stimulent l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et stabilisent les microtubules en empêchant leur dépolymérisation (Srivastava et al. 2005).

La posologie du paclitaxel est généralement comprise entre 100 et 175 mg/m² de SC administrée le plus souvent en polychimiothérapie (cisplatine, doxorubicine...). La posologie du docétaxel va de 75 à 100 mg/m² de SC en monothérapie ou en association avec d'autres cytotoxiques comme le cisplatine ou le 5-fluoro uracile (Vidal 2010).

La myélodépression est l'effet indésirable le plus fréquemment rencontré dans le traitement par les taxanes. Une neutropénie sévère est observée chez 28% des patients traités, une thrombocytopénie, chez 11% des patients. Les taxanes provoquent très fréquemment une neurotoxicité (neuropathies périphériques), des vomissements, une diarrhée, une alopecie, des myalgies ainsi que des réactions d'hypersensibilité mineures (Vidal 2010).

Il est important de noter que 23 taxanes potentiellement anticancéreux sont actuellement en développement préclinique (Cragg & Newman 2005).

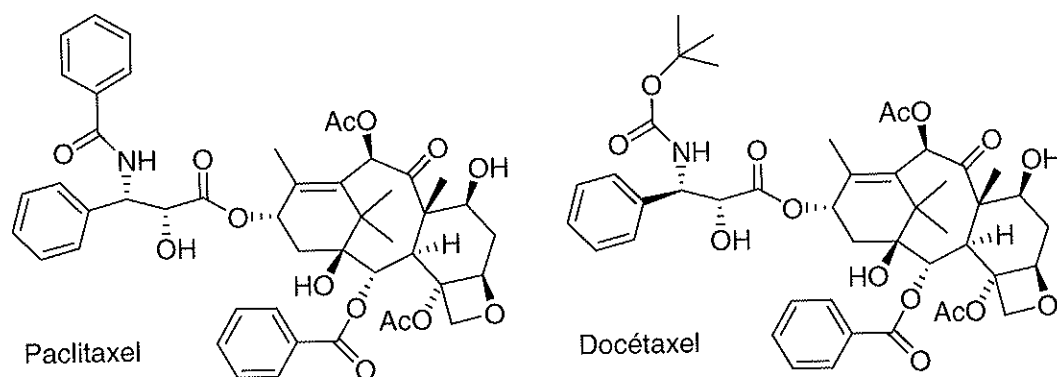


Figure 9: Structure du paclitaxel et son analogue hémisynthétique

2.1.3. Les épothilones

Dans les années 1990, les **épothilones A et B** (Figure 10) sont des macrolides naturels isolés d'une myxobactérie : *Sorangium cellulosum* (Polyangiaceae) [Annexe 1]. Leur mécanisme d'action est semblable à celui des taxanes, bien que leur structure chimique soit plus simple et que leur solubilité dans l'eau soit supérieure. Des études préliminaires, *in vitro*, sur des lignées cellulaires tumorales ont montré une activité anticancéreuse notamment sur des lignées résistantes aux taxanes. Mais, *in vivo*, leur activité s'est avérée modeste à cause de leur forte métabolisation, d'une pharmacocinétique peu favorable et d'une fenêtre thérapeutique étroite (Conlin et al. 2007).

La recherche d'analogues hémisynthétiques de l'épothilone B a alors conduit à la découverte de l'**ixabepilone** (IXEMPRA[®]) (Figure 10) approuvée en 2007 par la FDA dans le traitement du cancer du sein avancé, localisé ou métastasé et réfractaire aux taxanes ou aux anthracyclines en monothérapie ou en association (capécitabine) (Conlin et al. 2007). L'EMA, quant à elle, a refusé l'AMM de ce médicament (EMA 2010) (EMA/602569/2008).

IXEMPRA[®] est une solution titrée à 2 mg/ml, utilisée en IV à raison de 40 mg/m² de SC toutes les trois semaines. Plusieurs effets indésirables peuvent survenir fréquemment au cours des traitements : neuropathies périphériques (paresthésie, hyperesthésie...), myélosuppression (surtout neutropénie) et hépatotoxicité (Conlin et al. 2007). Actuellement, cette molécule fait l'objet de plusieurs études cliniques : des études de phase I dans le cancer du poumon non à petites cellules, des études de phase II dans le traitement du cancer du col de l'utérus et des études de phase III dans le traitement du cancer de l'endomètre (clinicaltrials.gov 2010).

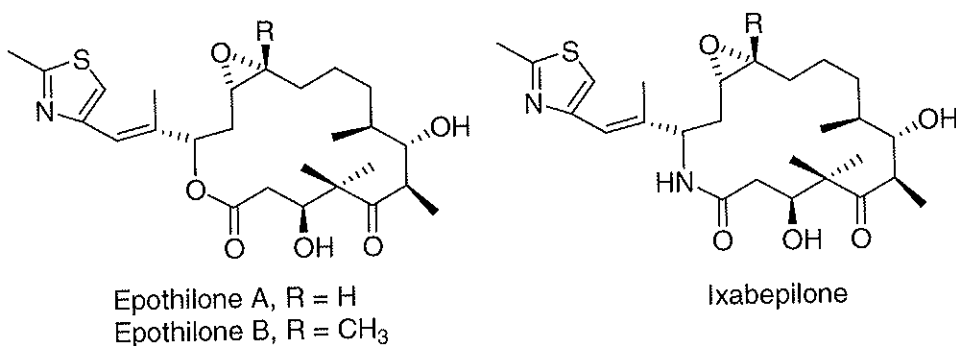


Figure 10: Structure de l'épothilone B et son analogue semi-synthétique

2.1.4. Les combrestatines

L'extraction, l'isolement et l'identification des combrestatines ont été rapportées dans les années 70 à partir de l'écorce d'un arbre d'Afrique du Sud appelé *Combretum caffrum* (Combretaceae) [Annexe 1]. Ces composés ont été découverts grâce au programme entrepris par le NCI en collaboration avec l'Institut de Recherche Botanique d'Afrique du Sud. Les arbres de la famille des Combretaceae comme *Combretum* sp. et *Terminalia* sp. sont décrits pour être utilisés en médecine traditionnelle africaine et indienne dans le traitement de diverses maladies comme l'hépatite, le paludisme ou les « cancers » (Cragg & Newman 2005).

Les combrestatines sont des poisons du fuseau mitotique et représentent les premiers membres d'une série de molécules biologiquement actives. La **combrestatine A-4** (Figure 11), isolée en 1989, est la molécule la plus prometteuse. C'est un stilbène qui a montré une activité cytotoxique contre une large gamme de lignées cellulaires cancéreuses humaines incluant les cellules dites MDR (multidrug resistance). La combrestatine A-4 est active sur le cancer du colon, du poumon et sur les leucémies. En effet, elle possède une DL₅₀ de 7 nM sur la lignée cellulaire L1210 (cellules leucémiques murines) ; de 1,7 nM sur les cellules HCT-15 (colocarcinome humain) et de 3 nM sur les cellules NCI-H460 (carcinome pulmonaire humain) (Cragg & Newman 2005).

Des études *in vitro* ont montré que la combrestatine A-4 entre en compétition avec la colchicine sur son site de liaison à la tubuline. Elle inhibe donc la polymérisation de la tubuline en microtubules et possède le même mécanisme d'action que la colchicine (colchicine-like inhibitor) (Cragg & Newman 2005).

Un grand nombre de combrestatines ont été synthétisées et évaluées biologiquement. Mais le véritable problème de cette classe de composés est leur faible solubilité dans l'eau. Les études menées actuellement sur ces composés s'orientent vers la synthèse de prodrogues hydrosolubles comme la **combrestatine A-4 phosphate** (ou fosbretabulin) (Figure 11) qui possède non seulement une activité antiméiotique mais également des propriétés anti-angiogéniques (diminution de la croissance des vaisseaux sanguins) et anti-vasculaires (effondrement rapide et sélectif des vaisseaux tumoraux déjà établis). En effet, des études par IRM ont permis de montrer un nouveau mécanisme d'action ciblé sur le système vasculaire de la tumeur. La combrestatine A-4 phosphate réduit significativement le flux sanguin des

cellules cancéreuses de façon dose-dépendante et agit comme un agent anti-vasculaire en bloquant l'apport sanguin aux cellules cancéreuses. Dans des tumeurs animales, elle peut entraîner l'arrêt du flux sanguin jusqu'à provoquer la nécrose de la tumeur (Srivastava et al. 2005).

La combrestatine A-4 phosphate est actuellement évaluée dans des essais cliniques de phase II aux Etats-Unis et au Royaume Uni sur des tumeurs solides comme le cancer de la thyroïde et du poumon (clinicaltrials.gov 2010).

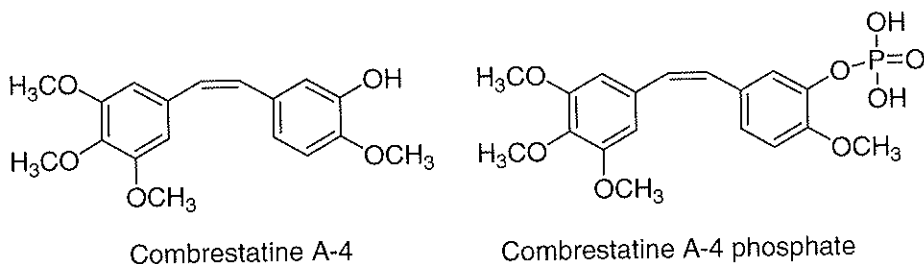


Figure 11: Structure des combrestatines et un analogue hémisynthétique

2.2. Les agents interagissant avec les topoisomérases

Au cours des étapes du métabolisme de l'ADN (réplication, transcription, réparation, recombinaison) et lors de la séparation des chromatides, les topoisomérases interviennent pour résoudre les contraintes topologiques de la molécule d'ADN. Les topoisomérases I coupent transitoirement un seul des deux brins d'ADN et transfèrent l'autre brin au travers de la coupure transitoire, avant de les relier. Cela équivaut à « détorsader » la double hélice d'ADN d'un pas d'hélice. Les topoisomérases II coupent transitoirement les deux brins de la double hélice afin de permettre le passage d'un autre segment d'ADN à travers cette coupure transitoire.

Chez les eucaryotes, ces topoisomérases sont formées de deux sous-unités identiques de 170 kDa de masse moléculaire. Chaque sous-unité se comporte comme un petit bras, les deux permettant un effet de pince sur l'ADN. En effet, chaque sous-unité forme une liaison covalente avec une extrémité de l'ADN engendrée par la coupure de la liaison phosphodiester : il s'agit de l'extrémité 5' dans le cas des topoisomérases II et de l'extrémité 3' pour les topoisomérases I.

Les inhibiteurs de topoisomérases I et II ne s'intercalent pas dans l'ADN mais stabilisent le complexe de clivage, empêchant l'étape de religation et provoquent une coupure définitive des brins d'ADN (Goldwasser 2007).

2.2.1. Les dérivés de la podophyllotoxine

La résine du rhizome de podophylle était traditionnellement utilisée pour ses propriétés laxatives et stimulantes (Bruneton 2009). Les amérindiens utilisaient cette plante en tant qu'émétique, purgatif ou antihelminthique (Nobili et al. 2009). Un lignane antimittotique : la **podophyllotoxine** (Figure 12) a été extraite de la résine du rhizome de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae) [Annexe 1] en 1880. Sa structure n'a été identifiée que dans les années 1950 (Cragg & Newman 2005). Cette molécule est commercialisée sous le nom de **CONDYLINE[®]** (solution pour application locale) dans le traitement des condylomes acuminés externes de surface inférieure à 4 cm², en alternative aux autres thérapies (cryothérapies, méthodes chirurgicales...) (Vidal 2010).

Des dérivés hémisynthétiques de l'épipodophyllotoxine (Figure 12) (isomère de la podophyllotoxine) ont été développés pour obtenir des composés plus efficaces et moins toxiques que la molécule mère (Srivastava et al. 2005) : L'**étoposide** (VEPESIDE[®] ou CELLTOP[®]) et le **phosphate d'étoposide** (ETOPOPHOS[®]), un dérivé hydrosoluble qui est rapidement converti en étoposide par les phosphatases sériques (Bruneton 2009).

L'étoposide est administré par VO à une posologie comprise entre 80 et 300 mg/m² de SC alors que le dérivé phosphate est utilisé par voie parentérale entre 50 et 150 mg/m² de SC. Ils sont indiqués dans le traitement de la leucémie aigüe, les lymphomes malins hodgkiniens et non hodgkiniens, le cancer bronchique à petites cellules, le cancer du sein déjà traité, le choriocarcinome placentaire et le carcinome embryonnaire du testicule (Vidal 2010).

Il est intéressant de noter que cette molécule a obtenu l'approbation de la FDA pour son utilisation clinique en 1983 alors que son mécanisme d'action et sa pharmacologie n'étaient pas totalement définis (Hande 1998).

La leucopénie est l'effet indésirable fréquent au cours de la prise d'étoposide. Celle-ci est généralement accompagnée de nausées, de vomissements et d'alopécie réversible. Des réactions d'hypersensibilité ont également été observées avec cette molécule (Vidal 2010).

Les analogues de la podophyllotoxine inhibent l'assemblage des microtubules et arrêtent le cycle cellulaire en métaphase (poison du fuseau mitotique). Ils bloquent également l'activité de la topoisomérase II chargée de ressouder les brins d'ADN après leur cassure. Les modifications chimiques apportées aux analogues ont permis d'orienter le mécanisme d'action vers une activité inhibitrice de la topoisomérase II plutôt que vers une activité antimitotique (Srivastava et al. 2005).

Ces composés sont de puissants agents anticancéreux mais leur toxicité limite leur utilisation clinique. Seul l'étoposide continue à être utilisé en clinique. Cette molécule a une faible biodisponibilité (faible solubilité aqueuse et elle se dégrade rapidement à pH 1,3 (Shah et al. 1989)) et est associée aux phénomènes de résistance (Srivastava et al. 2005).

De nombreux lignanes dérivés de la podophyllotoxine continuent d'être synthétisés et font l'objet d'études cliniques de phase I et/ou II.

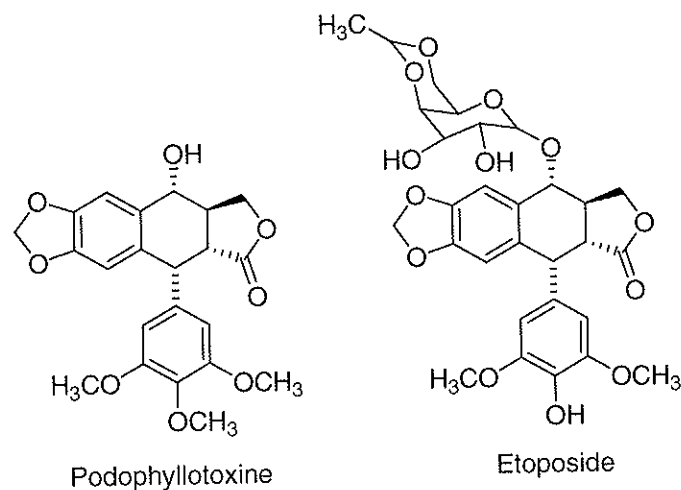


Figure 12: Structure de la podophyllotoxine et ses analogues

2.2.2. La camptothécine

La **camptothécine** (Figure 13) est une molécule extraite des feuilles de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) [Annexe 1], un arbre chinois. Elle a été découverte par Wall et Wani au RTI (Research Triangle Institut) (Cragg & Newman 2004), et s'est avérée avoir une activité anticancéreuse dont le mécanisme d'action n'était pas encore élucidé. Des études préliminaires ont révélé que cet alcaloïde possède une activité anti-tumorale *in vitro* notamment sur les cellules leucémiques de souris. De nombreux travaux ont été nécessaires pour arriver à exploiter cette molécule et plus de 3000 outils ont été publiés sur cette molécule entre 1966 et 2004 (Srivastava et al. 2005).

Au début des années 1970, la camptothécine est identifiée comme étant capable d'inhiber la synthèse de l'ARN et de l'ADN en agissant sur une enzyme spécifique non identifiée. En raison de son caractère insoluble en solution aqueuse, c'est le sel de sodium de camptothécine qui a été testé dans des études cliniques de phases I et II. Quelques réponses furent observées dans les cancers colorectaux, gastriques et pulmonaires, mais la survenue de cystites hémorragiques a interrompu le développement de la molécule (Goldwasser 2007).

Dans les années 1980, le mécanisme d'action de la camptothécine a été établi comme étant un inhibiteur spécifique de la topoisomérase I (Goldwasser 2007).

Des dérivés hémisynthétiques de la camptothécine, plus hydrosolubles et moins toxiques furent développés en clinique, ils ont obtenu une AMM comme l'**irinotecan** (CAMPTO[®]) (Figure 13). Ce dernier, développé par Pfizer, est indiqué dans le traitement du cancer colorectal. C'est une prodrogue dont le métabolite nommé **SN-38** (Figure 13) est 200 fois plus actif. Le **topotecan** (HYCAMTIN[®]) (Figure 13) lancé par Glaxo-SmithKline est, quant à lui, utilisé dans le traitement du cancer de l'ovaire (traitement de deuxième intention), le traitement du cancer du poumon à petites cellules et du col de l'utérus en rechute. (Cragg & Newman 2005) (Vidal 2010).

La posologie recommandée du topotecan varie de 0,75 à 1,5 mg/m² de SC par voie IV en mono ou polythérapie. L'irinotecan est aussi administré par voie IV seul ou en association avec d'autres anticancéreux (5-fluorouracile) à une posologie allant de 180 à 350 mg/m² de SC suivant l'indication (Vidal 2010).

L'effet indésirable fréquent lié à l'administration du topotecan est la neutropénie avec ou sans thrombopénie. C'est également le cas pour l'irinotecan qui est aussi souvent associé à des diarrhées aiguës tardives pouvant conduire à la déshydratation. Il présente également l'inconvénient d'induire un syndrome cholinergique résultant de l'inhibition des cholinestérases (Vidal 2010).

La synthèse de nombreux analogues de la camptothécine a ensuite été développée dans le but de diminuer la toxicité de la molécule mère et d'améliorer ses propriétés. De nombreuses molécules ont pu être synthétisées et sont au stade d'études précliniques ou cliniques de phase I, II ou III (Cragg & Newman 2004). C'est le cas par exemple du **lurotécan** (Figure 14) qui fait l'objet actuellement d'études cliniques de phase III dans le traitement du cancer colorectal, du sein et du poumon à petites cellules (Srivastava et al. 2005) ou le **diflomotécan** (Figure 14) en étude clinique de phase II dans le traitement du cancer du poumon à petites cellules (Cragg & Newman 2004).

Une demande d'AMM pour le **rubitécan** (ORATHECIN[®]) (Figure 14) a été déposée auprès de l'EMA, en juillet 2004, dans le traitement des patients atteints d'un cancer avancé ou métastatique du pancréas. L'industrie pharmaceutique a ensuite retiré sa demande en janvier 2006 car le CMHP (Comité des médicaments à usage humain), à l'étude du dossier fourni par EuroGen, a considéré que le rapport bénéfice/risque était défavorable (EMA 2010) Réf. Doc. EMA/604213/2007).

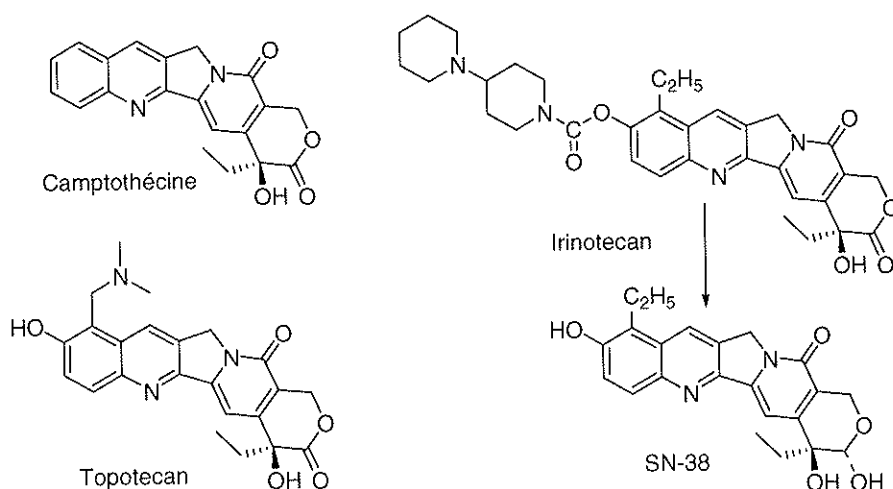


Figure 13: Structure de la camptothécine et ses analogues hémisynthétiques

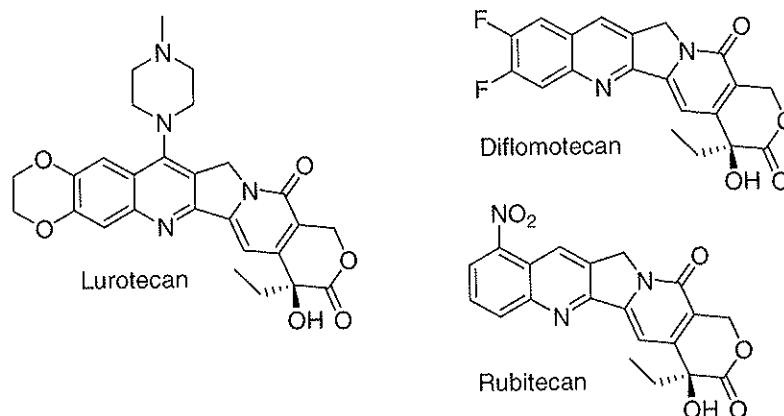


Figure 14 : Les analogues de la camptothécine en études cliniques

2.3. Les agents alkylants

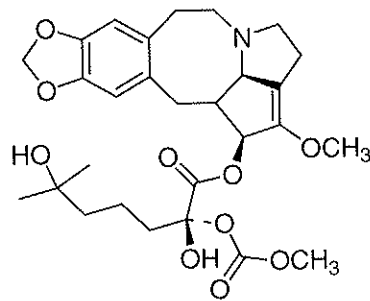
Les agents alkylants sont ainsi nommés grâce à leur capacité d'ajouter un groupe alkyle à un grand nombre de groupes électro-négatifs dans certaines conditions (présentes dans les cellules cancéreuses). Ils arrêtent la croissance de la tumeur en liant ensemble les nucléotides guanines dans la double hélice d'ADN, attaquant ainsi directement l'ADN. Les deux brins ne peuvent ainsi pas se dérouler ni se séparer, entraînant pour la cellule, une incapacité à répliquer son ADN : la cellule ne peut alors plus se diviser. Ces agents n'agissent généralement pas spécifiquement, certains nécessitent une conversion *in vivo* en substances actives (par exemple le cyclophosphamide).

2.3.1. L'homoharringtonine

L'homoharringtonine ou omacetaxine mepesuccinate (OMAPRO[®]) (Figure 15) est un dérivé alcaloïdique isolé de l'arbre chinois *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupaceae* (Cephalotaxaceae) [Annexe 1] (Cragg & Newman 2005).

Cette molécule est un agent alkylant utilisé en ATU (autorisation temporaire d'utilisation) depuis 2007 en association avec l'interféron alfa et la cytarabine dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques. Elle est enregistrée comme médicament

orphelin par le COMP depuis 2004 dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe (EMEA 2010) EMEA/COMP/204749/2004 Rev.1).



Homoharringtonine

Figure 15: Structure de l'homoharringtonine

2.3.2. La trabectédine

La **trabectédine** ou l'ecteinascidine 743 (YONDELIS[®]) (Figure 16) est le métabolite secondaire majeur du tunicier *Ecteinascidia turbinata* (Perophoridaea) [Annexe 1]. Cet organisme marin peut se rencontrer dans l'océan Atlantique tropical et subtropical et dans la mer des Caraïbes (Simmons et al. 2005).

Cet alcaloïde tetrahydroisoquinolique est obtenu par hémisynthèse à partir de la **cyanosafranine B** (Figure 16) produite par fermentation, à l'aide d'une bactérie marine *Pseudomonas fluorescens* (Simmons et al. 2005). Cet agent alkylant se lie au petit sillon de l'ADN, ce qui déclenche une cascade d'événements qui affectent plusieurs facteurs de transcription, des protéines se fixant à l'ADN et les voies de réparation de l'ADN, perturbant ainsi le cycle cellulaire (Vidal 2010).

Le YONDELIS[®] est indiqué chez les patients atteints de sarcome évolué des tissus mous, après échec des traitements à base d'anthracyclines ou d'ifosfamide (Vidal 2010). Ce médicament est utilisé dans le cancer de l'ovaire sous ATU (autorisation temporaire d'utilisation). Le comité des médicaments orphelins (COMP) lui a donné le statut de médicament orphelin.

La posologie usuelle en IV est de 1,5 mg/m² de SC (Vidal 2010).

Il est établi que la trabectédine exerce des effets antiprolifératifs *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de diverses lignées cellulaires tumorales humaines notamment des tumeurs malignes telles que le cancer du sein, du poumon non à petites cellules, de l'ovaire et de la prostate (Simmons et al. 2005). Des études cliniques de phase I, II ou III sont actuellement en cours aux Etats Unis et en Europe sur l'ensemble des tumeurs citées ci-dessus (clinicaltrials.gov 2010).

Un analogue naturel N-déméthyl : l'**ecteinascidine 729** (Figure 16) est plus actif que la trabectédine et fait l'objet d'études précliniques à ce jour (Simmons et al. 2005).

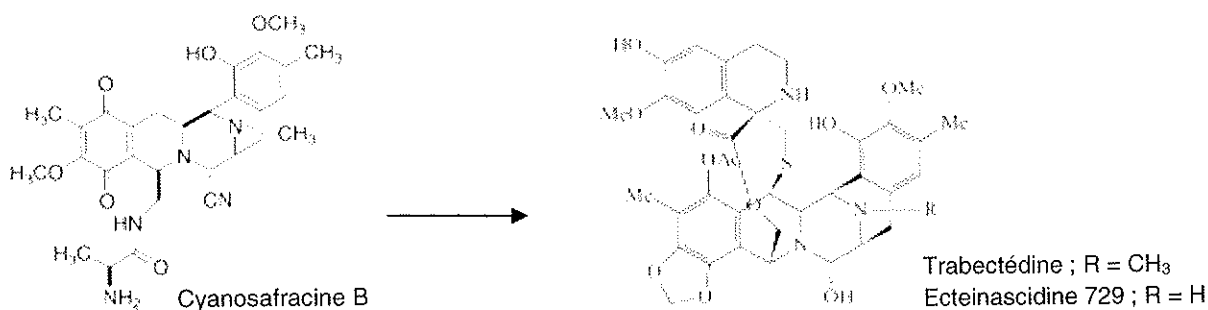


Figure 16: Structure de la trabectédine et son précurseur hémisynthétique

2.3.3. L'aplidine, un analogue de la didemnine B

La **didemnine B** (Figure 17) est un peptide cyclique isolé d'un tunicier : *Trididemnum solidum* (Didemnidae) [Annexe 1]. C'est la première molécule d'origine marine à subir des essais cliniques en tant qu'agent anticancéreux. Ce peptide cytotoxique est, en réalité, un métabolite secondaire produit par une cyanobactérie vivant en symbiose avec le tunicier (Simmons et al. 2005).

De plus, cette substance présente plusieurs activités biologiques *in vitro* suggérant que son activité antitumorale serait due à la combinaison de plusieurs mécanismes différents. En effet, la didemnine B inhibe la synthèse de l'ADN, de l'ARN, de protéines (Simmons et al. 2005).

Elle s'est montrée efficace contre de nombreux modèles de cancers et a pu être évaluée dans des essais cliniques de phase II dans le traitement du cancer du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus, du poumon ou du myélome. Malgré la mise en place de nombreux

protocoles contre plusieurs types de cancers, ce composé s'est révélé beaucoup trop toxique, ce qui a conduit à l'arrêt de son évaluation par le NCI en 1990 (Simmons et al. 2005).

Néanmoins, l'expérience acquise au cours de ces études a permis d'étudier plus rapidement l'**aplidine** (ou dehydrodidemnine B) (Figure 17), un analogue isolé d'un autre tunicier méditerranéen, *Aplidium albicans* (Polyclinidae) [Annexe 1]. Il présente également une activité anti-angiogénique en diminuant la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et en réduisant l'expression du récepteur VEGF-r1 (J. Jimeno et al. 2004). Les études précliniques ont révélé que cette molécule est plus active que la didemnine B. Les études cliniques sur des tumeurs solides et des lymphomes ont pu démontrer une toxicité neuromusculaire dose-limitante mais cette molécule présente l'avantage de ne pas avoir de toxicité hématologique. L'aplidine est enregistrée sous le nom d'APLIDIN® et son activité cible les cellules leucémiques (Simmons et al. 2005). Il est déclaré médicament orphelin par le COMP en 2005 dans le traitement du myélome multiple et du lymphome lymphocytaire (EMEA 2010) EMEA/COMP/127243/2004 et EMEA/COMP/378/2004).

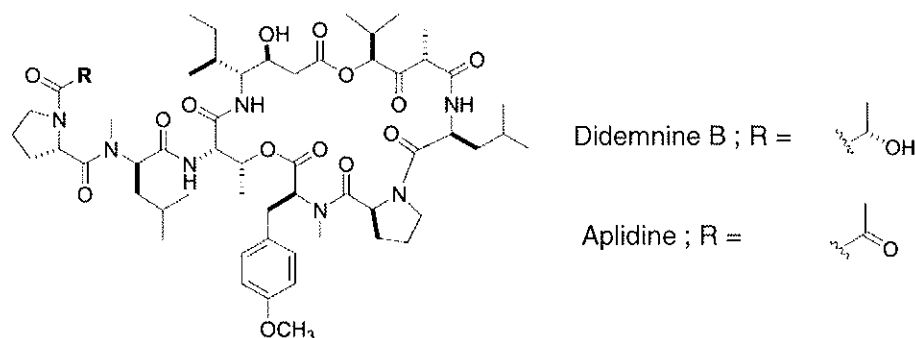


Figure 17 : Structure de la didemnine B et son analogue

2.4. D'autres molécules naturelles anticancéreuses

2.4.1. Le flavopiridol

Le **flavopiridol** (ou alvocidib) (Figure 18) est une flavone synthétique dérivant de la **rohitukine** (Figure 18) qui a été isolée des feuilles et des tiges d'une plante appelée *Amoora rohituka* (Meliaceae), et plus tard, d'un arbre *Dysoxylum binectariferum* (Meliaceae). Cette

dernière possède des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires (Mohanakumara et al. 2010).

Le flavopiridol est un des 100 analogues synthétisés au cours des études structures-activités. Il possède une activité inhibitrice des kinases cycline-dépendantes (CDK) bloquant le cycle cellulaire en phase 1 (G1 ou G2) (Da Rocha et al. 2001). Il est capable d'inhiber la prolifération cellulaire d'une série de lignées de cancers du sein et du poumon. Les études *in vivo* sur la souris ont démontré que cette molécule est active sur une large gamme de tumeurs humaines conduisant à son évaluation clinique par le NCI (Cragg & Newman 2005).

Des études cliniques de phase I et II sont réalisées en monothérapie ou en association avec d'autres cytotoxiques (le paclitaxel et le cisplatine) sur des leucémies, des lymphomes ou des tumeurs solides (pancréas, estomac, œsophage, poumon, mélanome...) (Nobili et al. 2009). L'effet indésirable dose-limitant semble être la diarrhée (Da Rocha et al. 2001).

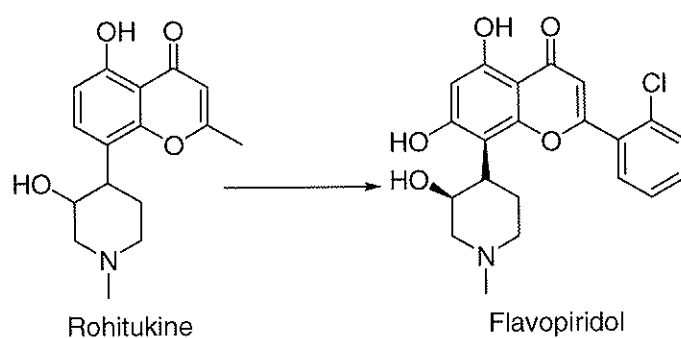


Figure 18: Structure de la rohitukine et du flavopiridol

2.4.2. La roscovitine

La **roscovitine** (Figure 19) est un composé synthétique dérivant de l'olomucine et isolé des cotylédons de radis ou de *Raphanus sativus* (Brassicaceae) [Annexe 1].

L'**olomucine** (Figure 19) possède une activité inhibitrice des CDK impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les modifications chimiques de l'olomucine ont permis de synthétiser la roscovitine beaucoup plus active (Cragg & Newman 2005). Cette dernière est évaluée grâce à des essais cliniques de phase II sur le cancer du poumon non à petites cellules

et est actuellement en essai clinique de phase I dans le traitement de tumeurs solides avancées (clinicaltrials.gov 2010). D'autres dérivés synthétiques ont conduit aux purvalanols, encore plus actifs que la roscovitine, actuellement en développement préclinique (Cragg & Newman 2005).

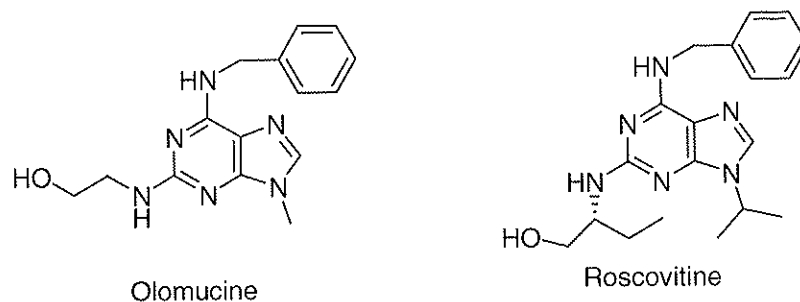


Figure 19: Structure de l'olomucine et son analogue synthétique

2.4.3. L'acide bétulinique

L'**acide bétulinique** (Figure 20) est un métabolite secondaire (triterpène de type lupane) isolé en grande quantité dans les arbres de bouleau : *Betula sp.* (Betulaceae) [Annexe 1] (Bruneton 2009). Les bouleaux sont également une grande source de bétuline : un précurseur de l'acide bétulinique (Cragg & Newman 2005).

L'acide bétulinique est décrit comme ayant plusieurs activités biologiques intéressantes : antibactérienne, anti-inflammatoire, antipaludique et anti-HIV (Cragg & Newman 2005). Il possède une activité cytotoxique contre plusieurs lignées cellulaires de mélanomes (ML-1 : $DL_{50} = 1,1 \mu\text{g/ml}$). Il s'est également avéré actif et peu toxique dans des études *in vivo* sur des souris athymiques développant des mélanomes. D'autres études biologiques ont permis de démontrer que l'acide bétulinique est capable d'induire l'apoptose (Balunas & Kinghorn 2005). Des études cliniques de phase I et II sur une formulation topique (pommade à 20% d'acide bétulinique) sont en cours de recrutement dans le traitement des naevi dysplasiques (grains de beauté) (clinicaltrials.gov 2010).

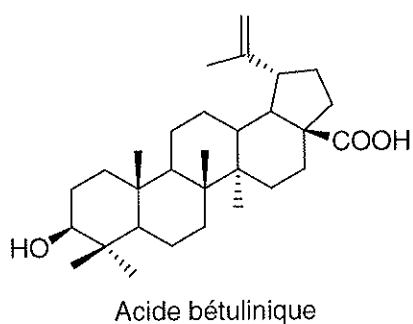


Figure 20: Structure de l'acide bétulinique

2.4.4. La β -lapachone

La **β -lapachone** (ou ARQ 501) (Figure 21) est une quinone extraite de l'écorce de l'arbre *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae) [Annexe 1], un arbre largement utilisé en région amazonienne dans le traitement de nombreuses maladies comme la syphilis, les fièvres, le paludisme, les infections cutanées ou les troubles digestifs. Réputée pour avoir des propriétés anticancéreuses, l'écorce de plusieurs genres de *Tabebuia* sp. a été vendue au Brésil. Il est commercialisé comme compléments alimentaires sous le nom de « Lapacho » ou « pau d'arco » dans le traitement du cancer et de nombreuses maladies (Cragg & Newman 2005).

Les études menées sur ce genre d'arbre ont conduit à l'isolation de nombreux composés actifs en particulier des naphthoquinones comme le **lapachol** ou la **β -lapachone** (Figure 21) (Cragg & Newman 2005). Le premier composé a montré une activité antitumorale *in vivo* chez la souris mais les études cliniques initiées par le NCI ont échoué en raison d'une trop grande toxicité. Cependant, la β -lapachone a montré récemment des propriétés intéressantes contre de nombreuses lignées cancéreuses (sein, leucémies, prostate, colon, poumon et plusieurs lignées MDR) grâce à son activité inhibitrice de la topoisomérase I (Nobili et al. 2009).

Actuellement, des études cliniques de phase I et II permettent d'évaluer la β -lapachone en monothérapie ou en association (gemcitabine, paclitaxel) sur des tumeurs solides (pancréas, adénocarcinome) (clinicaltrials.gov 2010).

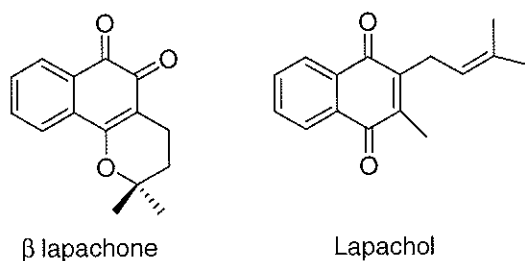


Figure 21: Structure de la β lapachone

2.4.5. L'halichondrine B

L'**halichondrine B** (Figure 22) a été isolée pour la première fois d'une éponge japonaise, *Halichondria okadai* (Halichondriidae) [Annexe 1]. Cette substance agit comme un inhibiteur de tubuline en se liant de façon non compétitive au site de liaison des vinka-alcoïdes, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M (Simmons et al. 2005).

Un dérivé synthétique, l'**éribuline** (E7389) (Figure 22), s'est avéré posséder une activité antitumorale améliorée comparée à l'halichondrine B (Simmons et al. 2005). Celui-ci est actuellement évalué, en monothérapie ou associé à d'autres cytotoxiques, par des essais cliniques de phase I et II sur des tumeurs solides (sein, pancréas, poumon non à petites cellules, rein...) (clinicaltrials.gov 2010).

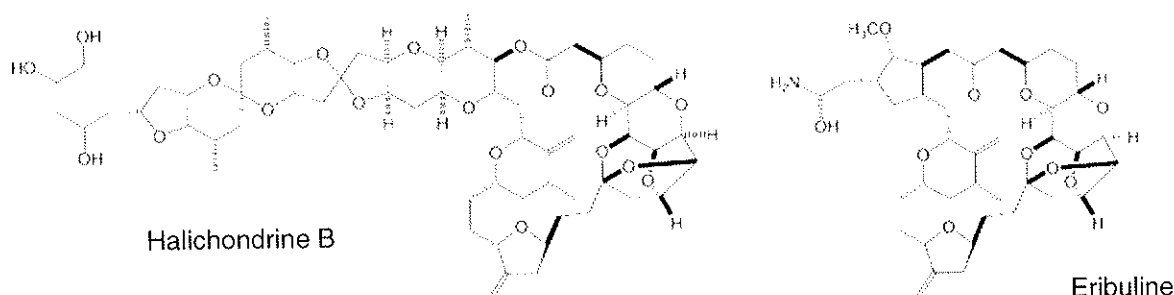


Figure 22: Structure de l'halichondrine B et son analogue synthétique

2.4.6. D'autres molécules naturelles anticancéreuses

D'autres molécules font l'objet d'études cliniques ou précliniques. Leur famille chimique, leur origine naturelle et leur mécanisme d'action sont présentés dans le Tableau I ci-après :

Nom de la molécule	source	classe chimique	mécanisme d'action	Etudes Cliniques ³	Commentaires	références
Bryostatine 1	<i>Bugula neritima</i> (bryozoaire)	Lactone macrocyclique	Inhibiteur de la protéine kinase C (PKC)	I et II	Action antitumorale synergique avec les cytotoxiques classiques.	(Banerjee et al. 2008)
Discodermolide	<i>Discodermia dissoluta</i>	polyketide	Se fixe sur les résidus d'acide aminé 305-359 dans la boucle S9-S10 de la β -tubuline	Préclinique		(Smith & Freeze 2008)
Dolastin 10	<i>Dolabella auricularia</i> (mollusque)	peptide	Inhibiteur de l'assemblage des microtubules	II	Un analogue de synthèse : TZT-1027 (Soblidotin) est en étude clinique de phase II.	(Simmons et al. 2005)
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens</i> (mollusque)	peptide	Action sur l'expression de la protéine ErbB	I et II	Etudiée sur des tumeurs solides, l'effet indésirable limitant est l'élévation des transaminases.	(Pardo et al. 2008)
Perillyl alcohol	<i>Lavandula sp.</i> (Lamiaceae)	monoterpène	Non élucidé (anti-angiogénique)	I et II	Les études cliniques démontrent une faible activité anti-tumorale sur le cancer du sein et de la prostate mais des études sur le cancer de la peau sont en cours de recrutement.	(Bailey et al. 2008)(L. Pan et al. 2010)
Rapamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	macrolide	Inhibiteur de m-TOR	I et II	SIROLIMUS® indiqué dans les rejets de greffons. II est étudié dans les tumeurs solides.	(Nobili et al. 2009)
Peloruside A	<i>Mycate hentscheli</i> (éponge)	macrolide	Agent stabilisant des microtubules	Préclinique	Disponible par la chimie synthétique et l'aquaculture	(Mayer & Gustafson 2008)
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinospora tropica</i> (Micromonosporaceae)	alcaloïde	Inhibiteur de protéasome	I	En cours de recrutement dans le traitement du cancer du poumon, du lymphome et du myélome	(Femical et al. 2009)
Silvestrol	<i>Aglaia foveolata</i> (Meliaceae)	Cyclopenta- β -benzofurane	Non encore élucidé	Préclinique	Cette molécule possède une activité cytotoxique <i>in vitro</i> sur des cellules cancéreuses du poumon (Lu1, DL ₅₀ = 1,2 nM), de la prostate (LNCaP, DL ₅₀ = 1,5 nM) et du sein (MCF-7, DL ₅₀ = 1,5 nM).	(Balunas & Kinghorn 2005)
Squalamine	<i>Squalus acanthias</i> (requin)	aminostéroïde	Cible la bicouche phospholipidique	II	Etude sur le cancer de l'ovaire en cours	(Simmons et al. 2005)
Thapsigargin	<i>Thapsia garganica</i> (Apiaceae)	sesquiterpène- γ -lactone	Inhibition des ATPase Ca ²⁺ présentes sur le réticulum endoplasmique et le sarcoplasme conduisant à une élévation intracellulaire de [Ca ²⁺] puis la fragmentation de l'ADN.	I	Etude clinique sur les tumeurs solides avancées	(Jakobsen et al. 2001)

³ (clinicaltrials.gov 2010)

Tableau 1: Les molécules naturelles en développement clinique ou pré-clinique

3. Conclusion

Malgrès leur toxicité et leur manque de sélectivité, les cytotoxiques sont des molécules indispensables au traitement des cancers. Leur efficacité est prouvée et ils ont contribué à la guérison de nombreux malades en association avec la chirurgie ou l'irradiation.

Les cytotoxiques très utilisés aujourd'hui sont les médicaments issus des produits naturels comme les vinca-alcaloïdes et les taxanes.

Il est important de noter que d'autres types de chimiothérapies, non développées dans ce chapitre, existent également:

- Les antibiotiques antitumoraux comme les anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine), l'actinomycine D, la mitomycine C ou la bléomycine.
- L'hormonothérapie : les stéroïdes, inhibiteurs d'aromatase, les agonistes de la GnRH.
- L'immunothérapie : interférons, interleukines qui stimulent les défenses immunitaires (immunomodulateurs).
- Les anticorps monoclonaux comme Rituximab peuvent compléter un traitement par cytostatiques pour certains types de tumeurs.

L'utilisation en polythérapie de plusieurs composés ayant des mécanismes d'action différents permet d'améliorer le succès des traitements.

Néanmoins, avec l'emploi régulier des cytotoxiques au cours des chimiothérapies, les cellules cancéreuses deviennent de plus en plus résistantes et causent un échappement thérapeutique : les traitements deviennent alors, à long terme, inefficaces.

Ce processus n'est pas une fatalité et fait l'objet de recherche afin de comprendre les mécanismes impliqués et de disposer soit de molécules capables d'interférer avec ces mécanismes de résistance, soit de données permettant le design d'anticancéreux ne causant pas de résistance.

DEUXIEME PARTIE

LA RESISTANCE DES CELLULES CANCEREUSES AUX TRAITEMENTS

Les cellules cancéreuses peuvent développer un phénotype capable de résister à l'action de nombreuses molécules n'ayant aucune similarité de structure. Ce phénomène, appelé « **Multidrug Resistance** » ou **MDR** a été décrit sous plusieurs formes. Un des mécanismes majeurs de résistance implique l'activité de transporteurs membranaires qui expulsent les anticancéreux en dehors de la cellule, ce qui diminue ainsi la concentration intracellulaire des médicaments cytotoxiques.

1. Les transporteurs impliqués dans le phénomène de MDR (Lage 2003)

Il existe deux grandes familles de transporteurs (Figure 23) :

- La superfamille des ATP-binding cassette ou transporteurs ABC qui nécessitent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et qui ont été identifiés sur les membranes des cellules cancéreuses mais également dans des micro-organismes pathologiques.
- La seconde classe de transporteurs nécessite, quant à elle, l'échange de protons ou d'ions sodium le long d'un gradient de concentration. Elle est composée de plusieurs familles : la superfamille Small MDR (SMR), la famille Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE), la famille de Resistance-Nodulation-cell Division (RND), la superfamille Major Facilitator (MFS).

Les transporteurs ABC jouent le rôle le plus important dans l'efflux des médicaments dans les cellules eucaryotes telles que les cellules cancéreuses, tandis que la seconde classe joue un rôle prédominant dans l'expulsion des médicaments dans les organismes procaryotiques tels que les bactéries.

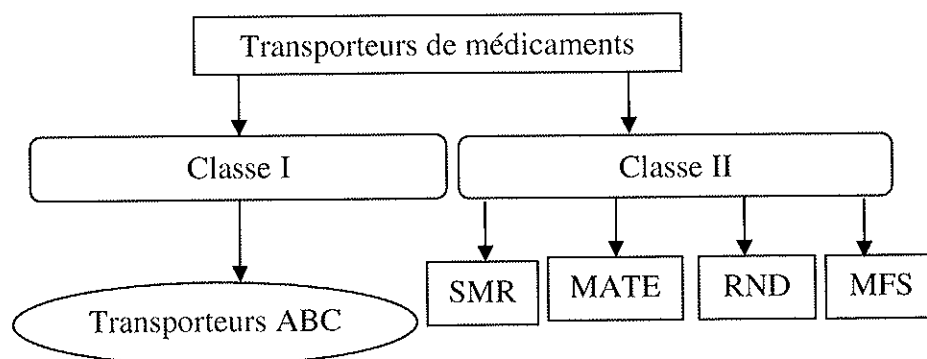


Figure 23 : Schéma présentant les différents transporteurs de médicaments (adapté de (Lage 2003))

2. Le rôle physiologique des transporteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC regroupe, en 2009, 49 gènes répartis en 7 sous-familles (ABC-A à G) [Annexe 2]. Ces dernières sont présentes dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Ces gènes codant pour les protéines ont été identifiés et présentent une homologie de séquence (Huls et al. 2009).

Physiologiquement, les transporteurs ABC jouent un rôle important dans les organes barrières comme le tube digestif, le foie, le rein. Ils sont responsables de l'excrétion intracellulaire de composés toxiques et de leurs métabolites et jouent ainsi un rôle protecteur (Gillet et al. 2007). De nombreux composés peuvent être transportés par ces pompes à efflux. C'est le cas des peptides, des sucres, des lipides, des métaux lourds chélatés, des stéroïdes, des acides inorganiques ou encore des conjugués au glutathion. Plusieurs transporteurs ABC sont capables de transporter des composés spécifiques tandis que d'autres peuvent effluer de nombreuses substances (Theodoulou 2000).

Le taux d'expression de ces protéines est très bien régulé. Ces transporteurs jouent donc un rôle protecteur déterminant dans l'absorption, la distribution et l'excrétion des xénobiotiques et leurs métabolites. L'expression de ces pompes à efflux par les cellules apicales du tube digestif empêche l'entrée de certaines molécules dans la circulation générale. Leur métabolisation peut être perturbée par l'expression de certains transporteurs ABC au niveau du foie pouvant conduire à leur élimination dans la bile ou la circulation générale. L'élimination des xénobiotiques hydrosolubles peut être accélérée par la présence de ces transporteurs le long de la membrane apicale du tube proximal (Huls et al. 2009). Ils jouent un rôle barrière au niveau du SNC, des testicules ou du placenta en empêchant le passage de certaines molécules au niveau du cerveau ou du fœtus (Gottesman et al. 1996). Ils jouent également un rôle au niveau du système immunitaire en transportant des peptides à l'intérieur du réticulum endoplasmique identifiés comme antigènes par les molécules de la classe I HLA (antigènes des leucocytes humains). De plus, ils possèdent un rôle dans le transport des lipides et dans l'homéostasie (Gillet et al. 2007).

Le système de défense physiologique formé par des transporteurs ABC permet de lutter contre l'accumulation de composés potentiellement nuisibles. Dans une situation de dégâts d'organe ou de maladie, les taux d'expression des transporteurs ABC peuvent changer.

Cette modification apparaît probablement pour compenser une charge accrue de produits nuisibles ou la perte excessive de composés, lorsque les tissus sont endommagés. Ainsi dans certaines pathologies du foie (comme l'hépatite chronique, la nécrose ou la cirrhose) certains transporteurs ABC sont surexprimés prévenant ainsi l'accumulation des produits toxiques et donc les dommages au foie. Dans le syndrome de Dubin Johnson qui se traduit par une hyperbilirubinémie, le transporteur ABCC2 est génétiquement défaillant. Les patients atteints compensent ce défaut en surexprimant le transporteur ABCC3 au niveau hépatique pour limiter les dommages dus à cette maladie (Huls et al. 2009).

Il est important de noter que des mutations aléatoires sont capables d'affecter les gènes codant pour ces transporteurs ABC conduisant ces protéines à jouer un « mauvais » rôle. Ces mutations ne sont pas rares mais souvent récessives sauf dans certains cas (Gillet et al. 2007).

En 2007, treize transporteurs ABC sont associés au phénomène de résistance aux médicaments (Gillet et al. 2007) :

- ABCA2,
- ABCB1, B4, B11,
- ABCC1(ou MRP1), C2, C3, C4, C5, C6, C11, C12,
- ABCG2 (ou BCRP).

L'étude de la protéine ABCB1, connue également sous le nom de MDR1 ou glycoprotéine P (P-gp) sera détaillée dans la suite de cette partie car c'est le transporteur ABC le plus impliqué dans le phénomène de MDR et le plus décrit. De plus, c'est la protéine utilisée comme cible biologique pour la partie expérimentale de cette thèse.

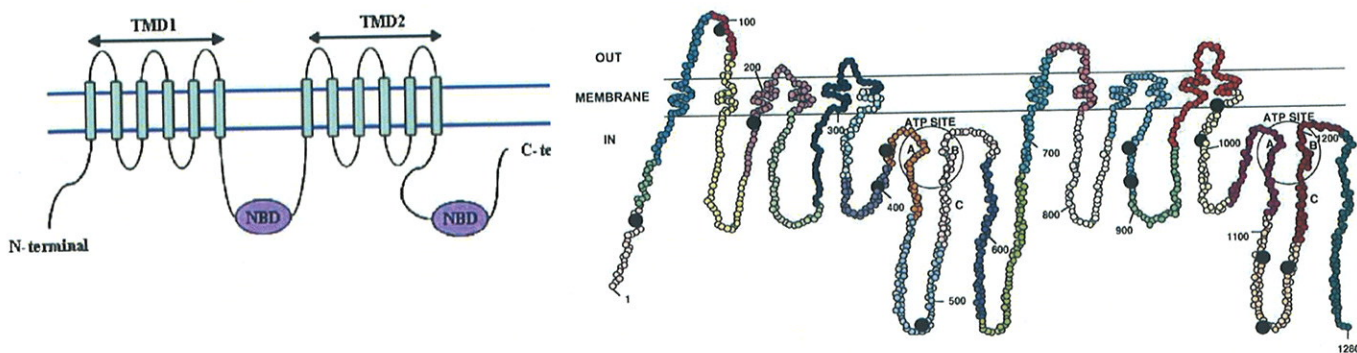
3. La protéine ABCB1

3.1. Structure d'ABCB1

ABCB1 est une pompe à efflux qui transfère un large éventail de produits naturels ou synthétiques à travers les membranes cellulaires (Teodori et al. 2002).

Plusieurs isoformes d'ABCB1 existent, ils sont codés par les gènes MDR1 (= ABCB1) et MDR2 chez l'homme (mdr1 et mdr2 chez le rat). Seul le gène MDR1 est responsable du phénomène de résistance et confère aux cellules un phénotype dit MDR. Le gène MDR1 humain code pour un polypeptide de 1280 acides aminés (170 kDa) (Teodori et al. 2002). La structure des transporteurs ABC comprend quatre domaines (Figure 24) :

- **Deux domaines hydrophobes ou domaines TMD** (transmembrane domain) composés de 610 AA qui forment 6 hélices (identifiées TM1 à TM6 pour TMD1 et TM7 à TM12 pour TMD2) et sont impliqués dans la reconnaissance des substrats (Ambudkar et al. 2006).
- **Deux domaines ABC ou NBD** (nucleotide-binding domain), très conservés situés dans le cytoplasme. Ils sont constitués d'environ 215 acides aminés (AA) et contiennent deux motifs courts (Walker A et B) impliqués dans la liaison à l'ATP, une séquence appelée « signature ABC » ou motif LSGGQ et les boucles Q, D et H. Les deux domaines NBD forment un « sandwich » (Ambudkar et al. 2006).

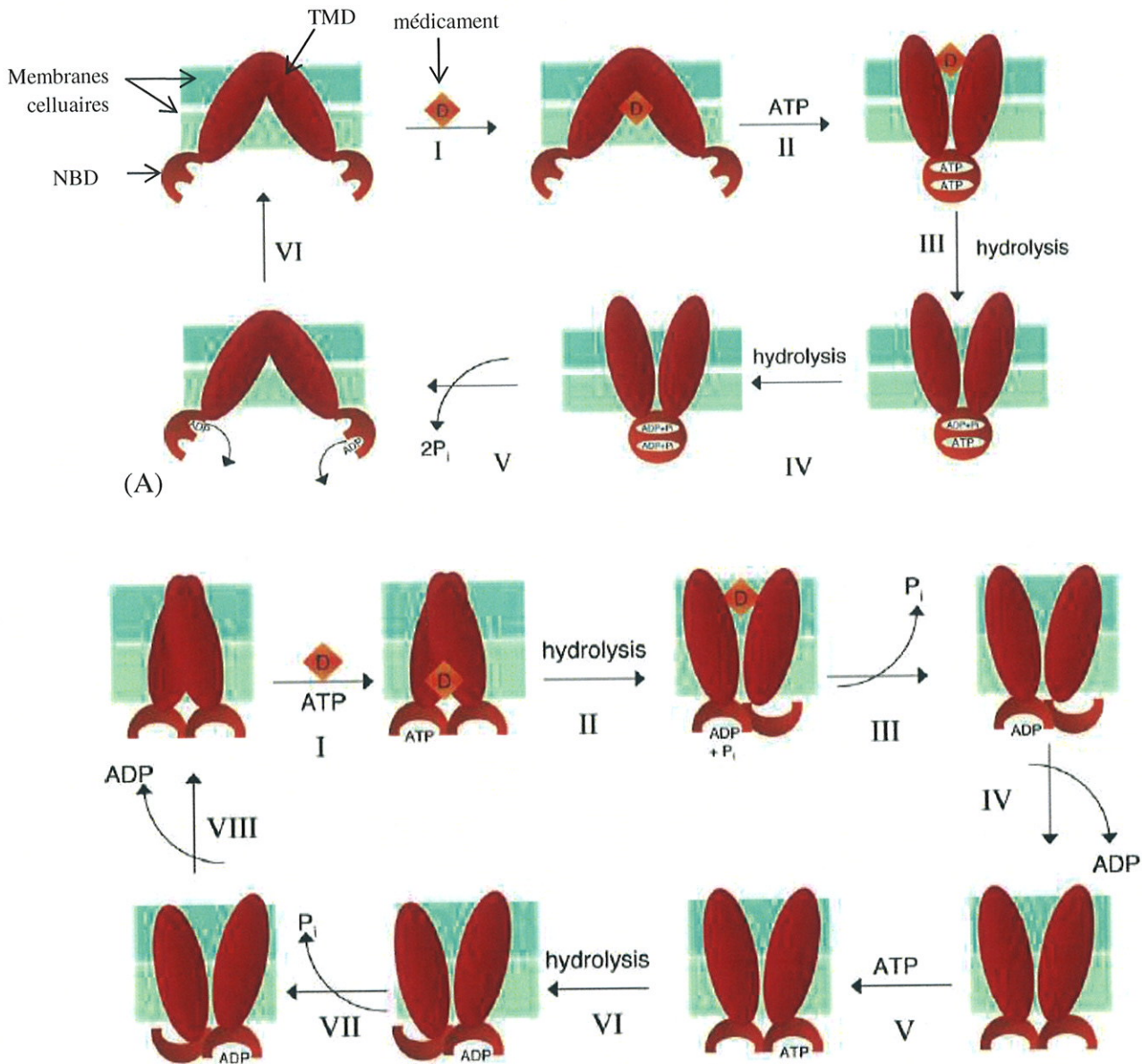


3.2. Mécanisme de transport

Les molécules substrats d'ABCB1 c'est-à-dire les substances chimiques capables d'être transportées par cette protéine peuvent être structurellement très différentes. Cependant, au vu des propriétés physiques partagées par beaucoup d'entre elles, un profil de substrat type permet d'inclure les molécules très hydrophobes, de nature amphiphile ou ayant une charge positive nette (Teodori et al. 2002).

ABCB1 est une pompe à efflux capable d'agir sur une large gamme de molécules sans rapport structurel en puisant son énergie dans l'hydrolyse de l'ATP. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire le mécanisme de transport d'ABCB1 (Ambudkar et al. 2006) (Figure 25) :

- Le modèle (Figure 25A) propose une dimérisation des deux sites de liaisons à l'ATP (NBD) comme initiateur de transport : le médicament se lie avec une haute affinité sur le site de liaison TMD (I). Cette liaison permet la dimérisation des deux domaines NBD « en sandwich », leur affinité pour l'ATP étant augmentée. Le changement de conformation induite par cette dimérisation diminue l'affinité du médicament pour l'endroit où il se situe (II). Deux hydrolyses successives de l'ATP (III et IV) permettent de fournir l'énergie nécessaire à la rupture du dimère NBD (V) afin qu'ABCB1 retrouve son état initial (VI) (Ambudkar et al. 2006).
- Le modèle (Figure 25B) propose l'hydrolyse de l'ATP comme initiateur du transport : la liaison d'une molécule d'ATP sur un NBD et celle du médicament au TMD permettent de déclencher le cycle de transport (I). Ces deux liaisons ne s'influencent pas. L'ATP, présent sur l'un des NBD est hydrolysé ce qui conduit à un changement de conformation de la protéine (II). Ce changement diminue l'affinité du médicament pour son site de liaison et l'hydrolyse de l'ATP conduit à sa libération (III et IV). La protéine se trouve dans une conformation dite de « faible affinité » pour fixer un substrat. La fixation (V) puis l'hydrolyse (VI) d'une deuxième molécule d'ATP permet de restaurer la conformation initiale d'ABCB1.



(B)

Figure 25 : Schéma représentant les différents modèles de cycle de transport des substrats d'ABCB1 (Ambudkar et al. 2006)

3.3. Le rôle physiologique d'ABCB1

ABCB1 est exprimée de façon constitutive dans de nombreux tissus (Tableau 2) notamment à la surface apicale des cellules des intestins, du foie, du tube proximal des reins, des canaux biliaires ou du pancréas. Elle est impliquée dans l'excrétion des composés endogènes ou exogènes hydrophobes et amphiphiles (aliments, médicaments...). Sa présence au niveau des cellules endothéliales des capillaires du cerveau, des testicules ou du placenta suggère un rôle de barrière ou de protection de ces organes (Gottesman et al. 1996). En effet,

la barrière placentaire constituée par ABCB1 permet de réguler le transfert de certaines substances entre la mère et le fœtus et donc de protéger ce dernier des composés toxiques. La barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le cerveau et le sang permet quant à elle d'éliminer de la circulation cérébrale des composés hydrophobes qui ont traversé la BHE activement et qui sont trop gros pour traverser les membranes passivement. ABCB1 permet également d'éliminer vers le compartiment sanguin, toutes les petites molécules qui pénètrent dans l'encéphale par diffusion passive. Cette protéine régule donc l'entrée de nombreux composés dans le cerveau, ce qui explique les faibles concentrations de certains médicaments neurologiques notamment les antiépileptiques. Elle est également retrouvée dans les cellules souches de la moelle osseuse, dans les macrophages matures ou encore au niveau des cellules T (Teodori et al. 2002).

<u>LOCALISATION</u>	<u>TRANSPORTEUR(S)</u>
Glandes surrénales	ABCB1, ABCC3
Hématies	ABCB1
SNC	ABCB1
Rein	ABCB1, ABCC2, ABCC3, ABCC6
Vésicule biliaire	ABCB1, ABCC2, ABCC3
Foie	ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6
Pancréas	ABCB1, ABCC3, ABCC4
Sein	ABCB1, ABCG2
Placenta	ABCB1
Testicules	ABCB1, ABCC4

Tableau 2 : Distribution physiologique d'ABCB1 dans les tissus (Coley 2008)

3.4. Son implication dans le phénomène de MDR

Des études ont montré qu'ABCB1 est surexprimée dans certains cancers notamment du côlon, du sein, du pancréas, du rein ou des glandes surrénales. L'amplification de son rôle physiologique protecteur devient alors un obstacle pour le traitement des cellules cancéreuses qui sont capables de rejeter massivement les anticancéreux dans la circulation (Tableau 3) ce qui contribue à l'échec des traitements (McDevitt & Callaghan 2007).

L'expression amplifiée d'ABCB1 est associée à un risque trois fois plus élevé d'échec thérapeutique par rapport aux tumeurs n'exprimant pas le transcrit ou la protéine. La proportion de cancers du sein exprimant ABCB1 est d'environ 41%. Ce risque est encore majoré si la mesure d'ABCB1 est effectuée après chimiothérapie (Calvo & Mourah 2002).

L'évaluation quantitative ou qualitative des transporteurs ABC est donc importante pour mettre en place une chimiothérapie personnalisée, mieux adaptée à la tumeur du patient.

<u>Protéine</u>	<u>Substrats endogènes</u>	<u>Substrats cytotoxiques</u>
ABCB1 (MDR1 ou P-gp)	Estrogène glucuroconjugué (estradiol, estriol), endorphine, glutamate, stéroïdes (cortisol, aldostérol, corticostérone), β -amyloïde	Actinomycine-D, daunorubicine, docetaxel, doxorubicine, étoposide, épirubicine, homoharringtonine, mitoxantrone, paclitaxel, téniposide, topotécan, vinblastine, vincristine, vinorelbine, VP16.
ABCC1 (MRP1)	Glutathione S-conjugate leukotriène C4, glucuronosyl bilirubine	Daunorubicine, doxorubicine, épirubicine, étoposide, méthotrexate, paclitaxel, vincristine, vinorelbine.
ABCC2 (MRP2)	Glutathione S-conjugate leukotriène C4, glucuronosyl bilirubine	cisplatine, doxorubicine, étoposide, irinotecan, méthotrexate, vincristine, vinblastine, SN-38.
ABCG2 (BCRP)	Hème ou porphyrine	Camptothécine, daunorubicine, doxorubicine, épirubicine, flavopiridol, mitoxantrone, SN-38, topotecan, irinotecan.

Tableau 3 : Les substrats de quelques transporteurs ABC (Choi 2005)

Plusieurs travaux proposent de trouver des solutions pour contrecarrer la résistance aux cytotoxiques : soit en inhibant les transporteurs MDR, soit en supprimant ou en contournant ses mécanismes (Ozben 2006).

L'utilisation d'anticancéreux capables d'échapper aux transporteurs ABC pourrait être une solution permettant d'éviter la résistance aux médicaments. Certains anticancéreux ne sont pas substrats des transporteurs ABC. C'est le cas, par exemple, du cyclophosphamide (agent alkylant), du 5-fluorouracile (antimétabolite) ou de l'annamycine et de la doxorubicine-peptide (anthracyclines modifiées) (Choi 2005).

Une autre méthode permet d'échapper au phénomène MDR, c'est la co-administration d'anticancéreux et de substances capables d'inhiber les transporteurs ABC. Ces composés réversent la résistance des cellules cancéreuses qui deviennent à nouveau sensibles aux cytotoxiques. Généralement, ils ne sont pas spécifiques d'un seul transporteur ABC et ils sont

appelés « chemosensitizers », modulateurs de MDR, inhibiteurs de MDR ou agents réversants le phénotype MDR (Ozben 2006).

4. Les méthodes d'exploration du fonctionnement et de l'inhibition d'ABCB1

Il est possible d'évaluer la capacité des molécules à moduler l'efflux d'ABCB1 en utilisant des tests d'accumulation intracellulaire :

- Le test à la rhodamine 123 : la rhodamine 123 est un fluorochrome cationique capable de franchir passivement la membrane des cellules intactes pour se fixer sur les mitochondries. Sa longueur d'onde d'excitation est 485 nm, sa longueur d'onde d'émission est 538 nm. Elle est éfluée en dehors de la cellule par transport actif via ABCB1. La quantité de rhodamine présente dans la cellule exprimant ABCB1 et exposée à un inhibiteur, est proportionnelle à l'inhibition d'ABCB1.
- Le test à la calcéine : la calcéine-AM, un ester acétique non-fluorescent de la fluorescéine. Elle traverse passivement les membranes des cellules et est hydrolysée par les estérases cytosoliques exprimées uniquement dans les cellules vivantes. Le produit d'hydrolyse est la calcéine, qui donne par fluorescence un signal vert intense à 530 ± 12 nm. Elle est éfluée en dehors de la cellule par transport actif via ABCB1. La quantité de calcéine présente dans la cellule exprimant ABCB1 et exposée à un inhibiteur, est proportionnelle à l'inhibition d'ABCB1.
- Le test à la [3 H] digoxine : la [3 H] digoxine est un substrat spécifique d'ABCB1. La quantité de [3 H] digoxine présente dans des cellules surexprimant ABCB1 et exposée à un inhibiteur est proportionnelle à l'inhibition d'ABCB1.

Pour localiser précisément le site d'interaction entre le transporteur ABC et la molécule substrat, il est possible de réaliser des études de marquage par photoaffinité. Des

composés photoactifs obtenus à partir des principaux substrats d'ABCB1 peuvent se lier directement par liaison covalente à ABCB1 après traitement à la lumière. C'est le cas par exemple de la [³H]azidopine, une dihydropyridine analogue du vérapamil portant une fonction azide capable de former une liaison covalente avec la protéine après photoactivation. La diminution de la quantité de radioactivité fixée sur la protéine en présence d'une molécule démontre que cette dernière est vraisemblablement substrat (Kobayashi et al. 1997).

Des études par spectrométrie de masse (SM) comme le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) peuvent également être réalisées.

5. Les modulateurs d'ABCB1

ABCB1 étant le transporteur ABC le plus impliqué dans le phénomène de MDR, il apparaît comme une cible intéressante d'intervention dans le traitement du cancer. Les modulateurs d'ABCB1 décrits sont capables de changer le phénotype des cellules MDR *in vitro* probablement par compétition avec les substrats transportés ou en interagissant sur le site de liaison du médicament (Ozben 2006).

De très nombreuses molécules, naturelles ou synthétiques, montrent une activité inhibitrice de MDR.

Une sélection de ces composés synthétiques est résumée dans le tableau 4 ci-dessous. Les molécules naturelles seront décrites plus en détail dans la partie 3 de ce manuscrit.

<u>Composé</u>	<u>Classe chimique (pharmaceutique)</u>	<u>protéine cible</u>	<u>Composé</u>	<u>Classe chimique (pharmaceutique)</u>	<u>protéine cible</u>
Astemizole	Dérivé pypéridinique (antiH1)	ABCB1	Ketoconazole	Imidazole (antifongique)	ABCB1
Benzquinamide	Alcaloïde (antiémétique)	ABCB1	Lomerizine	Alcaloïde	ABCB1
Bepridil	Dérivé pyrrolidinique (inhibiteur calcique)	ABCB1	Mefloquine	Alcaloïde (Antipaludéen)	ABCB1
Bleu de méthylène	Dérivé phénothiazinique (antiseptique)	ABCB1	Méthadone	Opiïde (désintoxication aux Opiacés)	ABCB1
Diltiazem	Benzothiazépine (inhibiteur calcique)	ABCB1	Ofloxacin	fluoroquinolone (antibiotique)	ABCB1
Dmt-Tic	Opiïde (analgésique)	ABCB1	Oxatomide	phénylpiperazine (antiH1)	ABCB1
Flunarizine	Dérivé pipérazine (antimigraineux)	ABCB1	Primaquine	Alcaloïde quinoléique (antipaludéen)	ABCB1-ABCC1
Glibenclamide	Sulfonylurée (antidiabétique)	ABCB1-ABCC1	Secoverine	Alcaloïde	ABCB1
Halopéridol	Dérivé pipéridinique (Antpsychotique)	ABCB1	Terfenadine	Dérivé piperidinique (antiH1)	ABCB1
Hapalosine	Peptide cyclique	ABCB1	Thioridazine	Phénothiazine (Neuroleptique)	ABCB1
Hexanoylgluco-sylceramide	Sphingolipide	ABCB1	Trazodone	Dérivé pipérazinique (antidépresseur)	ABCB1

Tableau 4 : Sélection de molécules synthétiques qui présentent une activité sur le phénotype MDR (Teodori et al. 2002)

5.1. Les inhibiteurs de première génération (Ozben 2006) (Gillet et al. 2007)

Les chemosensitizers de première génération sont des médicaments qui ont une grande diversité de structure et d'activité pharmacologique, ils n'ont pas été développés spécifiquement pour inhiber ABCB1.

Ce sont des inhibiteurs des canaux calciques (**vérapamil**), des antagonistes de la calmoduline, des hormones stéroïdiennes, des œstrogènes (**tamoxifène**), des inhibiteurs de la protéine kinase C, des immunosuppresseurs (la **cyclosporine A**), certains antipaludéens (quinine), des alcaloïdes indoliques (la réserpine), des détergents comme le cremophor EL et certains surfactants (Figure 26).

Une étude randomisée de phase III utilisant la cyclosporine A en association avec la cytarabine et la daunorubicine a permis d'améliorer le pronostic des patients ayant une leucémie myéloïde aiguë (clinicaltrials.gov 2010). Néanmoins, la plupart des essais cliniques avec ces modulateurs ont échoué, souvent en raison des effets indésirables liés à l'activité thérapeutique principale de ces molécules. En effet, leur affinité pour les transporteurs ABC est faible et nécessite l'administration de doses toxiques pour inhiber ABCB1.

Ainsi, le potentiel limité de ces molécules a conduit au développement de molécules plus spécifiques des transporteurs ABC, plus efficaces et moins toxiques.

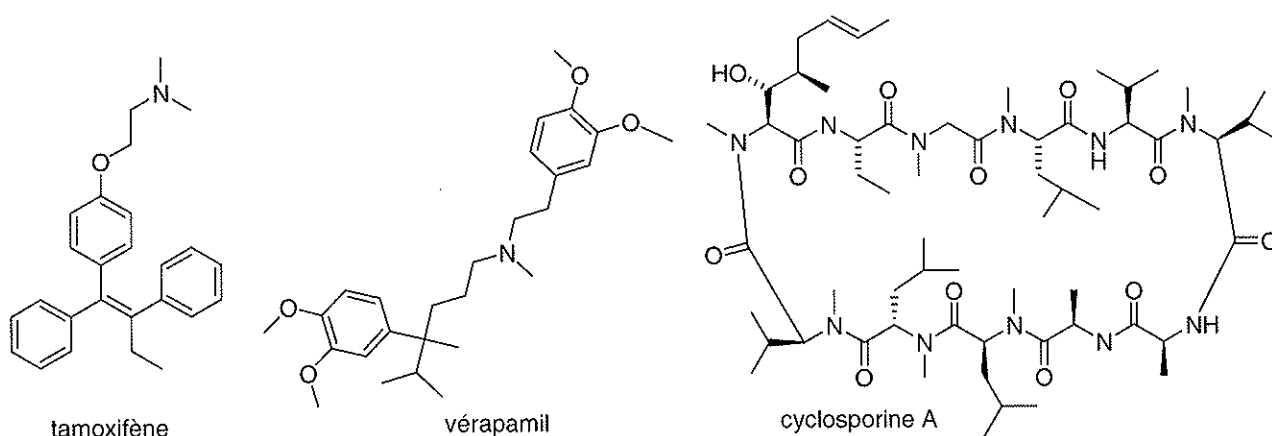


Figure 26 : Exemple de structure des modulateurs de première génération

5.2. Les inhibiteurs de deuxième génération (Ozben 2006) (Gillet et al. 2007)

Les molécules dites inhibiteurs de deuxième génération, sont des composés ayant un profil pharmacologique plus sélectif pour ABCB1 et possédant moins d'effets indésirables.

Ce sont des molécules comme le **torémifène**, un analogue du tamoxifène ou le **valsopodar** (PSC833) un analogue de la cyclosporine A (Figure 27).

Le valsopodar s'est montré vingt fois plus efficace que la cyclosporine A avec une moindre toxicité. Il est évalué dans des études cliniques de phases I et II et III en association avec la daunorubicine, la cytarabine, l'étoposide, et l'interleukine 2 dans le traitement des

leucémies. Il fait l'objet d'études cliniques de phase II dans le traitement du cancer du sein en association avec le paclitaxel (clinicaltrials.gov 2010).

Cependant, ces molécules sont à la fois un substrat des transporteurs ABC mais également du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). En inhibant ce cytochrome, elles ont contribué à l'augmentation des concentrations plasmatiques des médicaments cytotoxiques co-administrés via une inhibition de leur métabolisme et de leur excrétion de sorte que le traitement devient toxique. Afin de limiter la toxicité des anticancéreux, les doses ont été diminuées mais le cytotoxique est rendu pharmacologiquement inefficace.

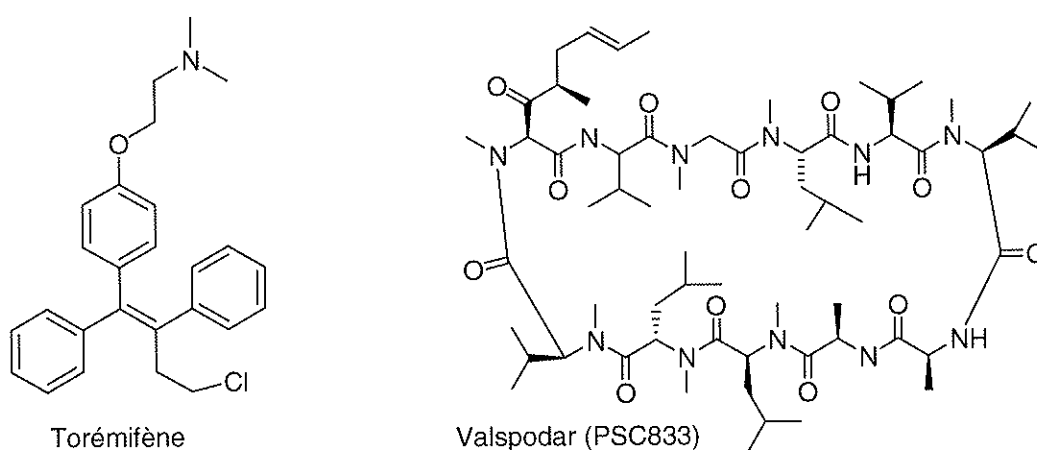


Figure 27 : Exemple de structure des modulateurs de seconde génération

5.3. Les inhibiteurs de troisième génération (Ozben 2006) (Gillet et al. 2007)

Les inhibiteurs de troisième génération sont des molécules qui ne sont pas métabolisées par le cytochrome P450 3A4 et qui ne perturbent donc pas la pharmacocinétique des anticancéreux co-administrés. Ils ont été intensivement expérimentés *in vitro* lors d'études de relation structure/activité. Ce sont des agents qui modulent spécifiquement ABCB1 mais pas les autres transporteurs ABC. Ils ont montré une amélioration significative des chimiothérapies sans avoir besoin de réduire les doses d'anticancéreux.

C'est le cas de molécules telles que le **zosuquidar** (LY335979) un dérivé de la quinine, le **tariquidar** (XR9576) ou le **laniquidar** (R101933) (Figure 28).

L'un des inhibiteurs de troisième génération les plus prometteurs est le tariquidar car une seule injection inhibe ABCB1 pendant 48h. Cette molécule se lie de façon spécifique et non par compétition à la pompe ABCB1 avec une haute affinité, inhibant puissamment l'activité du transporteur. Des études cliniques de phase I et II en association avec le paclitaxel et la vinorelbine dans le cancer ovarien ont été fructueuses. Elles ont montré des interactions pharmacocinétiques moindres par rapport aux inhibiteurs de deuxième génération mais conduisant malgré tout à une réduction des concentrations circulantes en anticancéreux. Des études de phase III ont commencé chez des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules. Ces études ne montrent aucune altération pharmacocinétique des cytotoxiques co-administrés, ce qui présente l'avantage de ne pas réduire les doses d'anticancéreux au cours des traitements.

Des études cliniques concernant cette nouvelle génération de modulateurs sont en cours avec l'objectif d'améliorer la durée de vie des patients atteints de cancer (clinicaltrials.gov 2010).

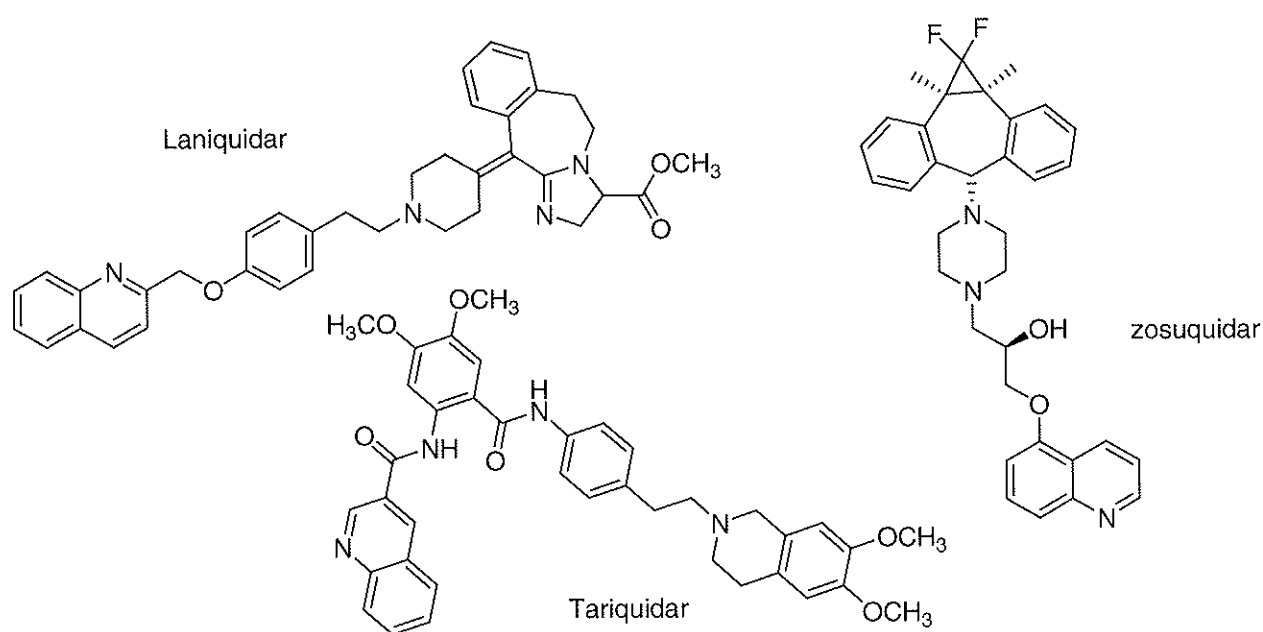


Figure 28 : Exemple de structure des modulateurs de troisième génération

6. Conclusion

Mieux comprendre le mécanisme d'action des protéines impliquées dans le phénomène de résistance, trouver des molécules inhibitrices de MDR et utiliser des anticancéreux actifs sur ces cellules sont les différentes stratégies mises en œuvre pour améliorer les traitements du cancer.

La connaissance des mécanismes de résistance a encouragé la recherche d'analogues structuraux de médicaments cytotoxiques avec comme objectif de ne pas être substrat d'ABCB1. Il est important de découvrir de nouveaux cytotoxiques qui ne sont pas concernés par ce phénomène de résistance. C'est pour cela que de nouveaux taxanes sont actuellement en cours de développement clinique. Ils sont actifs sur des cellules tumorales surexprimant ABCB1. Le risque de l'emploi de ces nouveaux cytotoxiques serait de voir les cellules cancéreuses s'adapter à ces nouveaux traitements. Il serait alors gênant de voir apparaître des résistances au fur et à mesure de leur utilisation. Afin d'éviter ce phénomène, leur usage devrait donc être rigoureusement maîtrisé, comme c'est le cas aujourd'hui pour les antibiotiques.

Parallèlement, la recherche sur les inhibiteurs d'ABCB1 doit continuer car, à ce jour, aucun inhibiteur de transporteurs ABC n'est utilisé en clinique. Pour développer de nouvelles molécules actives, il est important de les évaluer en réalisant des tests biologiques pertinents et adaptés. Cela se traduit par la mise en place de tests d'inhibition non seulement d'ABCB1 mais également de l'ensemble des protéines impliquées dans le phénomène de résistance.

TROISIEME PARTIE

LES PRODUITS NATURELS COMME SOURCE D'INHIBITEUR D'ABCB1

En 2010, plusieurs molécules inhibitrices de MDR font l'objet d'études cliniques (valsopodar, tariquidar...) mais aucun inhibiteur de MDR n'est commercialisé. La recherche doit donc se poursuivre afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs de MDR.

Les produits naturels représentent une source potentielle d'inhibiteurs d'ABC B1 car ils constituent une mine de nouvelles structures chimiques. Depuis 1977, de nombreux travaux ont permis d'étudier les substances naturelles sur l'activité d'ABC B1 (Figure 29). La recherche d'inhibiteurs d'ABC B1 s'est intensifiée dans les années 2000 jusqu'en 2008. Un déclin s'observe depuis l'année dernière.

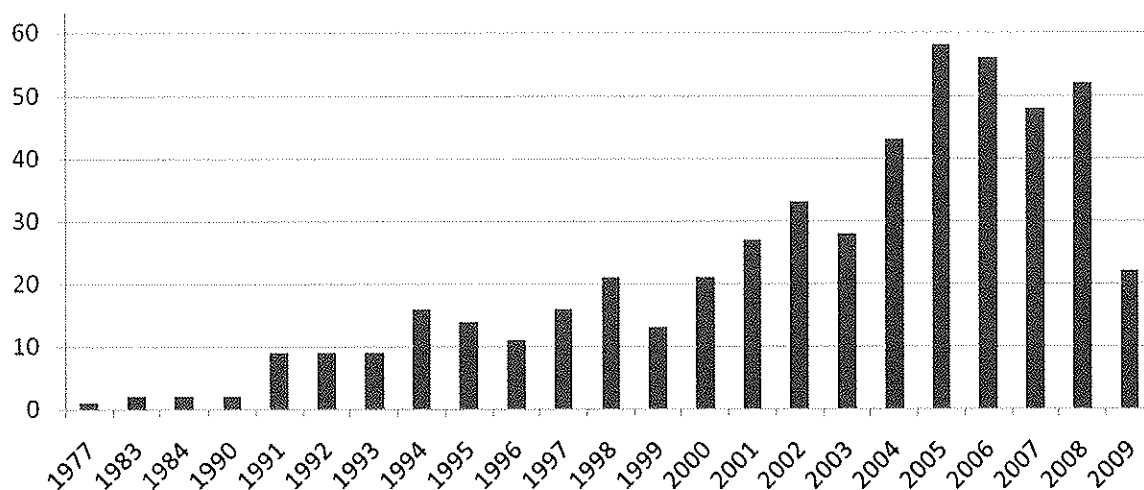


Figure 29 : Evolution du nombre de publications éditées entre 1977 et 2009 pour une recherche de mots-clé « extract » et « P-gp »

On trouve dans la littérature scientifique a décrit de nombreuses molécules capables de contrecarrer le phénomène de résistance via l'inhibition d'ABC B1.

1. Les terpènes

Plusieurs études de criblage réalisées par Yoshida sur de nombreux terpènes naturels ont permis de mettre en lumière l'activité inhibitrice d'ABC1 de certaines molécules (Figure 30).

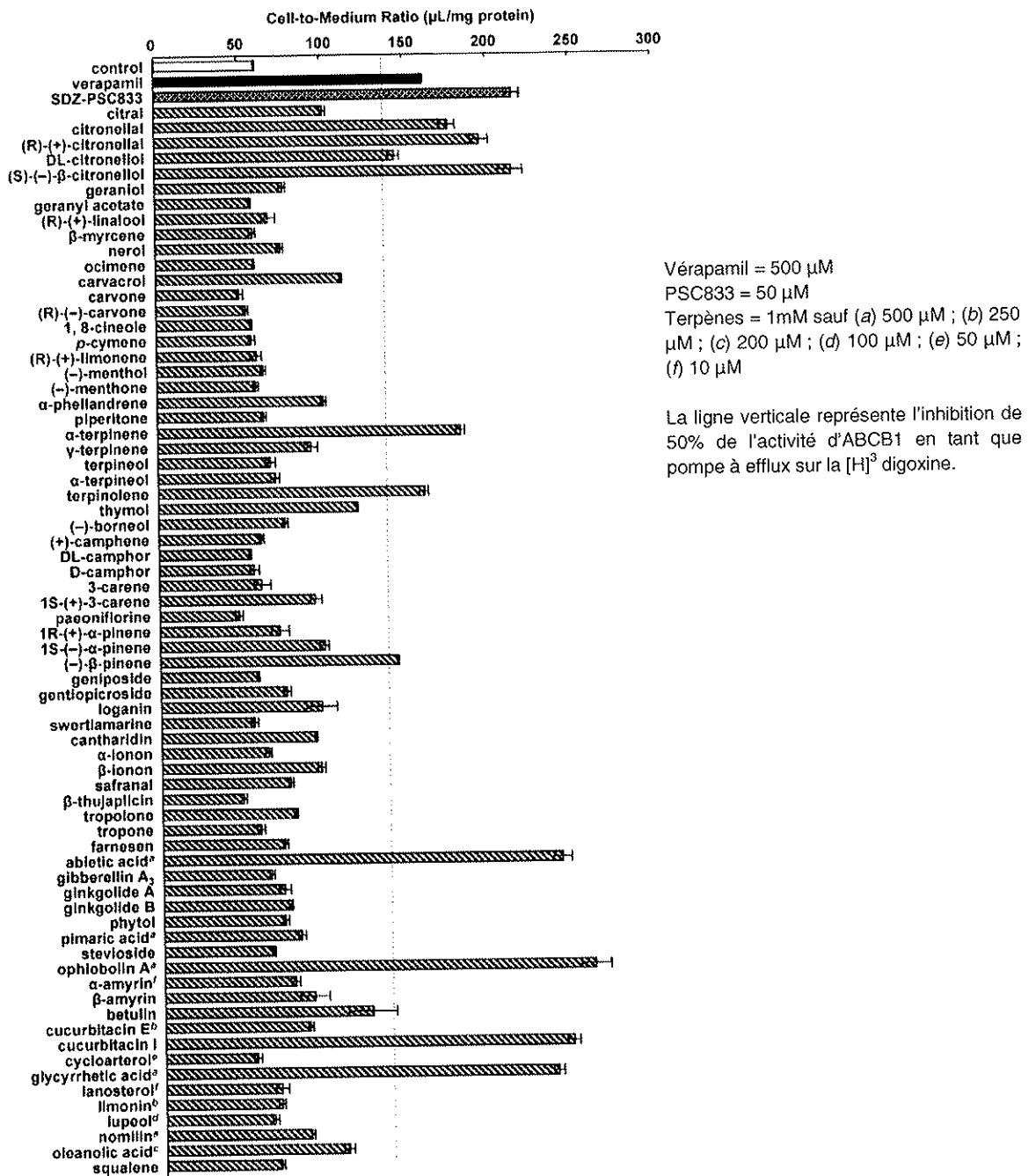


Figure 30 : Activité de 70 terpènes naturels sur l'accumulation de [H]³ digoxine sur les cellules LLC-GA5-COL1550 (Yoshida et al. 2006).

1.1. Les monoterpènes

Plusieurs extraits d'agrumes utilisés en médecine traditionnelle japonaise ont été étudiés afin d'en déterminer leur activité sur ABCB1. C'est le cas par exemple des fruits de *Zanthoxylum* utilisés en tant que condiment comme poivre. Cet arbre est utilisé dans la médecine populaire comme anesthésique, pour soulager le mal de dents. Des travaux scientifiques ont également rapporté une activité antitumorale (Yoshida et al. 2005).

L'étude de différents agrumes en utilisant le test d'accumulation intracellulaire $[H]^3$ digoxine a permis de démontrer que leur extrait acétate d'éthyle (AE) possède une activité inhibitrice d'ABCB1 sur les cellules LLC-GA5-COL150. Une décoction à partir de 100 g de plante avec 600 ml d'eau chaude est réalisée. L'extrait AE est obtenu par trois extractions liquide-liquide de 200 ml de décocté avec 400 ml d'AE (Figure 31).

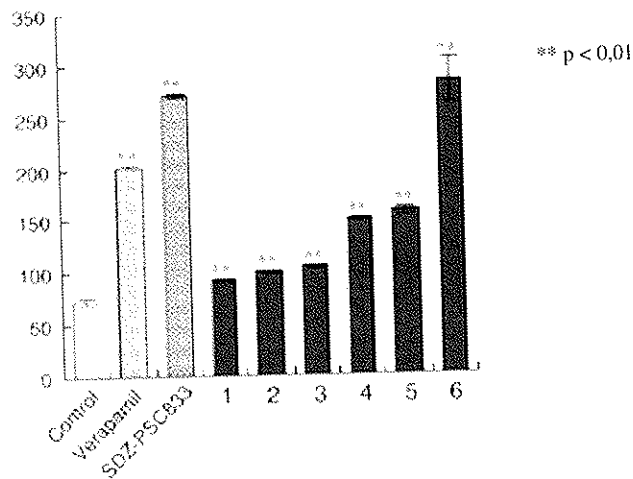


Figure 31 : Test à la $[H]^3$ dioxine de différents extraits AE d'agrumes (250 μ g/ml) : (1) fruit d'*Aurantium*, (2) fruit d'*Evoda* ; (3) fruit immature d'*Aurantium* ; péricarpe d'*Aurantium nobilis* ; (5) écorce de *Phellodendumi* ; (6) fruit de *Zanthoxylum*

L'extrait AE des fruits de *Zanthoxylum* possède une activité biologique supérieure au vérapamil (500 μ M) et quasi similaire au valsopodar (50 μ M). Des études approfondies démontrent une inhibition d'ABCB1 de façon dose-dépendante (Yoshida et al. 2005).

Devant les résultats prometteurs obtenus avec l'extrait AE des fruits de *Zanthoxylum*, une étude approfondie des composés de cet extrait a été entreprise. De nombreux monoterpènes ont pu être isolés et ont été évalués par le test d'accumulation à la $[H]^3$ digoxine. Le géraniol, le citronellal, le (R)-(+)-citronellal, DL-citronellol, (S)-(-)- β -citronellol

et le cinéol ont présenté une augmentation significative de l'accumulation de la $[H]^3$ digoxine. Tous ces composés ont une activité inhibitrice d'ABCB1 à 1 mM (Figure 32).

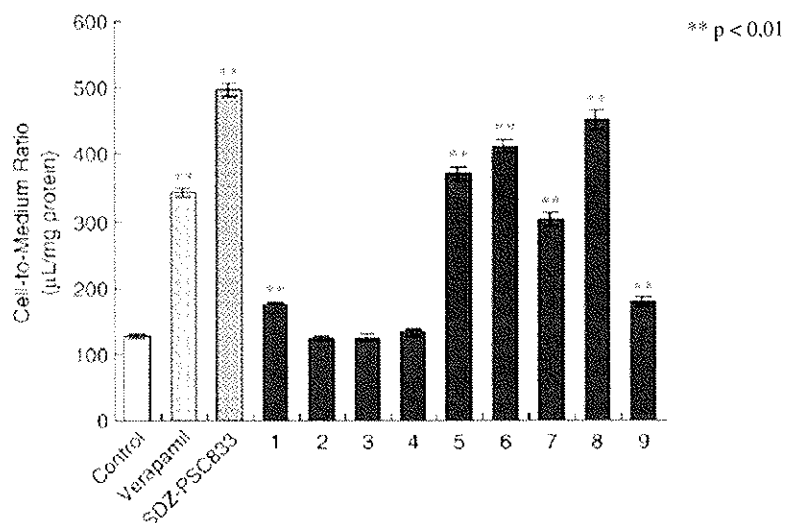


Figure 32 : Test à la $[H]^3$ digoxine de différents monoterpènes issus de *Zanthoxili* (1 mM) : (1) géraniol, (2) geranyl acetate, (3) (R)-(+)-linalool, (5) citronellal, (6) (R)-(+)-citronellal, (7) DL-citronellool, (8) (S)-(-)- β -citronellool, (9) cinéol.

Les deux monoterpènes les plus actifs à 1 mM sont le (R)-(+)-citronellal et le (S)-(-)- β -citronellool (Figure 33). Ils ont une activité biologique dose-dépendante et présentent respectivement une IC_{50} de 167 μ M et 504 μ M.

Cette étude permet de mettre en lumière des molécules non aromatiques et de faible masse moléculaire en tant que modulateurs d'ABCB1.

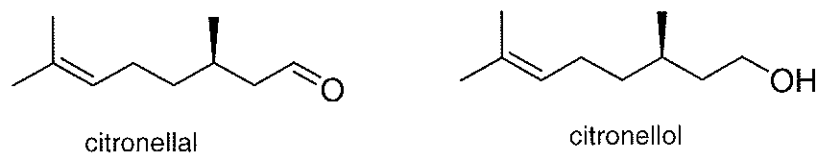


Figure 33 : Structures chimiques du citronellal et du citronellool, inhibiteurs d'ABCB1

1.2. Les diterpènes

- l'**acide abiétique** (Figure 34) est un diterpène présent de façon majoritaire dans la résine des pins ou autres conifères. A la concentration de 500 μM , ce terpène présente une activité inhibitrice d'ABCB1 sur les cellules LLC-GA5-COL150 similaire à l'activité inhibitrice de 50 μM de valsopodar (Figure 30). A concentration égale, il présente une IC_{50} de 172 μM , plus importante que celle du vérapamil ($\text{IC}_{50} = 237 \mu\text{M}$) (Yoshida et al. 2006).
- des diterpènes de type lathyrane : l'**euphorbia factor L7a** (squelette jokinol ; Figure 34) isolé à partir des graines d'*Euphorbia lathyris* (Euphorbiaceae) [Annexe 1] a montré une activité inhibitrice d'ABCB1 3,5 fois supérieure au vérapamil sur les cellules MCF-7 (carcinome humain du sein) à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Jiao et al. 2009).
- Certains taxanes diterpéniques isolés de la tige et des graines de l'arbre japonais *Taxus cuspidata* ont été rapportés comme pouvant augmenter l'accumulation intracellulaire de la vincristine dans les cellules cancéreuses MDR. La **taxuspine C** et les **taxezopidines G et H** (Figure 34) ont montré une activité inhibitrice d'ABCB1 comparable au vérapamil. Ces molécules ne sont pas cytotoxiques sur les cellules KB ($\text{IC}_{50} > 9,2 \mu\text{g/ml}$) ni sur les cellules L1210 ($\text{IC}_{50} > 5,8 \mu\text{g/ml}$) si elles sont comparées au Taxol (IC_{50} [KB] = 0,0088 $\mu\text{g/ml}$ et [L1210] = 0,33 $\mu\text{g/ml}$). La taxuspine C interagit directement avec ABCB1 car elle inhibe le site de liaison à l'azidopine de la protéine *in vitro* (Kobayashi et al. 1998).

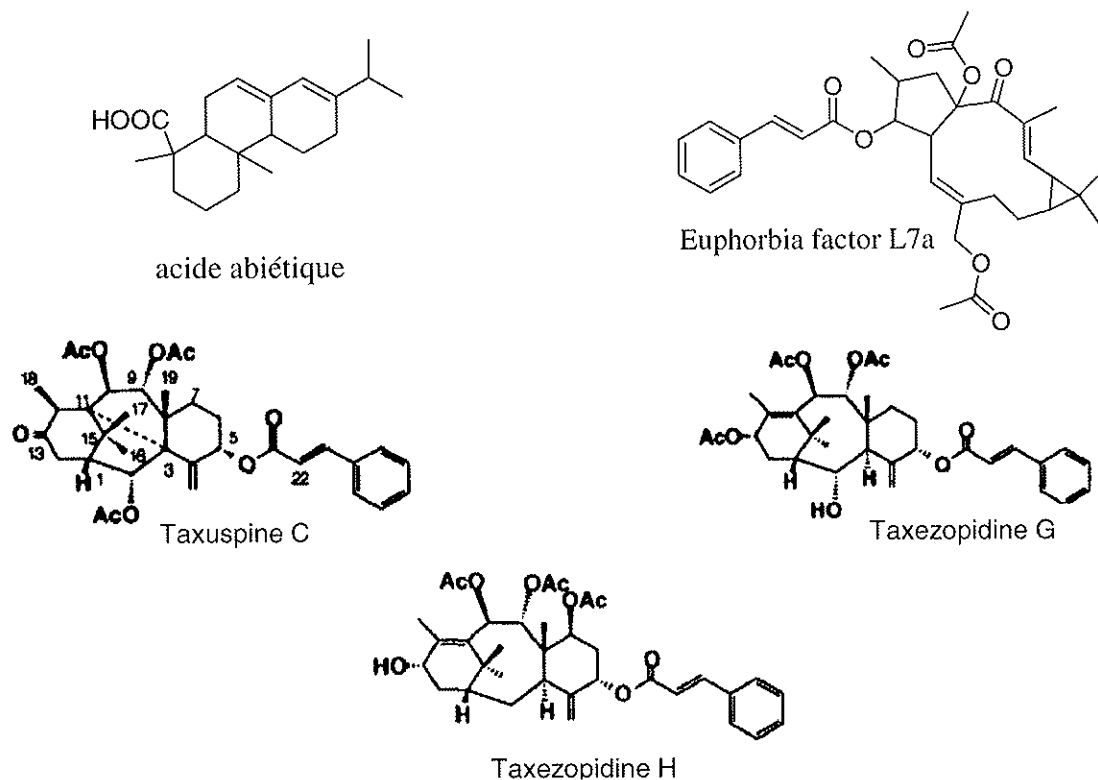


Figure 34 : Structure de diterpènes capables d'inhiber ABCB1

1.3. Les sesquiterpènes : l'ophioboline A issue de *Bipolaris sp.* (Dematiaceae)

L'**ophioboline A** (Figure 35) est une phytotoxine issue d'un champignon, *Bipolaris sp.* (Dematiaceae) [Annexe 1], qui est capable d'induire des taches brunes sur les feuilles du riz, du maïs et du sorgho. Le riz contaminé par le champignon a été un des facteurs de la famine du Bengale en 1943. Ce champignon possède 23 ophiobolines naturelles connues.

L'ophioboline A est une molécule qui possède plusieurs activités biologiques, notamment anticancéreuse et antimicrobienne. Elle est surtout étudiée pour son effet antagoniste de la calmoduline (Au et al. 2000).

Dans ses études de screening des terpénoïdes, Yoshida a pu démontrer que l'ophioboline A possède une activité inhibitrice d'ABCB1 sur les cellules LLC-GA5-COL150 (Figure 30). A 500 μM , c'est le terpénoïde qui a la plus grande activité inhibitrice parmi l'ensemble des molécules testées. Elle possède une IC_{50} (= 7,86 μM) 30 fois inférieure à celle du vérapamil (IC_{50} = 237 μM) (Yoshida et al. 2006).

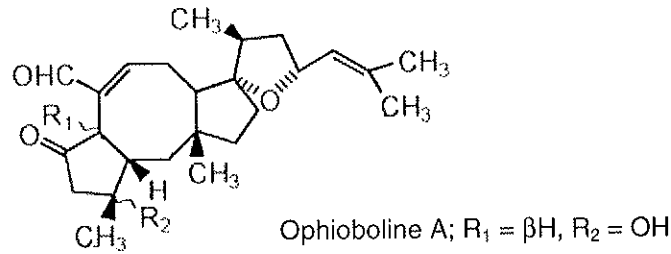
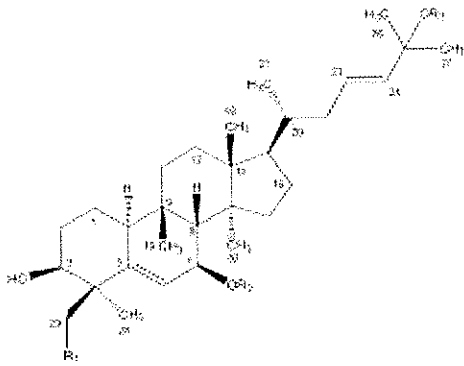


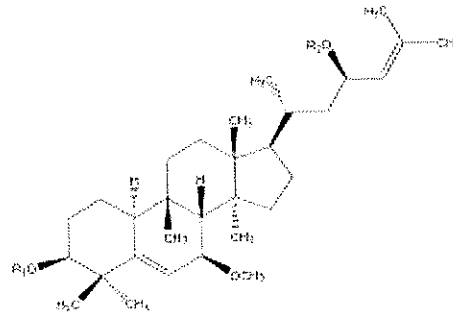
Figure 35 : Structure de sesquiterpènes ayant une activité inhibitrice d'ABCBI

1.4. Les triterpènes

- D'après les études de Yoshida, la **cucurbitacine I** semble avoir une activité inhibitrice d'ABCBI intéressante. En effet, d'après la figure 30, la cucurbitacine I, à la concentration de 500 μM, présente une activité similaire à celle induite par 50 μM de valsopodar (Yoshida et al. 2006).
- Une série de triterpènes de type cucurbitacine extraits des parties aériennes de *Momordica balsamina* (Cucurbitaceae) [Annexe 1], une plante grimpante tropicale ou subtropicale, originaire d'Afrique subsaharienne utilisée comme condiment, a été testée. L'activité modulatrice des triterpènes de type cucurbitacine (Figure 36) contenus dans cette plante a été évaluée sur les cellules L5178 (lymphome chez la souris) transfectées par le gène MDR1. La **balsaminagénine A** (à 20 μM) a présenté une activité modulatrice d'ABCBI 5 fois plus importante par comparaison au vérapamil (à 22 μM) tout comme la **karavelagenine C** (à 2 μM). La **balsaminagénine B** et le **balsaminoside A** possèdent quant à eux, une activité 10 et 12 fois supérieure au contrôle positif à 20 μM (Ramalhete et al. 2009).



Balsaminagénine A ; $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$
 Balsaminagénine B ; $R_1 = OH$; $R_2 = H$; $R_3 = CH_3$
 Balsaminoside A ; $R_1 = H$; $R_2 = \text{Allose}$; $R_3 = CH_3$



Karavelagénine C ; $R_1 = R_2 = H$

Figure 36 : Structures des triterpènes présentant une activité inhibitrice d'ABCBI

2. Les saponosides

2.1. Les ginsénosides issus de *Panax Ginseng* (Araliaceae)

Les racines de Ginseng, *Panax ginseng* (Araliaceae) [Annexe 1] ont été utilisées en médecine traditionnelle orientale (Chine, Corée, Japon) pendant des milliers d'années.

Originaire d'Asie du nord-est, la racine est réputée pour ses propriétés pharmaceutiques. Le nom générique « Panax » vient des mots grecs « Pan », qui signifie « tout », et « Akos » qui veut dire « remède », il désigne donc le remède universel (Bruneton 2009). *Panax ginseng* est une plante dite « adaptogène » qui protège l'individu contre les effets d'un ou plusieurs stress qu'il soit physique, psychique, métabolique, infectieux ou neuroendocrinien. Il prévient les diverses affections qui en découleraient et soigne les effets du stress qui déstabilise l'organisme. D'une manière générale, un adaptogène possède un effet stimulant des défenses de l'organisme permettant de lutter contre la fatigue physique et d'agir sur le système immunologique (Goetz 2004).

Les ginsénosides (panoxosides) (Figure 38) sont les composés de *Panax ginseng* considérés comme les plus pharmacologiquement actifs. Douze types de ginsénosides ont été isolés et identifiés. Le ginsénoside Rg3 possède une activité anticancéreuse sur certaines

lignées cellulaires. Il est métabolisé en ginsénoside Rh2 et en protopanaxadiol par la flore microbienne fécale (Zhou et al. 2004).

Action sur ABCB1

L'activité de nombreux composés de ginseng a été étudiée sur ABCB1 sur des lignées MDR. Plusieurs sont capables de moduler l'effet d'ABCB1 :

- le **20(S)-ginsénoside Rg3** (Figure 38) s'est montré être un inhibiteur potentiel sur les cellules KBV20C (fibrocarcinome humain MDR) en ayant une IC₅₀ de 82 µM (Zhou et al. 2004).
- Le **ginsénoside Rh2** (Figure 38) a montré, *in vitro*, sa capacité à augmenter de façon significative la cytotoxicité de la daunomycine et de la vinblastine sur les cellules résistantes P388/ADM (Zhou et al. 2004).
- Les **ginsénosides Rg1, Re, Rc** (Figure 38) et Rd ont montré une activité inhibitrice modérée sur un lymphome de souris MDR. Ils augmentent l'accumulation des médicaments entre 2 et 20 µg/ml (S. Kim et al. 2003).
- Le **ginsénoside Rg3** (Figure 38) s'est révélé augmenter l'accumulation intracellulaire de la rhodamine 123, de façon temps et dose-dépendante, sur les cellules KBV20C résistantes mais pas sur les cellules KB. Cette molécule devient plus efficace que le vérapamil à 200 µM (Figure 37). Il inhibe également l'efflux de la vinblastine et il est capable d'éliminer la résistance des cellules KBV20C à la vincristine et à la doxorubicine. Des études *in vivo* sur un modèle de souris leucémique P388 résistante à la doxorubicine a permis d'évaluer leur survie en présence ou absence de ginsénoside Rg3. La co-administration de 4 mg/kg de doxorubicine et de 10 mg/kg ou 40 mg/kg de ginsénoside Rg3 augmente de façon significative la survie des souris (p < 0,01). De plus, une diminution du poids des souris induite par la tumeur est observée. Ces résultats permettent de démontrer que le ginsénoside Rg3 augmente l'efficacité de la doxorubicine via l'inhibition d'ABCB1 (S. Kim et al. 2003). Des études de marquage par photoaffinité ont permis de mettre en évidence une

interaction directe de cette molécule avec la protéine ABCB1. De plus, des études par RT-PCR et immunoblot démontrent une inhibition de l'expression d'ABCB1 par le ginsenoside Rg3 (Zhou et al. 2004).

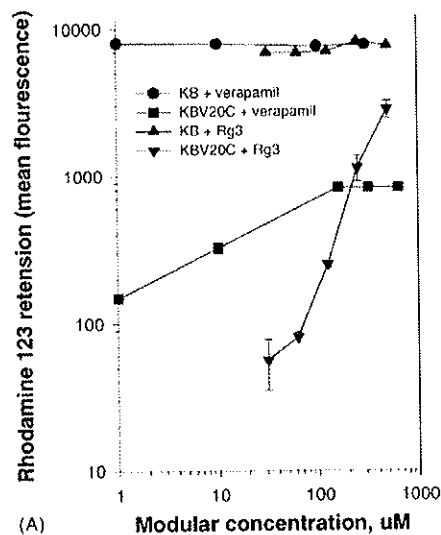
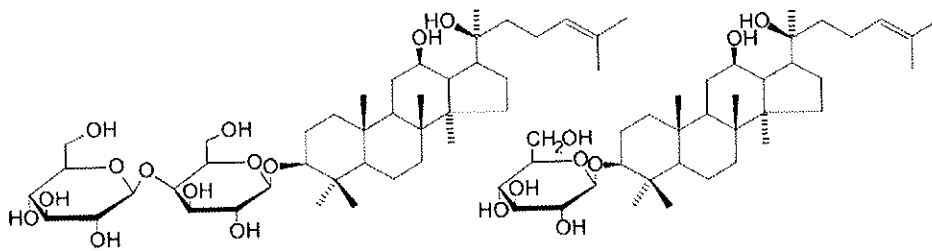


Figure 37 : Test d'accumulation de la rhodamine 123 sur les cellules KB en présence de vérapamil (●) et de ginsenoside Rg3 (▲) et sur les cellules résistantes KBV20C en présence de vérapamil (■) et de ginsenoside Rg3 (▼) (S. Kim et al. 2003).

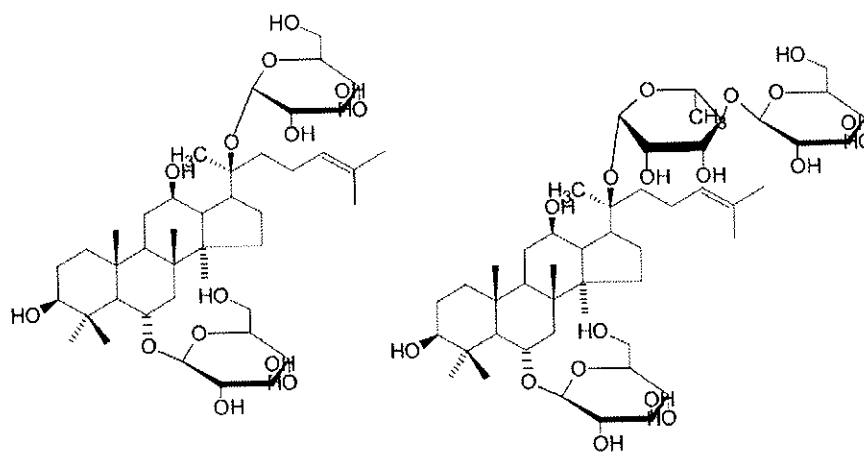
- Les ginsenosides de type protopanaxatriol permettent d'accumuler deux fois plus de daunorubicine dans des cellules leucémiques qu'avec le vérapamil mais 1,5 fois moins qu'avec la cyclosporine A. A une concentration supérieure à 200 $\mu\text{g/ml}$, ces molécules inhibent la liaison de l'azidopine dans les études de marquage par photoaffinité. Ces résultats suggèrent une interaction directe de ces molécules au niveau du site de liaison de l'azidopine. (Zhou et al. 2004).

Des études approfondies révèlent que l'inhibition d'ABCB1 est liée à un mécanisme de compétition au site de liaison de la pompe à efflux et non à une diminution de son expression ou du taux de protéine (Zhou et al. 2004).



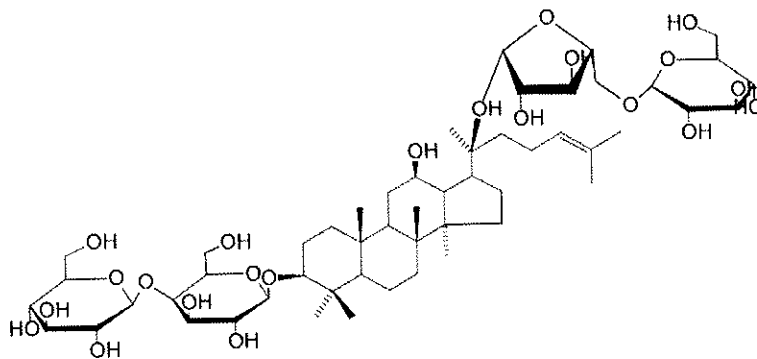
20(S)-Ginsenoside Rg3

Ginsenoside Rh2



Ginsenoside Rg1

Ginsenoside Re



Ginsenoside Rc

Figure 38 : Structure des ginsénosides capables de moduler ABCB1 (Zhou et al. 2004)

2.2. Les saponosides stéroïdiques issues de *Paris polyphylla* (Trilliaceae)

Le rhizome de *Paris polyphylla* (Trilliaceae) [Annexe 1] est une plante asiatique largement présente dans le Sud de la Chine. Il est utilisé traditionnellement pour ses propriétés antalgiques, antipyrétiques, antibactériennes, anti-inflammatoires et antitumorales (Nguyen et al. 2009).

Des études basées sur un fractionnement bioguidé du rhizome par l'activité inhibitrice d'ABCBI, ont permis d'extraire les composés actifs de *Paris polyphylla*. L'extrait méthanolique s'est révélé posséder une activité inhibitrice d'ABCBI sur les cellules leucémiques K562/R7 correspondant à 85% de l'activité modulatrice de la cyclosporine A (CsA). Le criblage bioguidé de cet extrait a permis de s'intéresser plus particulièrement à la fraction 5 qui présente l'activité la plus importante. Son fractionnement a conduit à l'isolement de quatre composés actifs: **3-O-Rha(1→2)[Ara(1→4)]Glc-pennogénine**, **gracilline**, et **polyphylline D** (Figure 39 et 40) (Nguyen et al. 2009).

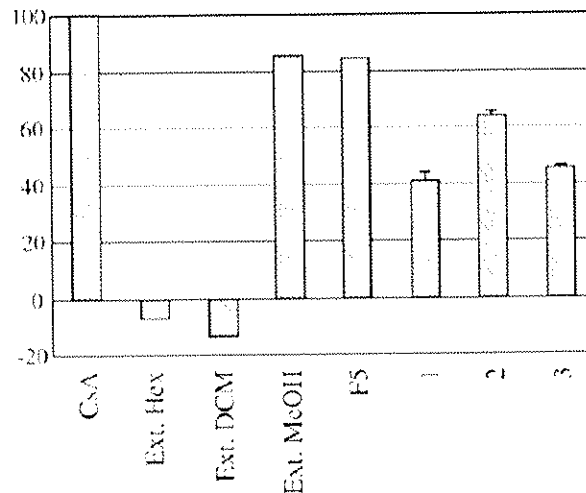
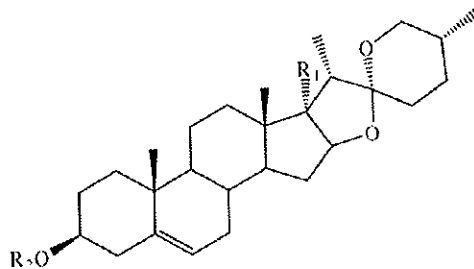


Figure 39 : Inhibition relative d'ABCBI des différents extraits de *Paris polyphylla* sur les cellules K562/R7 ; Les composés isolés ont été testés à 10 μ M ; 3-O-Rha(1→2)[Ara(1→4)]Glc-pennogénine (1), gracilline (2), et polyphylline D (3) (Nguyen et al. 2009)



- (1) 3-O-Rha(1→2)[Ara(1→4)]Glc-pennogénine ; R1 = OH ; R2 = 3-O-Rha(1→2)[Ara(1→4)]Glc
 (2) Gracilline ; R1 = H ; R2 = 3-O-Rha(1→2)[Glc(1→3)]Glc
 (3) Polyphylline D ; R1 = H ; R2 = 3-O-Rha(1→2)[Ara(1→4)]Glc

Figure 40 : Structure des saponosides stéroïdiques actives de *Paris polyphylla*

2.3. Les gypénosides issus de *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae)

Gynostemma pentaphyllum (Cucurbitaceae) [Annexe 1] est une plante grimpante chinoise également appelée « herbe de l'immortalité ». Cette plante rustique, qui résiste au froid (jusqu'à -15°C), est présente en Inde, en Chine, au Japon et en Corée. Elle est reconnue et utilisée en médecine traditionnelle orientale pour ses propriétés anti-inflammatoires, antitumorales, hypocholestérolémiantes, antiasthmatiques, préventives de la sénilité (F. Yin et al. 2004). L'extrait de cette plante présente l'avantage d'être peu toxique pour les animaux. En effet, la DL₅₀ par voie IP est de 1,85 g/kg chez le rat et une administration par VO de 8 g/kg pendant un mois n'a conduit à aucune toxicité, ni aucun effet indésirable (T. H. Huang et al. 2007).

Les feuilles de *Gynostemma pentaphyllum* contiennent de nombreuses saponosides de la famille chimique des dammaranes tels que le **gypénoside LXIX**, le **gylongiposide I** ou le **gypénoside XLVIII** (Figure 42) (F. Yin et al. 2004).

Action sur ABCB1 (T. H. Huang et al. 2007)

L'extrait total de gypénosides contenant environ 95% de saponines et issu de *Gynostemma pentaphyllum*, a été étudié sur la lignée cellulaire CEM/VLB₁₀₀. Celle-ci surexprime ABCB1 et présente donc une résistance à plusieurs agents: la vinblastine, la colchicine, le taxol.

Les résultats montrent que cet extrait est capable de moduler ABCB1 et de restaurer uniquement la sensibilité à la colchicine sur les cellules CEM/VBL₁₀₀ de façon dose-dépendante. En effet, l'IC₅₀ de la colchicine sur ces cellules passe de 453 nM à 30,9 nM en absence ou présence de 0,1 mg/ml d'extrait total de gypénosides.

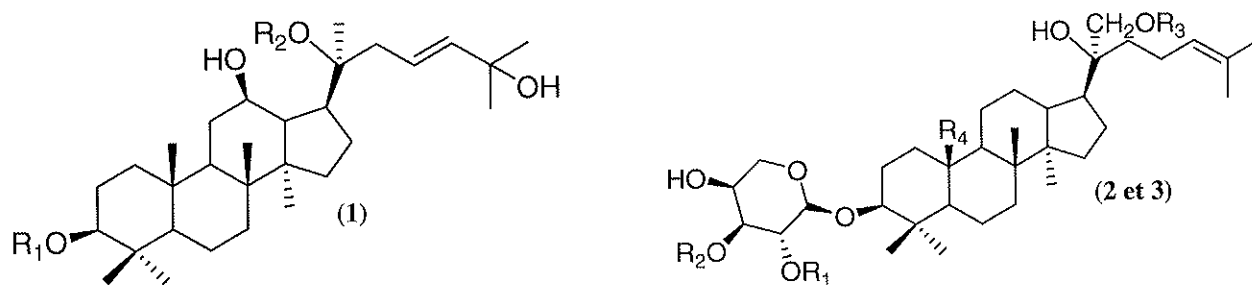
Des études de séparation permettent d'évaluer l'activité biologique des différentes fractions de l'extrait. Les gypénosides d'une des fractions (Fraction 100 dans laquelle les gypénosides sont plus concentrés que dans l'extrait) se montrent deux fois plus actifs que l'extrait (Figure 41).

Conc. (mg/ml)	Samples	
	Gypénoside total extract	Gypénoside fraction 100
	COL (nM) and (fold reversal)	COL (nM) and (fold reversal)
0	471,6 ± 30,7	518,7 ± 25,6
0,1	25,0 ± 1,2* (19)	12,5 ± 1,7* (41,5)
0,01	40,1 ± 3,1* (12)	26,4 ± 2,8* (20)
0,001	69,1 ± 12,3* (7)	59,7 ± 10,1* (9)
0,0001	234 ± 35,7 (2)	213,6 ± 27,6 (2)

*p < 0,05

Figure 41 : IC₅₀ de la colchicine (COL) en présence ou absence de l'extrait total de gypénosides ou des gypénosides de la fraction 100 sur les cellules CEM/VBL₁₀₀ (T. H. Huang et al. 2007)

Le mécanisme d'action, le fractionnement et l'identification des différents gypénosides restent à élucider.



- (1) gypénoside LXIX : R1 = Glc(2←1)Glc'; R2 = Glc''(6←1)Xyl
- (2) gylongiposide I : R1 = Rha; R2 = Xyl; R3 = H; R4 = CHO
- (3) gypénoside XLVIII : R1 = Rha; R2 = Glc; R3 = Glc'; R4 = CHO

Figure 42 : Structure des gypénosides présents dans *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae)

3. Les polyphénols

3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques largement présents dans l'alimentation humaine (agrumes, légumes, vin ou thé). Plus de 6500 flavonoïdes différents ont été identifiés et sont connus pour détenir de nombreuses propriétés pharmacologiques : antioxydants, antiprolifératifs, antiangiogéniques. Ils possèdent également des propriétés anticancéreuses. Cette classe chimique est particulièrement intéressante car les molécules ont une faible toxicité.

3.1.1. Les jus de Rutaceae

Le jus de pamplemousse, *Citrus x paradisi* (Rutaceae) [Annexe 1] est majoritairement composé de **naringine** (figure 43), un flavonoïde présent à une concentration supérieure à 1200 mg/ml. Ce fruit est connu pour être un puissant inhibiteur du cytochrome P450 3A4. Les médicaments métabolisés par le CYP3A4 voient leur pharmacocinétique modifiée s'ils sont co-administrés avec du jus de pamplemousse. Des études contradictoires concernant son activité inhibitrice d'ABCB1 ont été publiées. En effet, la naringine a été décrite comme une molécule capable d'inhiber ABCB1 sur les cellules intestinales Caco-2 tandis que le jus de pamplemousse serait un activateur de l'efflux des substrats d'ABCB1 sur les cellules MDCK-MDR1 (Zhou et al. 2004).

Des études complémentaires démontrent que les génines de flavonoïdes comme la chrysin, l'hésperétine ou la **naringénine** (figure 43) augmentent l'accumulation de la vincristine à une concentration comprise entre 10 et 50 μM tandis que les molécules hétérosidiques (hésperidine, naringine, rutoside) n'ont pas d'effet sur ABCB1 (Zhou et al. 2004).

D'autres molécules, comme le **kaempférol** et la **quercétine** (figure 43), ont montré une activité inhibitrice d'ABCB1 à forte concentration (50 μM) mais aussi une propriété activatrice de la protéine à faible concentration (10 μM) (Zhou et al. 2004).

Les jus de pamplemousse (*Citrus maxima*) et d'orange (*Citrus sinensis*) ont montré une activité inhibitrice d'ABCB1. Des flavones polyméthoxylés issues du jus d'orange comme la **tangéretine** ou la **nobilétine** ont une activité inhibitrice d'ABCB1 plus importante que les composés du pamplemousse. De plus, ces molécules sont capables de diminuer la fonction de pompe à efflux de la protéine sans affecter le CYP3A4 (Zhou et al. 2004).

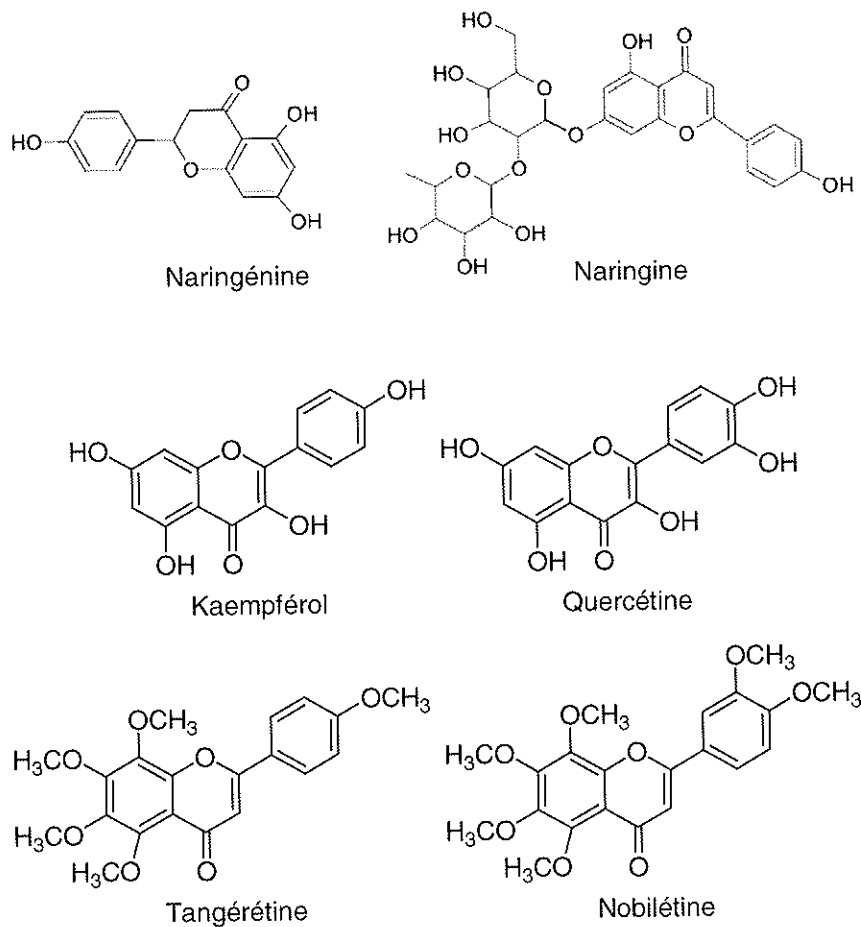


Figure 43 : Structure chimique de flavonoïdes

3.1.2. Le chardon-marie, *Silybum marianum* (Asteraceae)

Le chardon-marie, *Silybum marianum* (Asteraceae) [Annexe 1], est connu pour ses propriétés hépatoprotectrices dues à des flavolignanes comme que la **silymarine** (Figure 44). Les fruits sont utilisés par VO, en France, dans le traitement symptomatique des troubles digestifs d'origine hépatique (Bruneton 2009). Cette molécule augmente l'accumulation de la daunorubicine de façon dose-dépendante sur des lignées cellulaires exprimant ABCB1 grâce à deux phénomènes. Les analyse de marquage par photoaffinité par l'azidopine, suggèrent une interaction directe avec ABCB1. Il est intéressant de noter que lorsque la silybine est oxydée en déhydro-silybine puis C-alkylée avec soit un groupement prényl soit un groupement géranyl bromide, l'isoprenoïde déhydro-silybine obtenue voit son affinité pour ABCB1 très augmentée *in vitro*. Ces études démontrent que la silymarine et ses métabolites sont des inhibiteurs d'ABCB1 (Zhou et al. 2004).

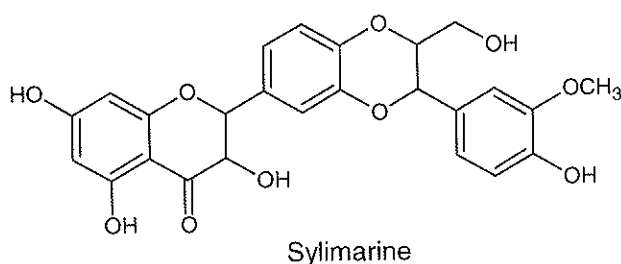


Figure 44 : Structure de la silymarine

3.2. Les tanins

Le thé, *Camellia sinensis* (Theaceae) [Annexe 1] est une plante largement utilisée comme boisson dans le monde. La feuille du théier est également employée en France par VO dans le traitement symptomatique des diarrhées légères, dans des asthénies, pour favoriser l'élimination rénale et comme adjuvant des régimes amaigrissants (Bruneton 2009). Les métabolites secondaires des feuilles renferment majoritairement des tanins catéchiques : (-) épigallocatechine gallate (EGCG, 5-12%), (-) épicatechine gallate (ECG, 1-5%); (-) épigallocatechine (EGC), (-) épicatechine (EC), (-) catéchine gallate (GC) et (+) catéchine (C) (Figure 46) (Zhou et al. 2004).

Des études de marquage par photoaffinité avec l' [¹²⁵I] iodoarylazidoprazosin (IAAP) ont montré que polyphénols de cette plante interagissent directement avec ABCB1. De plus, ces molécules, à 30 µg/ml, augmentent l'accumulation de la rhodamine 123 (Figure 45) et de la [³H] vinblastine à la fois sur la lignée résistante CH^RC5 (ovaire de hamster chinois) et sur les cellules Caco-2. Cette inhibition se fait de manière dose-dépendante et est réversible. Les composés majoritairement responsables de cette activité sont l'EGCG, l'ECG et la CG (Jodoin et al. 2002).

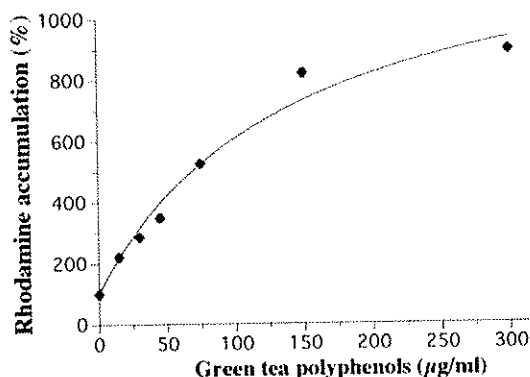


Figure 45 : L'accumulation de la rhodamine 123 sur les cellules CH^RC5 à des concentrations croissantes de polyphénols du thé (Jodoin et al. 2002)

La théanine, un acide aminé présent dans cette plante, augmente l'efficacité de la doxorubicine sur les cellules leucémiques P388 résistantes à ce cytotoxique (Zhou et al. 2004).

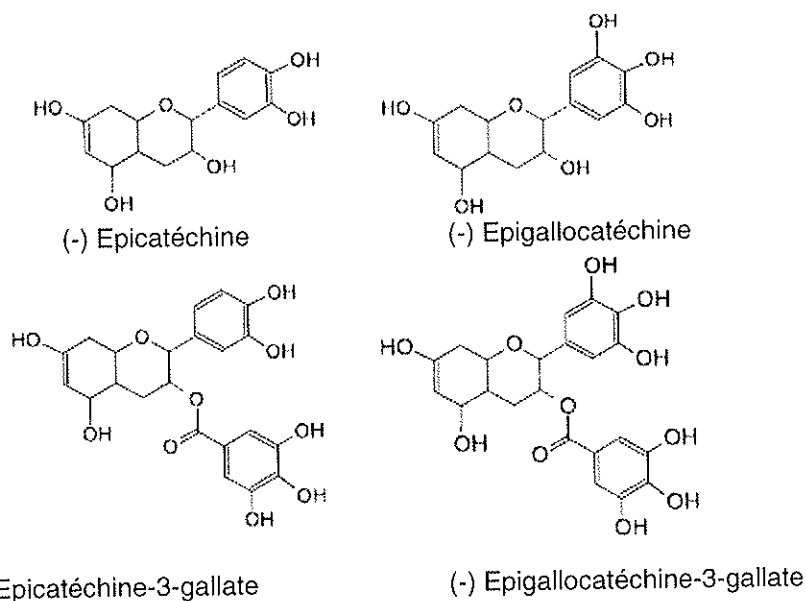


Figure 46 : Structure des polyphénols présents dans le thé (Zhou et al. 2004)

3.3. Les curcuminoïdes

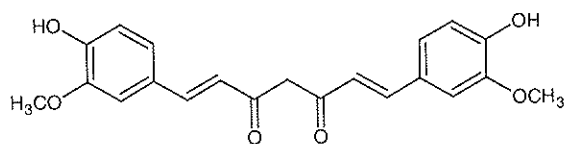
Ces composés sont répandus dans plusieurs genres de Zingiberaceae comme les Curcurmas (*Curcuma longa*, *C. aromatica* ou *Curcuma zedoaria*).

Le curcuma est une plante vivace herbacée à rhizome. Il est originaire du sud de l'Asie et est largement cultivé en Inde (80 % de la production mondiale). Le rhizome est d'abord bouilli dans l'eau puis séché au soleil et réduit en poudre comme épice (Bruneton 2009).

Le curcuma était aussi largement utilisé comme teinture jaune notamment pour colorer certains fromages et le beurre (Zhou et al. 2004).

Les rhizomes de *Curcuma longa* [Annexe 1] ont été largement utilisés pendant des siècles en médecine orientale (Inde et Chine) dans le traitement de nombreuses maladies souvent inflammatoires. La poudre de curcuma (turmeric en anglais), a longtemps été utilisée pour son arôme, dans l'alimentation orientale mais aussi pour ses propriétés digestives. La médecine traditionnelle indienne utilise cette poudre contre les troubles biliaires, l'anorexie, le coryza, la toux, les blessures diabétiques, les troubles hépatiques, les rhumatismes et la sinusite. Le curcuma est aussi largement utilisé pour le traitement des entorses et des gonflements. La médecine chinoise l'utilise dans les maladies associées aux douleurs abdominales (Araújo & Leon 2001).

Ses propriétés médicinales ont été attribuées principalement aux curcuminoïdes présents dans le rhizome et dont le composant principal est la **curcumine** (Figure 47). Des études réalisées par Wahlstrom et Blennow en 1978 ont démontré que ce composé administré à raison de 1 à 5 g/kg par VO chez le rat n'entraînait aucun effet indésirable, ce qui révèle une molécule peu toxique, donc très intéressante pharmacologiquement. Cependant, après son administration orale, la curcumine s'est révélée être mal absorbée par l'intestin car 75% de la dose ingérée est excrétée dans les selles (quelques traces apparaissent dans les urines) (Araújo & Leon 2001).



Curcumine

Figure 47 : Représentation de la curcumine

De nombreuses activités pharmacologiques sont attribuées à la curcumine. Elle est notamment décrite comme étant anti-inflammatoire, anticancéreuse, antioxydante, cicatrisante et antimicrobienne (Araújo & Leon 2001).

Action sur ABCB1

Des études d'accumulation à la rhodamine 123 sur la lignée cellulaire Caco-2 ont été réalisées sur plusieurs espèces de curcuma, principalement sur leur constituant majeur la curcumine. Ces études démontrent que les extraits méthanoliques des différentes espèces étudiées sont des activateurs d'ABCB1. Par contre, la curcumine aurait une activité inhibitrice d'ABCB1. Des études biochimiques menées sur le taux d'expression de la protéine et du gène MDR1 ont permis de démontrer que lorsque les cellules sont traitées à la curcumine, elles ont un taux de protéine et une expression du gène MDR1 significativement diminués en comparaison avec le contrôle négatif (CN). Les extraits méthanoliques des différentes espèces de curcuma ont, quant à eux, un effet opposé à la curcumine (Figure 48) (Hou et al. 2008).

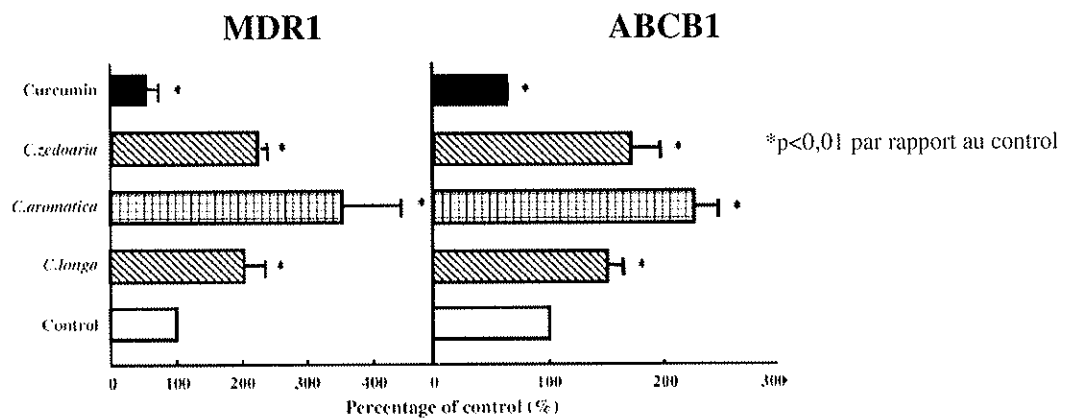


Figure 48 : Effet des extraits MeOH des Curcumas (0,1 mg/ml) et de la curcumine (30µM) sur le taux d'expression du gène MDR1 et de la protéine ABCB1 dans les cellules Caco-2 (Hou et al. 2008)

D'autres études montrent que la curcumine inhibe ABCB1 sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat de façon dose-dépendante mais également sur des cellules leucémiques MDR KB-V1. Les molécules responsables de l'activation d'ABCB1 ne sont pas identifiées à ce jour (Zhou et al. 2004). La curcumine intervient dans des études cliniques actuellement en cours, notamment de phase I dans la prévention du cancer colorectal ou de phase II dans le cancer pancréatique en tant que complément alimentaire (clinicaltrials.gov 2010).

4. Les alcaloïdes

4.1. Alcaloïdes pipéridiniques

4.1.1. La pipérine, issue de *Piper nigrum* ou *Piper longum* (Piperaceae)

Le poivrier commun, *Piper nigrum* (Piperaceae) [Annexe 1] est une liane ligneuse volubile connue depuis l'antiquité. Originaire de la côte de Malabar au sud-ouest de l'Inde, il est cultivé pour son fruit, largement utilisé comme épice à l'heure actuelle : le poivre (Bruneton 2009). Il est utilisé dans de nombreuses médecines traditionnelles comme remède dans le traitement des gonorrhées, des douleurs menstruelles, des troubles du sommeil, des infections respiratoires (Sunila & Kuttan 2004)...

La **pipérine** (Figure 51) est le principal constituant du poivre. C'est un amide de la pipéridine et de l'acide pipérique (Bruneton 2009). Elle possède de nombreuses activités biologiques : antipyrétique, anti-inflammatoire, dépresseur du SNC, immunomodulatrice (Sunila & Kuttan 2004), anti-diarrhéique, hépatoprotective, anticonvulsivante et antioxydante (Zhou et al. 2004).

Action sur ABCB1

Des études démontrent que la pipérine est un inhibiteur à la fois d'ABCB1 et du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), *in vitro* (Zhou et al. 2004). Elle inhibe l'efflux de la digoxine et de la cyclosporine A, deux substrats d'ABCB1, dans les cellules Caco-2 avec des valeurs d'IC₅₀ respectivement de 15,5 µM (Figure 49) et de 74,1 µM (Bhardwaj et al. 2002).

De plus, la pipérine inhibe le CYP3A4 humain. Ce dernier est capable de métaboliser le vérapamil en norvérapamil et en métabolite D-617. Des études faites sur des microsomes de foie humain, mettent en évidence une diminution de la formation des métabolites du vérapamil en présence de la pipérine (Figure 50).

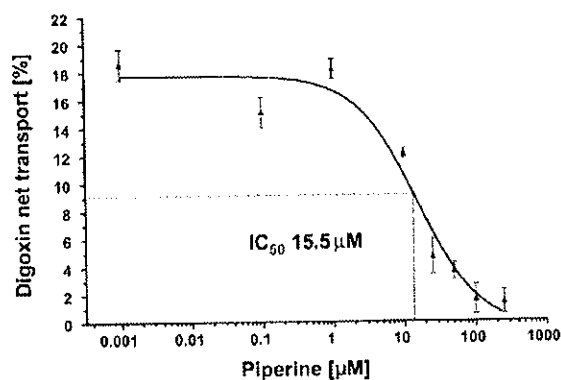


Figure 49 : Inhibition d'ABCB1 par la pipérine calculée via le transport de 5 µM de digoxine dans les cellules Caco-2 (Bhardwaj et al. 2002)

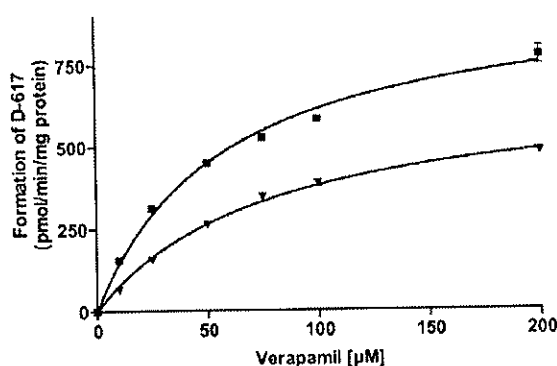


Figure 50 : Courbe représentant la formation du métabolite D-617 sans (■) ou avec (▼) l'addition de pipérine (Bhardwaj et al. 2002)

La pipérine contribue à l'élimination de l'effet de premier passage hépatique de beaucoup de médicaments car elle inhibe à la fois ABCB1 et CYP3A4 dans les entérocytes et les hépatocytes. Cette molécule peut donc changer les concentrations plasmatiques des molécules substrats d'ABCB1 et du CYP3A4 lorsqu'elles sont co-administrées par VO (Zhou et al. 2004). Le poivre étant de consommation courante, il est donc intéressant de noter que les molécules ingérées peuvent être à l'origine d'interactions médicamenteuses non négligeables.

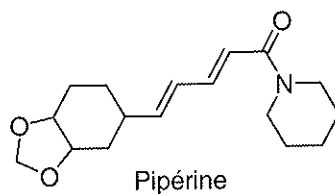


Figure 51 : Structure de la pipérine

Il faut aussi noter la pertinence de l'usage par la médecine ayurvédique d'un mélange de poivrier sous le nom de « Trikatu » (*P. nigrum*, *P. longum*,) et de gingembre (*Zingiber*

officinalis) comme potentialisateur de biodisponibilité dans de très nombreuses recettes de remèdes traditionnels (Johri & Zutshi 1992).

4.1.2. La lobéline, issue de *Lobelia inflata* (Lobeliaceae)

La lobélie enflée, *Lobelia inflata* (Lobeliaceae) [Annexe 1], appartenant à la famille des Lobeliaceae est une plante herbacée annuelle, originaire des Appalaches (Bruneton 2009). Cette plante possède plus de vingt alcaloïdes pipéridiniques comme la **lobéline** (Figure 52) qui est non seulement le composé majeur de cette espèce mais également le plus pharmacologiquement actif (Felpin & Lebreton 2004).

Lobelia inflata est également connue sous le nom de tabac indien, car les indiens d'Amérique (les tribus Penobscot) fumaient les feuilles séchées comme du tabac, afin d'en obtenir les mêmes effets sur le SNC. Cette plante à activité émétique était utilisée, au XVIIIème siècle, pour soulager diverses maladies comme la colique, le rhumatisme, la fièvre ou l'asthme (Felpin & Lebreton 2004). Cette plante était utilisée autrefois pour les reprises de ventilation en cas d'asphyxie, notamment dans le traitement des apnées du nouveau-né. En 2010, la lobéline n'est plus utilisée car elle possède une marge thérapeutique étroite et provoque d'importants effets indésirables. Elle était utilisée dans certains pays dans le sevrage tabagique. Son rôle éventuel dans le traitement de la dépendance à la métamphétamine fait l'objet d'études (Bruneton 2009).

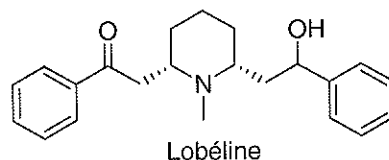


Figure 52 : Structure chimique de la lobéline

Action sur ABCB1

L'évaluation de l'activité inhibitrice d'ABCB1 de la lobéline a été réalisée sur les cellules Caco-2 surexprimant ABCB1 sur leur membrane apicale (Y. Ma & Wink 2008).

D'après la Figure 53, la lobéline inhibe de façon dose-dépendante ABCB1. Le pourcentage d'inhibition de la pompe à efflux est significativement différent du contrôle négatif à partir de 10 μM (Y. Ma & Wink 2008).

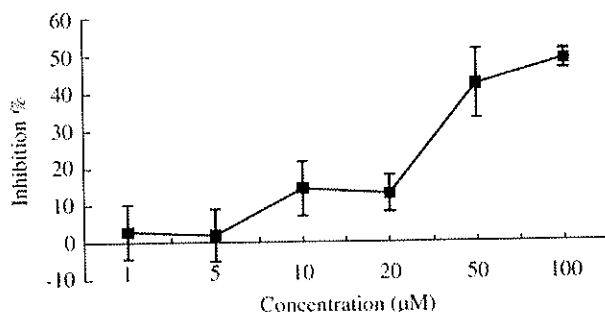


Figure 53 : Pourcentage d'inhibition d'ABCB1 en fonction de la concentration de lobéline (Y. Ma & Wink 2008)

Afin de corroborer ces résultats, les scientifiques ont souhaité utiliser une lignée cellulaire résistante à la doxorubicine : les cellules CEM ADR5000 qui surexpriment ABCB1. La méthode consiste à pré-traiter les cellules résistantes avec la rhodamine 123, puis à les traiter par 20 μM de lobéline. Les résultats montrent que les cellules du contrôle négatif ne retiennent pas la rhodamine 123 puisque ABCB1 joue son rôle de pompe à efflux et expulse le substrat fluorescent en dehors des cellules. Les cellules traitées par la lobéline, quant à elles, accumulent intracellulairement la rhodamine 123 confirmant le caractère inhibiteur d'ABCB1 de cet alcaloïde. L'efficacité d'inhibition d'ABCB1 de 20 μM de lobéline représente 70% de celle de 20 μM de vérapamil. Ainsi, la lobéline inhibe ABCB1 mais dans des proportions moindres que le vérapamil (Y. Ma & Wink 2008).

Afin de déterminer les IC_{50} de la lobéline sur les deux types de cellules utilisées dans cette étude, ces dernières ont été exposées à la doxorubicine en présence ou absence de 10 μM de lobéline (concentration non toxique). L' IC_{50} de la lobéline est de 168,3 μM sur les cellules Caco-2 et de 219,3 μM sur les cellules CEM ADR5000. En présence de lobéline, l' IC_{50} de la doxorubicine chute respectivement d'un facteur de 3,2 et de 2,6 sur les cellules Caco-2 et CEM ADR5000. Les cellules deviennent à nouveau sensibles à l'anticancéreux via une inhibition probablement compétitive d'ABCB1 (Y. Ma & Wink 2008).

L'activité inhibitrice d'ABCB1 de la lobéline est comparée à d'autres alcaloïdes inhibiteurs d'ABCB1 : elle est similaire à la cinchonine et plus forte que la quinine sur les cellules Caco-2. Elle est moins active que ces deux alcaloïdes sur les cellules CEM ADR5000 (Figure 54) (Y. Ma & Wink 2008).

	IC ₅₀ Caco-2 (µg)	IC ₅₀ CEM ADR5000 (µg)
Doxorubicine	1,11 ± 0,21	51,57 ± 5,36
Doxorubicine + 10 µM de lobéline	0,35 ± 0,03	19,7 ± 3,91
Doxorubicine + 10 µM de cinchonine	0,36 ± 0,21	4,52 ± 0,44
Doxorubicine + 10 µM de quinine	0,53 ± 0,12	8,64 ± 1,29

Figure 54 : Comparaison des IC₅₀ de la doxorubicine en présence ou non d'inhibiteurs d'ABCBI (Y. Ma & Wink 2008)

Des études d'accumulation de mitoxantrone, dont le principe est similaire au test d'accumulation de la rhodamine 123, ont permis d'évaluer l'activité inhibitrice de la lobéline sur ABCG2. D'après la Figure 55, les résultats ne montrent pas de différence significative entre le contrôle négatif et les cellules traitées par la lobéline. La lobéline n'est donc pas un inhibiteur d'ABCG2.

	Intensité de la fluorescence de la mitoxantrone
contrôle négatif (cellules non traitées)	0,005556 ± 0,002372
cellules traitées par 20 µM de lobéline	0,005644 ± 0,002077
cellules traitées par 20 µM de fumitremorgin C	0,02548 ± 0,003791

Figure 55 : Intensité de la fluorescence de la mitoxandrone dans les cellules (Y. Ma & Wink 2008)

La lobéline est donc un inhibiteur spécifique d'ABCBI par un mécanisme de compétition mais dont les études *in vivo* n'ont pas encore été menées.

4.2. Alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiniques

La **tétrandrine** (Figure 56), isolée d'une plante chinoise : *Stephania tetrandrae* (Menispermaceae) [Annexe 1], est un alcaloïde utilisé traditionnellement en tant qu'antifibrotique dans la médecine chinoise depuis les années 60 pour le traitement des silicoses, une maladie irréversible qui continue à progresser même après la fin de l'exposition à la silice. C'est une des maladies professionnelles les plus anciennes (Fu et al. 2002). La tétrandrine est aussi un inhibiteur calcique (Sun et al. 2009)

Action sur ABCB1

Cette plante s'est avérée être un bon inhibiteur d'ABCB1 *in vitro* et *in vivo*. Cette molécule, administrée à 2,5 μM , contribue à augmenter l'accumulation de la daunorubicine dans les cellules MOLT-4 (cellules lymphoblastiques de leucémie humaine). En comparaison avec les inhibiteurs de référence : la cyclosporine A et le vérapamil, la tétrandrine possède une plus forte capacité à inverser la résistance des cellules cancéreuses à la daunorubicine, la vinblastine et la doxorubicine (Sun et al. 2009).

D'autres études *in vitro* sur des cellules humaines d'adénocarcinome du sein possédant le phénotype MDR (MCF-7/adr) ou non (MCF-7) révèlent que cette molécule n'est pas substrat d'ABCB1 et qu'elle augmente la sensibilité des cellules cancéreuses à la doxorubicine à des concentrations non toxiques. *In vivo*, sur des souris, ni la tétrandrine seule, ni la doxorubicine utilisée seule ne possèdent une activité anticancéreuse significative par rapport au lot témoin. Par contre, la combinaison de la tétrandrine et de l'anticancéreux a montré une action significative. Le pourcentage d'inhibition de la croissance tumorale était de 52,8 à 57,5% suggérant une activité modulatrice de MDR *in vitro*. De plus, les expériences sur l'animal ont montré que l'association de la doxorubicine et de la tétrandrine n'induit pas la mort des souris malades, ni la diminution de leur poids corporel, suggérant ainsi que la tétrandrine n'augmente pas la toxicité de l'anticancéreux au cours de la co-administration. Dans son utilisation comme antifibrotique, les doses de tétrandrine administrées en clinique étaient de 180 mg trois fois par jour par voie intramusculaire (i.m.) chez l'adulte sans aucune toxicité. (Fu et al. 2002).

Récemment, un dérivé bromé de la tétrandrine, le 5-bromotétrandrine (Figure 56) a été évalué *in vitro* et *in vivo*. Cette molécule est capable d'annuler la résistance à la doxorubicine des cellules MCF7/DOX mais aussi la résistance des cellules KBv200 à la vincristine, la doxorubicine et le paclitaxel. La 5-bromotétrandrine augmente l'accumulation intracellulaire des anticancéreux dans les cellules présentant un phénotype MDR via l'inhibition d'ABCB1 (Sun et al. 2009).

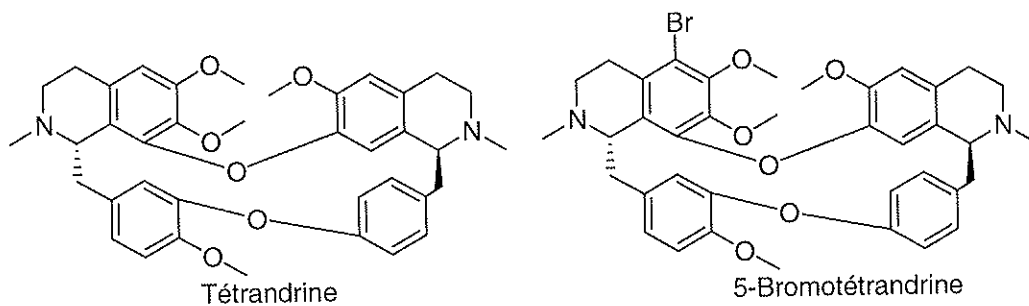


Figure 56: Structure de la tétrandrine et de la 5-bromotétrandrine

4.3. Alcaloïdes tropaniques

Les Pervilleines sont des alcaloïdes tropaniques isolés de l'extrait chloroforme des racines d'*Erythroxylum pervillei* (Erythroxylaceae).

La pervilleine A (PA) (Figure 58) a été étudiée sur les cellules résistantes à la vinblastine (KB-V1) et leur lignée parentale non résistante (KB-3). Son activité inhibitrice d'ABCB1 s'est montrée équivalente ou plus importante que le vérapamil (VP) utilisé comme contrôle positif. Cette molécule a permis de restaurer la sensibilité des cellules MDR KB-V1 à la vinblastine. Des études biochimiques sur le taux d'expression du gène MDR1 et de la protéine ont été entreprises sur les cellules KB-V1 et CEM/VLB₁₀₀. Les résultats obtenus démontrent que la pervilleine A n'affecte pas les taux d'expression du gène MDR1 ni de la protéine. Néanmoins, cet alcaloïde diminue la fonctionnalité d'ABCB1 car les cellules KB-V1 traitées par des concentrations croissantes (0 à 40 μM) de pervilléine A ou de vérapamil voient l'accumulation de la vinblastine augmenter de façon dose-dépendante (Figure 57). La pervilleine A est capable de restaurer, *in vitro*, la sensibilité des cellules KB-V1 à la vinblastine en modulant ABCB1 par mécanisme de compétition (Mi et al. 2001).

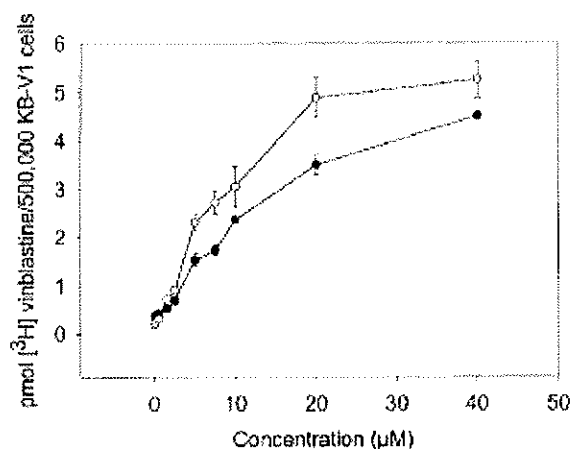


Figure 57 : Augmentation de l'accumulation de la [³H]vinblastine (16 nM) par la pervilleine A (○) et le vérapamil (●) sur les cellules KB-V1 (Mi et al. 2001)

Les pervilleines B et C (Figure 58) ont montré une activité similaire à la pervilleine A. Des études, réalisées chez la souris NCr *nu/nu*, ont permis d'évaluer l'efficacité de ces deux alcaloïdes *in vivo*. Des cellules KB-3 et KB-V1 ont été introduites dans des fibres creuses. Six fibres ont été implantées chez la souris au niveau intrapéritonéal (IP). Logiquement, les résultats ont montrés que la vinblastine à la concentration de 250 µg/ml était efficace sur la tumeur de cellules KB-3 mais pas sur la tumeur de cellules KB-V1. Le vérapamil et les pervilleines B et C n'induisent pas non plus une réduction de la tumeur provenant des deux lignées cellulaires. Néanmoins, lorsque ces molécules sont co-administrées, il y a une réduction significative de la tumeur. Les pervilleines B et C ont même montré une meilleure efficacité que le contrôle positif (Mi et al. 2002).

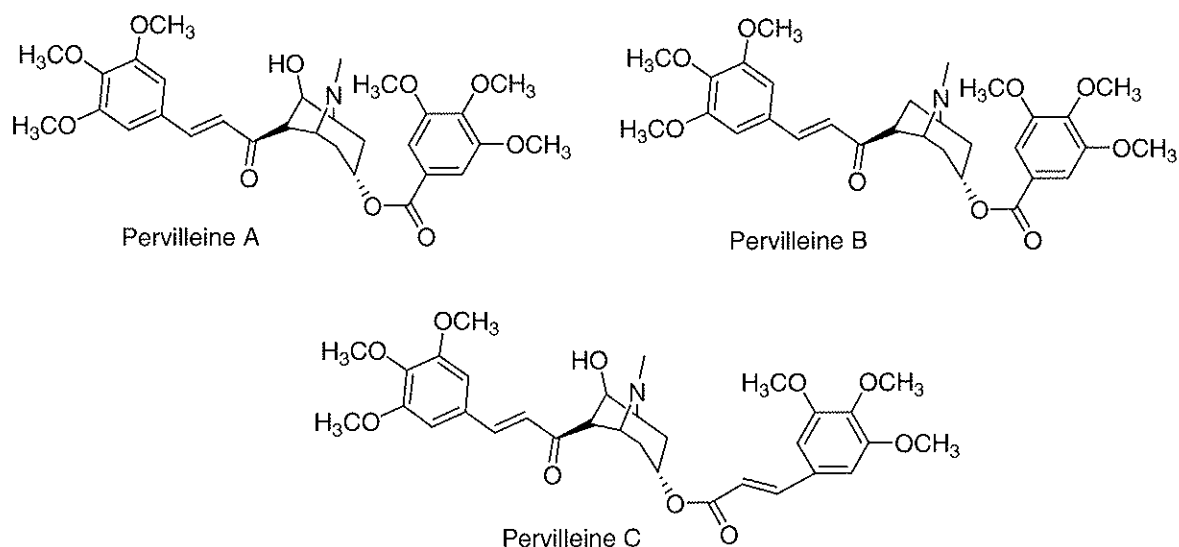


Figure 58 : Structure de la Pervilleine A, B et C

5. Conclusion

Les études menées par la communauté scientifique, tout au long de ces 20 dernières années, montrent que de nombreuses molécules naturelles ayant des structures et des masses moléculaires totalement différentes sont capables d'inhiber ABCB1.

Néanmoins, si on cherche à comparer ces résultats entre eux, on note que la plupart des études ont été réalisées sur des lignées cellulaires différentes. Ces études peuvent être réalisées non seulement sur des lignées animales qui surexpriment le gène animal (*mdr1*) ou le gène humain (MDR1) par transfection mais aussi sur des lignées humaines. Ces cellules utilisées pour les tests biologiques peuvent avoir des origines très différentes (cellules intestinales, hépatiques, hématologiques...).

De plus, les tests utilisés pour étudier ABCB1 varient d'une étude à l'autre (rhodamine, calcéine, rhodamine).

Par ailleurs, de nombreuses études ne détaillent pas le mécanisme d'inhibition d'ABCB1. Les tests de marquage par photoaffinité et les études biochimiques d'expression de la protéine ou du gène ne sont pas souvent menés.

Enfin la plupart des études menées *in vitro* utilisent le vérapamil comme inhibiteur de référence. Or, il est démontré depuis plusieurs années qu'il existe des inhibiteurs plus actifs que cette molécule (le valsopodar par exemple).

Ces difficultés rendent très compliqué la comparaison des molécules entre elles concernant leur activité inhibitrice d'ABCB1.

QUATRIEME PARTIE

TRAVAUX EXPERIMENTAUX PERSONNELS :
GANODERMA, UNE SOURCE POTENTIELLE DE
MODULATEURS D'ABCB1

Les travaux expérimentaux ont été réalisés dans le cadre du M2 Recherche et développement en synthèse, produits naturels et stratégies analytiques (Parcours : **Produits naturels : Isolement et analyse**). Pendant 6 mois, au sein du laboratoire de Pharmacognosie-UMR CNRS 8076 BioCIS à la faculté de pharmacie de l'université de Paris Sud 11, j'ai extrait, isolé, identifié et testé des produits issus d'un champignon : *Ganoderma capense* (Figure 59).

1. Recherches bibliographiques : présentation de la drogue

1.1. Classification mycologique des Ganodermas et leurs utilisations

Les champignons du genre *Ganoderma* sont utilisés en médecine traditionnelle chinoise depuis des millénaires. Ce champignon est connu sous le nom de Lingzhi en Chine, Reishi ou Munnertake au Japon et Youngzhi en Corée. Des traces de son utilisation ont été retrouvées en 100 av JC (Russell 2006). Il est cité, au travers de deux espèces *G. sinense* et *G. lucidum*, dans la Pharmacopée chinoise depuis 2005 (Zhou et al. 2007).

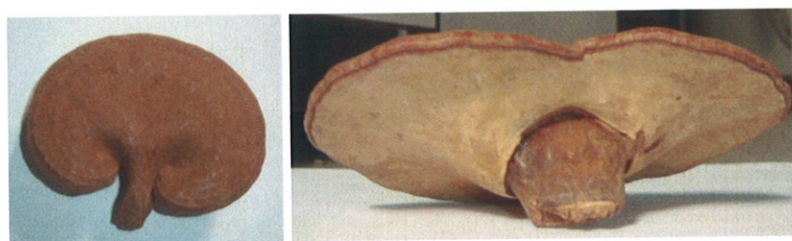


Figure 59 : Représentations de *Ganoderma capense* (Ganodermataceae)⁴

Des extraits du champignon sont largement utilisés en traitement préventif et curatif de nombreuses maladies comme les migraines, l'arthrite, l'asthme, l'hypercholestérolémie, les maladies cardiovasculaires, l'hépatite, le diabète, les neurasthénies, l'anorexie, le lupus érythémateux, les dysménorrhées ou le cancer. Ce champignon est intensivement cultivé,

⁴ Photographie prise par Sandrine AUGET

surtout en Chine, car il entre dans la composition de compléments alimentaires vendus comme stimulants des défenses naturelles et anti-oxydants (Russell 2006).

Dans la Chine antique, ce champignon symbolisait l'immortalité, le succès, le bien être, le pouvoir divin, la bonne santé ou encore la longévité (Zhou et al. 2007).

Ganoderma est un champignon cosmopolite dont la classification est assez confuse et est toujours discutée à l'heure actuelle. Néanmoins, c'est un champignon évolué faisant partie des basidiomycètes (Figure 60) et vivant généralement en parasite des troncs d'arbres. Il est responsable de la pourriture blanche car il est capable de dégrader les lignines en monomères phénoliques puis en CO₂ et en eau pour obtenir de l'énergie (Russell 2006).

- Subdivision : **Homobasidiomycètes**
 - Sous classe : *Aphyllorphomycetideae*
 - Ordre : **Ganodermatale** ou Polyporale ou Aphylloporale
 - Famille : *Ganodermataceae*
 - Genre : Ganoderma

Figure 60 : Classification mycologique des Ganodermas

1.2. Composition chimique et propriétés thérapeutiques

Les différents Ganodermas sont bien connus chimiquement et ils produisent une large gamme de métabolites secondaires : polysaccharides, triterpènes, ergostérols, protéines, acides gras insaturés, vitamines et minéraux (Russell 2006)...

1.2.1. Les triterpènes

Ce sont les métabolites secondaires les plus étudiés du champignon et ils ont montrés depuis longtemps une activité anticancéreuse. Plus de 130 triterpènes oxygénés (Figure 61)

ont été isolés, généralement de type lanostane. Leur masse moléculaire est généralement comprise entre 400 et 600 kDa et leur structure est souvent très oxygénée (Zhou et al. 2007).

Quarante acides ganodériques, 14 ganodériols, 5 acides ganolucidiques et 15 acides lucidéniques ont été extraits de *G. lucidum* permettant de différencier les espèces de Ganodermas et on peut prévoir la découverte d'autres molécules de ce type (Russell 2006). D'ailleurs, des travaux récents sur *G. sinense* ont conduit à l'isolement de nouvelles molécules appelées ganosinensins A, B et C (Sato et al. 2009).

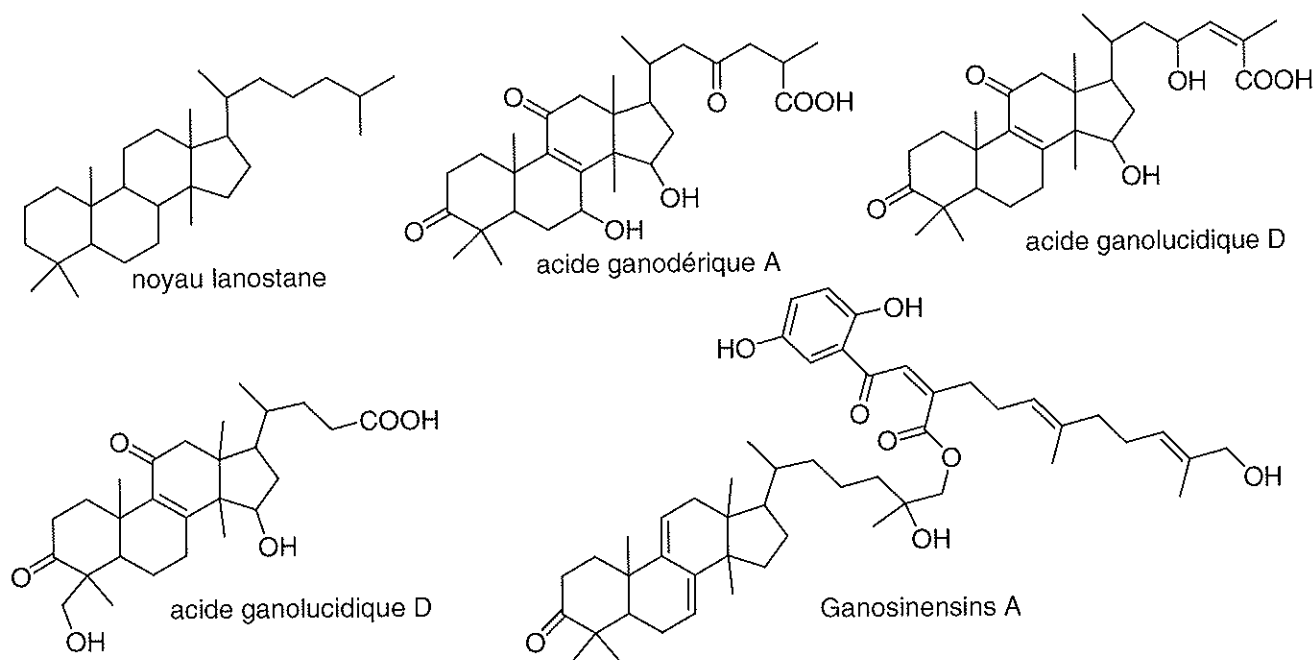


Figure 61 : Structures de triterpènes retrouvés dans les Ganodermas

Des études menées plus particulièrement sur les triterpènes des espèces *G. lucidum* et *G. tsugae* ont mis en évidence une activité anti-inflammatoire et protectrice des rayons UV de ces composés (Ko et al. 2008).

Dans la littérature, plusieurs études mentionnent une activité anticancéreuse, *in vitro*, des triterpènes de type acide ganodérique. C'est le cas par exemple de l'acide ganodérique Me (Figure 62): des travaux, *in vivo*, ont démontré qu'il inhibe la croissance tumorale et les métastases du cancer du poumon après une injection IP de 28 mg/kg. De plus, ces études ont démontré une augmentation de l'activité des cellules NK chez la souris suggérant une

propriété immunomodulatrice (G. Wang et al. 2007). D'autres équipes ont démontré que ce triterpène est cytotoxique sur plusieurs types de cancer (cancer métastatique de l'ovaire, hépatome humain, carcinome colorectal, cancer du pancréas, cancer du poumon) révélant son intérêt dans le traitement et la prévention des cancers (N. Chen & Zhong 2009).

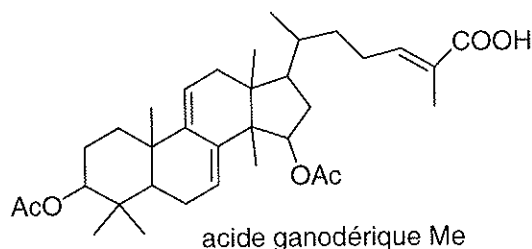


Figure 62 : Structure de l'acide ganodérique Me

1.2.2. Les polysaccharides

Les polysaccharides représentent une classe de molécules ayant une large diversité de structure et de propriétés. Ils sont extraits par l'eau et sont précipités par les alcools. Plus de 200 polysaccharides ont été isolés de *G. lucidum* en incluant ceux liés à des protéines ou peptidoglycanes. Les composés les plus actifs de cette classe sont des glycanes, notamment les β -1-3-D glycanes et les β -1-6-D glycanes (Zhou et al. 2007).

Les polysaccharides des ganodermas possèdent une activité anti-tumorale, les glycanes ramifiés d'environ 1 kDa sont capables d'inhiber la croissance de 95% des cellules provenant d'un sarcome 180 (tumeur solide). Cette activité est médiée par une stimulation du système immunitaire qui favorise la production de cytokines et en favorisant la production d'IL-2 (Russell 2006).

De plus, ils ont montré une activité contre l'herpès simplex virus HSV-1 et HSV-2. Une activité sur l'ADN polymérase a été observée chez la souris ainsi qu'un effet hypoglycémiant. Une activité anti-oxydante des peptidoglycanes a aussi été identifiée (Russell 2006).

1.2.3. Protéines

Une lectine issue de *G.capense* d'un poids moléculaire de 18 kDa, ayant la particularité d'être thermostable à plus de 100°C, possède une activité mitogénique sur les splénocytes de souris. Elle possède aussi une activité antiproliférative, *in vitro*, sur les cellules L1210 (IC₅₀ = 8 µM), HepG2 (IC₅₀ = 16,5 µM) et M1 (IC₅₀ = 12,5 µM) (Ngai & Ng 2004).

Une autre protéine nommée Ling Zhi-8 (LZ-8) de 12 kDa composée de 110 acides aminés possède elle aussi des propriétés immunomodulatrices, antioxydantes, mitogéniques sur les splénocytes de souris (Russell 2006).

2. Matériels et méthodes

Un criblage biologique des extraits a été effectué. L'évaluation de la cytotoxicité de *Ganoderma capense* sur les cellules KB, n'ayant pas été décrite dans la littérature, a été initiée. De plus, des tests antifongiques sur *Candida albicans* et antiparasitaires sur *Leishmania* et *Trypanosoma* ont été réalisés. Enfin, l'évaluation de l'activité inhibitrice d'ABCB1 de ces extraits a permis d'orienter l'extraction des composés d'intérêts tout au long du stage.

2.1. Extraction

2.1.1 *Ganoderma capense* comme matière première

L'échantillon étudié (Figure 59) est un champignon de culture récolté le 22 octobre 2007 et provenant de la société BioChampi (Z.A. de Talvois, Nouatre, Touraine, biochampi@wanadoo.fr) qui possède une production standardisée et reproductible. Il est certifié par l'organisme Qualité de France SA, comme étant de qualité « agriculture biologique ». Après réception de la commande, un échantillon est envoyé à M. Michel WELTI (Faculté de Pharmacie de Lille, Laboratoire de Botanique du Pr. COURTECUISSÉ)

pour identification. Le champignon s'est avéré être *Ganoderma capense* et non *Ganoderma lucidum* comme présenté par le producteur. La taxonomie du genre *Ganoderma* est très complexe et ces deux espèces sont macroscopiquement très proches.

2.1.2 Etape 1

Une extraction séquentielle de 400 g de poudre de *Ganoderma capense* avec un Soxhlet et des solvants de polarité croissante a été réalisée : éther de pétrole (EP), dichlorométhane (DCM), acétonitrile (ACN), méthanol (MeOH), eau. Les polysaccharides de l'extrait aqueux sont précipités par de l'éthanol à 95% (EtOH). Deux extraits traditionnels de poudre de *G. capense* ont été réalisés par macération : dans l'eau pendant 4h à 90°C et dans l'EtOH 30% pendant deux semaines à température ambiante.

2.2. Fractionnement et isolement

2.2.1. Etape 2 : Fractionnement de l'extrait DCM

Une colonne chromatographique flash c'est-à-dire sous pression (1,5 bar) a été réalisée sur 2,5 g de l'extrait DCM permettant de collecter 13 fractions (F1 à F13) et des analyses CLHP ont conduit à l'isolement par CLHP préparative d'un produit pur ($m = 77$ mg) mais non identifié.

2.2.2. Etape 3 : Isolement des acides ganodériques par CLHP/UV

Les solvants utilisés sont l'acétonitrile (ACN) (HiPerSolv Chromanorm, VWR), l'acide acétique (AcOH) (Chromanorm, VWR) et l'eau appelée milliQ purifiée par le système Synergy UV (Millipore). Ce système est capable de purifier de l'eau distillée en la soumettant d'abord à une lampe UV ($\lambda = 185$ nm et $\lambda = 254$ nm), puis en la faisant passer sur des résines anioniques et cationiques puis sur du charbon activé et enfin sur une membrane de 0,22 μm . Cela permet d'éliminer les ions minéraux et les molécules organiques et de piéger les bactéries et les particules. L'eau qui en résulte est une eau de résistivité de 18,2 $\text{m}\Omega$.

La phase mobile optimisée est composée d'ACN (solvant B) et d'eau contenant 0,05% d'AcOH (solvant A) (Yang, Wang et al. 2007).

2.2.2.1. La CLHP analytique

La chaîne CLHP utilisée en analytique est une chaîne Waters composée d'un injecteur automatique (717 Autosampler), d'un dégazeur monté en série, d'un contrôleur (600E system controller) et d'un détecteur à barette de diodes (996 Photodiode array detector). La colonne utilisée est une Waters SUNFIRE (C₁₈ ; 5 µm ; 4,6 × 150 mm) montée avec une pré-colonne de même phase stationnaire. Le débit d'analyse est de 1 mL/min, la température de la colonne est maintenue constante à 30°C et la détection s'effectue de 190 à 390 nm.

La chaîne est purgée avant chaque utilisation avec des proportions de solvants A et B de 50/50 et un débit de 5 mL/min afin d'éliminer toutes traces de bulles d'air ou de solvants utilisés précédemment. La colonne est équilibrée avant chaque injection pendant 20 min (10 volumes de colonne) avec les proportions de solvants de départ.

Sauf mentions contraires, l'échantillon à injecter est dissous dans le mélange de solvants des conditions initiales puis filtré sur membrane filtrante de porosité 0,22 µm (PVDF).

Les chromatogrammes obtenus sont visualisés sur un ordinateur PC connecté à la chaîne chromatographique grâce au logiciel Empower Pro.

Après chaque utilisation, la colonne est conditionnée et conservée dans 100% ACN.

2.2.2.2. La CLHP préparative

La transposition à l'échelle préparative s'effectue sur une chaîne Waters Deltaprep composée d'un injecteur manuel, d'un contrôleur (Prep LC controller), d'un détecteur UV à barrettes de diodes (2996 Photodiode array detector) équipée d'une cellule préparative. Les réservoirs de solvants sont dégazés à l'hélium directement dans les bouteilles. La colonne utilisée est une Waters SUNFIRE OBD (C₁₈ ; 5 µm ; 19 mm × 150 mm) montée avec une

pré-colonne. Le débit est de 17 mL/min, la température de la colonne est maintenue à 30°C et le suivi de la séparation s'effectue à 254 nm.

L'échantillon à injecter est dissous dans le mélange de solvant des conditions initiales, puis il est soumis aux ultrasons (OSI 5210, Branson) et centrifugé (Heraeus Sepatech 91941) 10 min à 3500 tr/min afin de faire sédimenter les particules insolubles et éviter leur injection dans la chaîne chromatographique.

Les chromatogrammes sont visibles en temps réel sur l'ordinateur PC auquel est reliée la chaîne grâce au logiciel Empwer Pro, et la collecte se fait manuellement dans des erlens.

2.2.2.3. Isolement des acides ganodériques

- A partir de l'échantillon F3 est isolé un composé pur (m = 3,3 mg) par CLHP. Ce composé d'aspect poudre blanche absorbe à 254 nm et se révèle à la vanilline sulfurique. L'analyse RMN indique qu'il s'agit de l'acide ganodérique F.
- De la fraction F7 est extrait un composé pur (m = 52 mg) par CLHP. Ce composé, d'aspect poudre blanche, absorbe à 254 nm et se révèle à la vanilline sulfurique. Les analyses RMN et SM indiquent qu'il s'agit de l'acide ganodérique H.
- De la fraction F10, est isolé un produit avec une masse de 77 mg par CLHP. Ce produit, à l'aspect d'une poudre blanche, absorbe à 254 nm et se révèle à la vanilline sulfurique. Les analyses RMN et SM indiquent qu'il s'agit de l'acide ganodérique A.

2.2.3. Etape 4 : La chromatographie flash de l'extrait ACN

2.2.3.1. Etape 4a : Sur chaîne chromatographique

Une colonne inox (2 cm de diamètre et 50 cm de longueur) est remplie avec 80 g de silice dont les particules mesurent entre 40 et 63 µm préalablement séchée 12h à 110°C. Elle est mouillée avec du dichlorométhane (DCM) et elle est remplie sous pression (300 bars). La colonne est ensuite montée sur la chaîne Waters ne possédant que des connectivités en inox

(le DCM est incompatible avec le peek). 220 mg d'extrait ACN est dissous dans 2,5 mL de DCM contenant 0,1% d'AcOH, 100 µL de MeOH et 100 µL d'IPrOH. L'échantillon est ensuite centrifugé et 2,5 mL sont injectés manuellement avec une boucle d'injection de 5 mL. Le débit est maintenu à 17 mL/min et la détection est réalisée à 366 nm. Les fractions sont ensuite séparées toutes les 30 s dans des tubes de 20 mL à l'aide d'un collecteur automatique. La séparation est réalisée en mode gradient de deux mélanges A (DCM + AcOH 0,1%) et B (DCM/Isopropanol/MeOH (8/1/1) + AcOH 0.1%). Il commence avec un éluant composé de 100% A pour aller à 100% B en 130 min. Puis la colonne est rincée avec du MeOH.

Après la séparation de l'extrait, les fractions obtenues sont déposées sur CCM de silice (Merck, Silica gel 60 F₂₅₄) sur support aluminium et éluées par le système DCM/IPrOH/MeOH/AcOH (9/0,5/0,5/0,1). Elles sont ensuite visualisées sous UV à 254 nm et 366 nm puis révélées à l'acide phosphomolybdique.

2.2.3.2. Etape 4b : Sur pipette pasteur

Une pipette pasteur flash (6 mm de diamètre et 80 mm de longueur) est remplie avec 1g de silice normale (diamètre des particules compris entre 70 et 200 µm). Elle est séchée à l'étuve et est mouillée avec les solvants des conditions d'élution initiales avant d'être transvasée dans la pipette pasteur. Une fois tassée, 12 mg de fraction sont déposés en tête de colonne et élués selon un gradient de solvant (30 mL par conditions) : DCM, DCM/MeOH 99/1 ; 98/2 ; 95/5 et rinçage au MeOH.

Une pression est maintenue constante à 1 bar par un courant d'air comprimé contrôlé par un manomètre.

Les fractions sont récupérées dans des tubes à hémolyse et déposées sur CCM de silice normale, visualisées sous UV à 254 nm et 366 nm puis révélées à la vanilline sulfurique.

2.2.4. Etape 5 : L'extraction liquide-liquide

Une extraction liquide-liquide de l'extrait ACN a été réalisée avec un système biphasique composé d'un mélange de trois solvants : toluène/MeOH/eau (4/4/2). Le système bisphasique est préparé la veille afin que le MeOH puisse bien se partager dans les deux phases car il aide l'extrait ACN à s'y dissoudre. Ce dernier est mis en contact avec 10 mL de

chaque phase dans une ampoule à décanter. Après agitation, l'extrait ACN se partage dans les deux phases selon l'affinité des molécules : les molécules les plus polaires se distribuent dans la phase aqueuse (m = 480 mg) tandis que les composés moins polaires se distribuent dans la phase organique (m = 180 mg).

2.2.5. Etape 6 : La chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La CPC est une technique chromatographique utilisant un système biphasique de solvants. L'instrument est composé de plusieurs cellules de partage connectées entre elles en série par des conduits capillaires. Une force centrifuge constante permet de maintenir la phase stationnaire (l'une des deux phases) tandis que l'autre phase, utilisée comme phase mobile, est pompée à travers la phase stationnaire.

Une chromatographie de la phase aqueuse de l'extrait ACN a été réalisée avec un système biphasique composé d'AcEth/ACN/eau (3/3/4) équilibré. La phase aqueuse de ce système est choisie comme phase stationnaire et est pompée à l'intérieur de l'appareil, en mode ascendant, en tournant à 1500 rpm avec un débit de 3 mL/min. L'échantillon est dissous dans la phase aqueuse puis centrifugé (10 min à 3000 rpm), le surnageant est injecté en sandwich avant le pompage de la phase organique, pompée en mode ascendant. Les fractions obtenues sont déposées sur CCM afin de suivre la séparation des composés.

2.3. Identification des composés extraits

2.3.1. Etape 7 : Analyse par résonance magnétique nucléaire

Les composés isolés sont analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) dans du CDCl₃ par le service de RMN de l'université de Châtenay Malabry. Des spectres protons et carbone sont enregistrés sur un instrument Bruker Avance de 300 MHz (spectres 1D) et/ou sur un instrument Bruker Avance de 400 MHz (spectres 2D : HMBC, HSQC et COSY). Ce dernier dispose d'une microsonde TXI 1,7 mm capable d'analyser les faibles quantités de produits (de l'ordre du milligramme).

2.3.2. Etape 8 : Analyse par spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse (SM) sont effectuées au Service d'Analyse des Médicaments et des Métabolites (SAMM) La méthode utilisée est le mode APCI⁵ en mode négatif. L'échantillon est dilué dans du MeOH.

2.4. Tests Biologiques

2.4.1. L'inhibition d'ABCB1 (étape A)

2.4.1.1. Culture cellulaire de la lignée immortalisée GPNT

L'étude de l'effet d'un mélange de substances ou d'un principe actif sur la fonctionnalité d'ABCB1 est effectuée *in vitro* en mesurant l'accumulation de substrats connus et décrits dans la littérature comme la rhodamine 123 (Patanasethanont, Nagai et al. 2007), la calcéine (Patanasethanont, Nagai et al. 2007) ou encore la digoxine (Ma and Wink 2008). L'essai d'accumulation utilisant la rhodamine étant une technique souple, moins chère et plus maniable que celle utilisant la [³H] digoxine, elle a été choisie pour nos travaux.

Les tests sont réalisés sur les cellules GPNT (GP8 et NeuroTech), cellules endothéliales cérébrales de rat provenant d'une autre lignée GP8 transfectée avec un plasmide de résistance à la puromycine (pcDNA3-RSV). Elles sont toujours cultivées en présence de 5 µg/mL de puromycine pour surexprimer ABCB1 (Demeuse, Fragner et al. 2004) dans un milieu DMEM/F12⁶ (1/1) supplémenté en glutamate, 10% de sérum de veau fœtal d'origine australienne, 2 mL de Pénicilline/Streptomycine à 10 000 µg/mL, 0,5 ng/mL de Fibroblast Growth Factor (bFGF), 0,5 µg/mL de transferrine, 0,5 µg/mL d'insuline et 5 ng/mL de sélénium (Invitrogen GIBCO). Les cellules GNPT sontensemencées en monocouche et maintenues par passages successifs dans des flacons de 75 cm² préalablement collagénés avec du collagène de type 1 pour faciliter leur adhésion à la paroi. Les flacons de 75 cm² sontensemencés à raison de 2 000 000 cellules, et pour les plaques, 20 000 cellules sont déposées dans chaque puits (Vautier, Milane et al. 2008).

⁵ Ionisation chimique à pression atmosphérique

⁶ Dulbecco's Modified Eagles Medium

Le milieu est changé tous les deux jours et les cellules sont trypsinées tous les trois jours.

2.4.1.2. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur les cellules GPNT par le test de prolifération cellulaire MTT⁷

Ce test colorimétrique est réalisé selon la méthode décrite par Mosmann (1983). Ce test toxicologique mesure l'activité métabolique des cellules encore vivantes après exposition à un composé. Le principe consiste à mesurer l'activité de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme est capable de couper le cycle tétrazolium du MTT de couleur jaune en formazan se présentant sous forme de cristaux bleus que l'on détecte par spectroscopie à 570 nm après dissolution. Les densités optiques sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes dans l'échantillon. La viabilité est calculée en pourcentage par rapport au contrôle positif et négatif. Le composé testé est considéré non toxique si le pourcentage viabilité des cellules est supérieur ou égal à 90%.

Les puits d'une plaque sont répartis de la façon suivante (trois puits par conditions) (Schéma 1) :

- Contrôle positif (milieu)
- Contrôle négatif (triton à 1X dans le milieu)
- Gamme de concentrations croissantes d'extraits, fractions ou produits à tester (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 250 ou 500 µg/mL à partir d'une solution mère à 1 mg/mL dans du milieu contenant 12% de DMSO).
- Contrôle DMSO

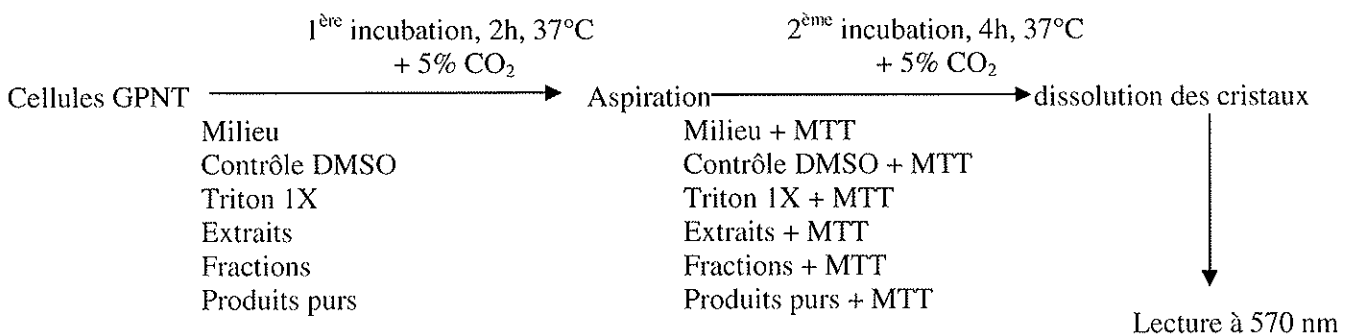


Schéma 1 : Principe du test de cytotoxicité au MTT

Après 2h d'incubation, le milieu est éliminé et remplacé par 100 µL de MTT à 500 ng/mL dans du milieu de culture puis incubé pendant 4 heures. Les cristaux de formazan formés sont ensuite solubilisés dans 50 µL d'un mélange isopropanol/HCl 0.04N (96,5 :3,5, v/v). La densité optique (DO) de chaque puits est mesurée par un spectrophotomètre de type MRX 11 à 570 nm. Le pourcentage de cellules vivantes est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ cellules vivantes} = \frac{DO_{\text{expérimentale}} - DO_{\text{CN}}}{DO_{\text{CP}} - DO_{\text{CN}}} \times 100$$

Les essais de cytotoxicité des extraits de *G. capense* sur les cellules GPNT ont été réalisés par Ha-Phuong TA, concluant à la possibilité d'incuber les cellules en présence d'extraits à 250 µg/mL, sans risque de toxicité. Ces essais ont été répétés dans le cadre de ce stage.

2.4.1.3. Essai d'accumulation intracellulaire, Essai à la rhodamine

L'essai à la rhodamine 123 (figure 63), permettant d'évaluer la fonctionnalité d'ABCB1, est basé sur la mesure de la fluorescence de la rhodamine accumulée dans les cellules testées. Cette dernière traverse passivement les membranes des cellules et se loge dans le compartiment intracellulaire, d'où elle est expulsée par ABCB1. L'accumulation de la rhodamine dans les cellules est donc inversement proportionnelle à l'activité d'ABCB1 : toute augmentation de la concentration intracellulaire traduit une inhibition d'ABCB1.

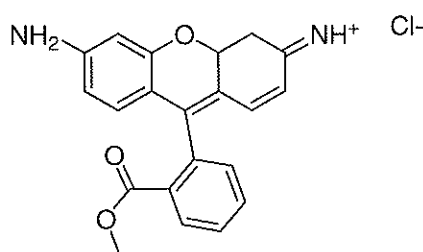


Figure 63 : Structure chimique de la rhodamine

L'essai est réalisé dans des plaques noires à fonds transparents de 96 puits selon le schéma 2. Les cellules sont sevrées en puromycine au minimum 2h avant le début de la

manipulation. Le témoin positif est le valsopodar (Vals) à 10 μM , inhibiteur puissant et spécifique d'ABCBI, le témoin négatif est le milieu contenant le solvant (DMSO à 3%). Nous pouvons ainsi nous affranchir de l'éventuel effet du DMSO sur la fonctionnalité d'ABCBI. Les extraits sont testés à une concentration finale dans chaque puits de 250 $\mu\text{g/mL}$ dans du milieu contenant 3% DMSO.

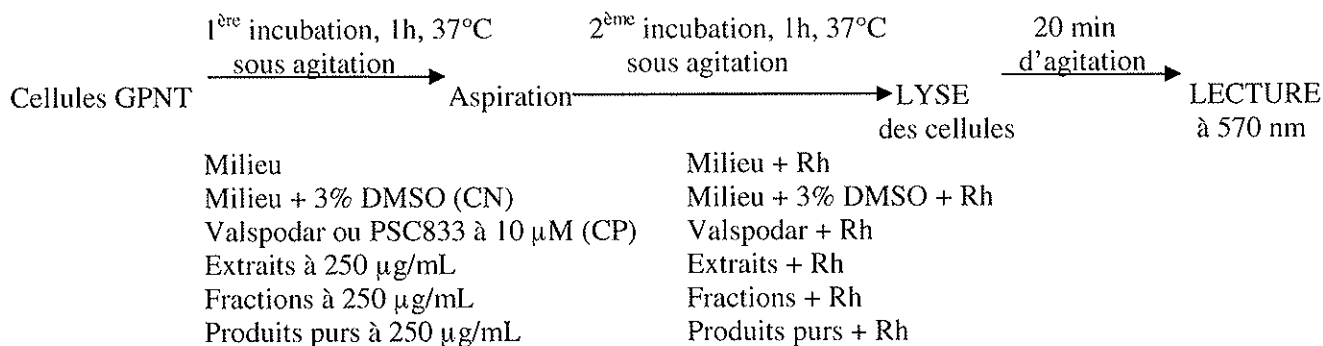


Schéma 2 : Principe du test à la rhodamine

Après une pré-incubation avec les solutions à tester (250 $\mu\text{g/mL}$), la rhodamine 123 (1 μM par puits) est ajoutée (Lohner, Schnaebele et al.). Les cellules sont incubées pendant 1 heure. Elles sont ensuite lavées avec du PBS (Ca-/Mg-) à 40°C puis lysées par 100 μl d'une solution de HBSS1X/triton1%. Le contenu intracellulaire en rhodamine est ainsi libéré et les plaques sont mises sous agitation horizontale pendant 20 min pour homogénéisation. La lecture de l'absorbance dans chaque puits s'effectue sur un spectrofluorimètre de type Fluostar BMG LABTECH ($\lambda_{\text{excitation}}$ à 485 nm et $\lambda_{\text{émission}}$ à 538 nm). Une gamme de concentrations croissantes de rhodamine dans la solution de HBSS 1X contenant du triton est réalisée sur chaque plaque (0 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 0,75 μM).

La droite de régression représentant l'absorbance (A) en fonction de la concentration en rhodamine est établie. La concentration en rhodamine dans les échantillons est calculée d'après la valeur de l'absorbance trouvée dans chaque puits. Ces concentrations sont ramenées à la concentration en protéine de chaque puits. Les résultats sont exprimés en rapport absorbance/ concentration en protéines.

Robustesse de la méthode

La spécificité de la méthode a été préalablement testée : des extraits ont été analysés en l'absence de rhodamine, aux longueurs d'onde spécifiées, afin de déterminer s'ils émettent spontanément une fluorescence.

Les extraits ne fluoresçant pas contrairement aux extraits traités par la rhodamine, ces contrôles n'ont plus été réalisés par la suite. Le test a été validé par l'effet inhibiteur du valsopodar (contrôle positif) et l'absence d'effet du DMSO (contrôle négatif) sur la fluorescence de la rhodamine.

2.4.1.4. Dosage des protéines par l'acide bicinchonique (BCA)

La quantification des protéines permet de normaliser les résultats obtenus après le dosage fluorimétrique. Il permet de palier le biais provoqué par la différence du nombre de cellules présentes dans un puits, celui-ci pouvant fluctuer d'un puits à l'autre pour une même plaque en fonction de la vitesse de croissance des cellules.

Une droite d'étalonnage de concentrations croissantes de BSA (albumine sérique bovine) est nécessaire pour quantifier les protéines présentes dans les puits (2, 1, 0,5 et 0,25 mg/mL). A partir de la plaque utilisée pour le test à la Rhodamine, deux prélèvements de 5 μ L par puits sont nécessaires pour en déterminer la concentration en protéines. Ils sont dilués dans 95 μ L d'eau distillée. La révélation se fait par l'ajout de 100 μ L dans chaque puits d'un mélange du réactif A (acide bicinchonique) et B (sulfate de cuivre) du kit BCA dans les proportions de 50/1 (Sigma Aldrich). Après incubation à 56°C pendant 45 min, la densité optique (DO) de chaque puits est mesurée par un spectrophotomètre de type MRX 11 à $\lambda = 570$ nm.

2.4.1.5. Analyse statistique

Les moyennes des résultats des mesures de fluorimétrie du test à la rhodamine et de colorimétrie du test BCA sont comparées par un test t, en prenant 0,05 comme limite de significativité (GraphPad Prism 4.0). Chaque composé testé est comparé au contrôle négatif (CN).

2.4.2. Cytotoxicité in vitro sur cellules KB (Etape B)

Les tests sont réalisés à la ciblothèque de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN CNRS, Gif sur Yvette) sur les cellules KB. Le témoin positif est le docétaxel (Taxotère®) et le témoin négatif est le milieu contenant le solvant.

Après 72h d'incubation, l'inhibition éventuelle de la prolifération cellulaire est évaluée en comparaison avec les cultures témoins non traitées (2 µL de DMSO) par ajout de 40 µL de MTS8 qui se fixe sur les mitochondries des cellules vivantes. Après 2 h d'incubation et dissolution des cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 490 nm. Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{DO}_{\text{expérimentale}}}{\text{DO}_{\text{témoin}}}\right) \times 100$$

Les essais sont réalisés à une concentration d'extraits de 10 µg/mL en triplicate.

2.4.3. Les essais antiparasitaires in vitro (Etape C)

Les essais antiparasitaires ont été réalisés au laboratoire de Chimiothérapie Antiparasitaire (Pr. PM Loiseau) de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Université Paris-Sud 11, France).

2.4.3.1. Criblage antileishmanien in vitro de la leishmaniose viscérale

Il s'agit d'un essai colorimétrique au MTT (voir 2.4.1.2.) permettant une quantification rapide des cellules vivantes.

Les essais sont réalisés sur des promastigotes de la souche sauvage de *Leishmania donovani* (LV9WT). Cette espèce présente en Afrique est responsable de la leishmaniose viscérale. Les parasites sont cultivés in vitro à l'étuve (26°C, sous atmosphère d'air additionné de 5 % de CO₂) dans des flacons contenant du milieu de culture M199 complété en sérum de veau fœtal (10%). Un volume de suspension de parasites à 1.10⁹

⁸ MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

parasites/mL, est repiqué dans du milieu neuf tout les 3 jours, afin d'obtenir une culture à 1.10^6 parasites/mL.

L'amphotéricine B est utilisé comme contrôle positif. Une gamme de concentration allant de 10 à 0,01 μ M est réalisée en triplicate à partir d'une solution mère d'amphotéricine B à 8 mM. Le contrôle négatif est le DMSO à 2,5 % obtenu en déposant 5 μ L de solvant en triplicate dans des puits contenant 100 μ L de milieu de culture auquel sont ajoutés 100 μ L de suspension de parasites.

La gamme de concentrations de l'extrait à tester est obtenue à partir d'une solution mère à 10 mg/mL dissoute dans le DMSO. Elle est réalisée par la méthode de dilution sériée de raison 2 dans du milieu de façon à obtenir un volume dans chaque puit de 100 μ L de la gamme à 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 et 15,625 μ g/mL. Puis, 100 μ L d'une suspension de parasites à 2.10^6 parasites/mL est ajoutée dans chaque puits de la gamme (200 000 parasites / puits) afin d'obtenir une gamme de concentrations finale de 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 ; 15,625 et 7,81 μ g/mL.

La plaque est incubée pendant 72 h à l'étuve à l'abri de la lumière (26°C, sous atmosphère d'air additionné de 5% de CO₂) après agitation (3 minutes) sur un agitateur horizontal. Puis, 10 μ L de la solution de MTT à 5mg/mL, sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est agitée et de nouveau incubée pendant 4h dans les mêmes conditions. 50 μ L d'une solution de lyse composée d'eau distillée (400 mL), de Triton X-100 (100 ml) et d'HCl concentré (16 mL) sont enfin ajoutés afin de lyser les cellules et d'homogénéiser la coloration.

La lecture de la DO de chaque puits s'effectue à 570 nm sur un lecteur de plaques MULTISKAN MS et le pourcentage de parasites morts à une concentration donnée est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de parasites morts} = 100 \times \frac{1 - (DO_{\text{extrait}} - DO_{\text{CP}})}{DO_{\text{CN}} - DO_{\text{CP}}}$$

Il est également possible de déterminer la concentration inhibitrice 50 % (IC₅₀) des extraits testés à partir d'une gamme de concentrations, en traçant la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration. Elle est déterminée à partir d'une gamme de concentrations en utilisant le logiciel <http://www.antimalarial-icestimator.net/>.

L'activité recherchée étant une activité leishmanicide, l'absorbance est d'autant plus faible que l'extrait est actif.

2.4.3.2. Criblage *in vitro* de la trypanosomiase Africaine : détermination de la Concentration Minimale Létale (CML)

Le stade pathogène de *Trypanosoma brucei brucei* (forme longue ou long slender form) est exposé *in vitro* à des solutions d'extraits à différentes concentrations. La concentration minimale létale ou trypanocide est déterminée en notant la plus faible concentration pour laquelle aucun parasite n'est observé au microscope inversé (Zagana, Klepetsanis et al. 2007). Les essais sont réalisés sur trypomastigotes de la souche lente de *Trypanosoma brucei brucei* GVR 35. Cette souche appartient au même nosodème que *Trypanosoma brucei gambiense* qui est responsable de la trypanosomiase humaine africaine. Des souris swiss (outbreed) sont infectées avec la souche par voie IP7, 15 jours avant l'essai *in vitro*. Il en résulte une infection chronique qui durera quelques semaines si les souris ne sont pas traitées (Ngure, David Eckersall et al. 1997). Les extraits à tester sont préparés dans le DMSO à des concentrations de 10 et 2 mg/ml.

Le milieu M199 est composé de 20 mL de M 199 5% (Sigma), 10 ml de sérum de veau foetal (Lonza), 4 mL d'hépes 1M (Lonza), 0,125 mL de gentamycine (Gentalinne®, 40 mg/2 mL, 1 ampoule pour solution injectable, médicament autorisé n°304365-9, Schering-Plough), 1 mL d'adénosine 10 mM (Sigma), 0,2 mL d'hémin 10 mM (Fluka) et 64,8 mL d'eau désionisée stérile. La solution est stockée à 4°C, pendant trois semaines maximum.

Dans un premier temps, un examen direct entre lame et lamelle d'une goutte de sang (diluée dans du sérum physiologique) de la souris infectée, est effectué afin de vérifier que les parasites sont en phase de multiplication (100 % de formes longues). Un volume de 500 µL de sang est ensuite prélevé au sinus de la souris et recueilli dans 5 mL de milieu de culture à 4°C, contenant 5% de citrate de sodium. Le prélèvement est centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min à 4°C, puis conservé dans de la glace. Les parasites présents à l'interface du culot sanguin et du plasma sont ensuite récupérés et dilués dans un milieu de culture à la concentration de 2.10^5 parasites/mL.

Le témoin négatif est le DMSO à 2,5 %. Pour cela, 5 µl de solvant sont déposés en triplicate dans des puits contenant 100 µL de milieu de culture, auxquels sont ajoutés 100 µL de suspension de parasites.

La survie des parasites dans les conditions de l'essai est également vérifiée en préparant en triplicate des puits contenant seulement 100 µL de milieu de culture plus 100 µL de suspension de parasites. La pentamidine (Pentacarinat[®]) et le melarsoprol (Arsobal[®]) sont utilisés comme contrôles positifs.

Une solution mère de Pentacarinat[®] est préparée à 10 mg/mL dans un milieu de culture (équivalent à 5,70 mg/mL de pentamidine). Une dilution sériée est effectuée à partir de cette solution mère afin d'obtenir une gamme de concentration en pentamidine allant de 142,62 µg/mL à 0,07 µg/mL. Une solution mère d'Arsobal[®] est préparée à 36 mg/ml dans du milieu de culture. Une dilution sériée est effectuée à partir de cette solution mère afin d'obtenir une gamme de concentrations allant de 450 à 0,22 µg/mL.

L'extrait à tester est déposé au double de la concentration de départ voulue, dans le 1er puits de la ligne servant à la gamme, contenant 200 µl de milieu de culture. Les autres puits de la ligne de la gamme, contiennent eux, seulement 100 µl de milieu de culture. La gamme de concentration est obtenue par dilutions sériées de raison 2, en déposant et homogénéisant 100 µl, prélevés du 1er puits de la ligne, dans le puits suivant. L'opération est répétée jusqu'au dernier puits de la gamme. Les derniers 100 µl prélevés sont jetés.

100 µl de la suspension de parasites sont alors ajoutés dans chaque puits de la gamme (20 000 parasites / puits) afin d'obtenir la gamme de concentration voulue.

Les essais sont réalisés en simple ligne et confirmés lors d'un essai ultérieur.

La plaque est incubée pendant 24 h à l'étuve (37°C, sous atmosphère d'air additionné de 5% de CO₂) après agitation (3 min) sur un agitateur horizontal.

La lecture est effectuée au microscope inversé (G x 200).

2.4.4. Criblage antifongique in vitro : détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de *Candida albicans* (Etape D)

Les levures sont exposées à une dispersion homogène des solutions d'extraits à différentes concentrations. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la concentration la plus faible permettant une inhibition complète de la multiplication visible des levures après 48 heures d'incubation (Pfaller 2007).

Les essais sont réalisés sur une souche de levure de *Candida albicans* (CM1) non résistante, isolée de malade. Cette espèce est responsable de 80% des candidoses retrouvées chez l'homme. La souche de levure est cultivée *in vitro* sur gélose Sabouraud à 35°C. Elle doit être repiquée au moins deux fois sur gélose Sabouraud avant l'essai en utilisant la technique par microdilution en plaque 96 puits à 35°C.

Le milieu de culture RPMI/MOPS est utilisé pour la technique par microdilution sur plaque. Il est composé de milieu de culture RPMI 1640 avec L-glutamine sans bicarbonate (Sigma) tamponné avec 0,165 M de MOPS (Sigma) soit 34,5 g/L (pH 7 à 25°C). Le milieu est préparé la veille de l'essai par filtration stérilisante et conservé à 4°C.

Cinq colonies de diamètre supérieur à 1 mm sont prélevées d'une gélose Sabouraud glucose et mises en suspension dans 5 ml de sérum physiologique stérile. La turbidimétrie est ensuite ajustée à une échelle de 0,5 MacFarland soit 0.08 à 0.1 de densité optique à 625 nm (0,5 à 1.10^6 levures/mL). La suspension de l'essai est ensuite préparée en diluant cette suspension au millième dans le milieu RPMI/MOPS.

Les extraits à tester sont préparés dans le DMSO à la concentration de 10 mg/ml. Il est déposé au double de la concentration de départ voulue, dans le 1er puits de la ligne servant à la gamme, contenant 200 µL de milieu de culture. Les autres puits de la ligne servant à la gamme, contiennent eux, seulement 100 µl de milieu de culture. La gamme de concentration est obtenue par dilutions sériées de raison 2 : 250 ; 125 ; 62,5 ; 15,625 et 7,81 µg/mL.

Les essais sont réalisés en double ligne.

Le témoin négatif, le DMSO à 2,5 %, est étudié afin de vérifier que le solvant des échantillons n'est pas lui-même inhibiteur de la croissance des levures. Pour cela, 5 µl de solvant sont déposés en triplicate dans des puits contenant 100 µl de milieu de culture,

auxquels sont ajoutés 100 μ l de suspension de levures. Le témoin positif est l'amphotéricine B. Une gamme de concentrations allant de 3,70 à 0,002 μ g/mL est réalisée en duplicate à partir d'une solution mère d'amphotéricine B à 8 mM.

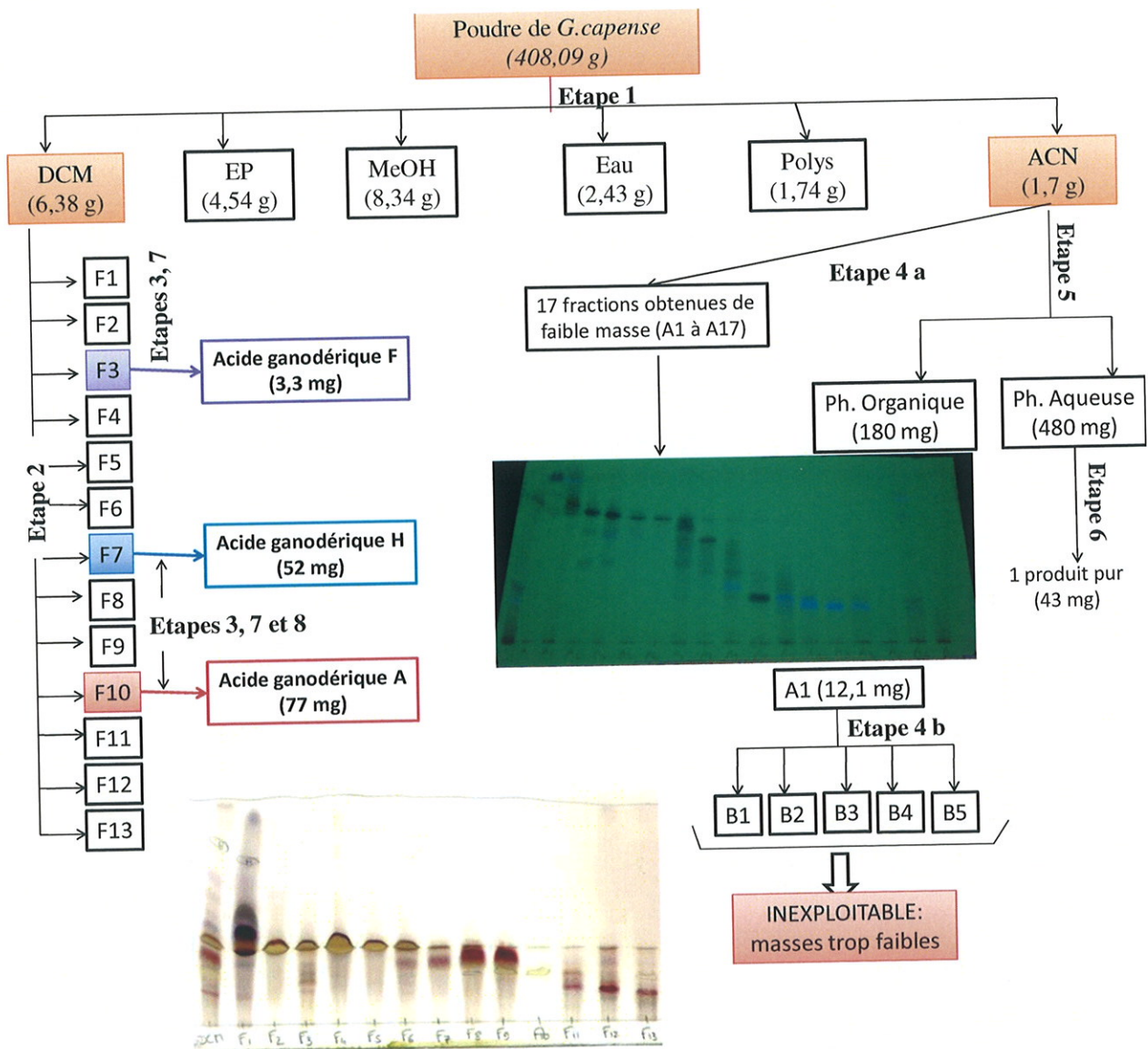
La multiplication des levures dans les conditions de l'essai est également vérifiée en préparant en double des puits contenant seulement 100 μ l de milieu de culture plus 100 μ L de suspension de levures.

La plaque est incubée pendant 48 h à 35°C après agitation (3 min) sur un agitateur horizontal. La lecture est effectuée à l'œil nu à 24 et 48 heures.

3. Résultats

Les Ganodermas présentent un profil intéressant pour cette activité : du fait de son innocuité, ce champignon constitue un intérêt clinique non négligeable et semble être le parfait candidat pour cette étude.

3.1. Stratégie d'extraction de *G. capense*



3.2. Fractionnements et isolements

3.2.1. Fractionnement de l'extrait DCM : Etape 2

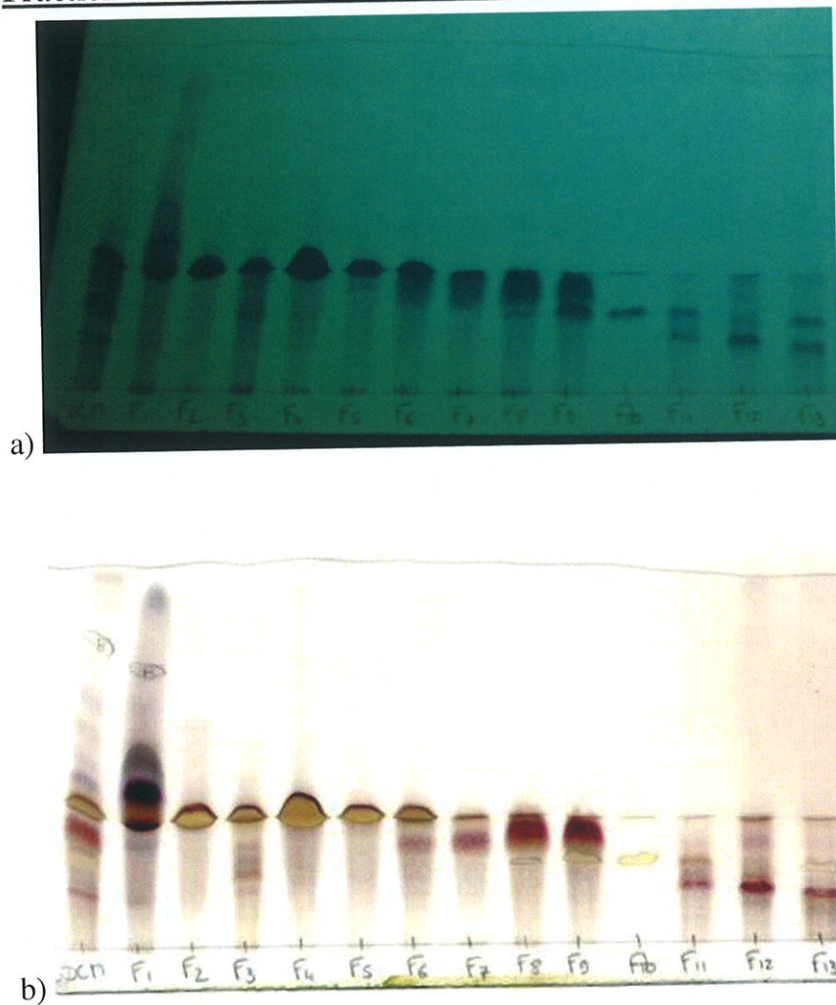


Photo 1 : CCM des fractions issues de DCM [F1 à F13] (DCM/MeOH/AcOH 95/5/0,1) visualisation à 254 nm (a) et Révélation à la vanilline sulfurique (b)⁹

⁹ Photographie prise par Sandrine AUGET

3.2.2. CLHP/UV : Etape 3

3.2.2.1. Evaluation des profils chromatographiques des extraits DCM et ACN

Les profils chromatographiques des extraits DCM et ACN sont évalués à l'aide d'une CLHP/UV :

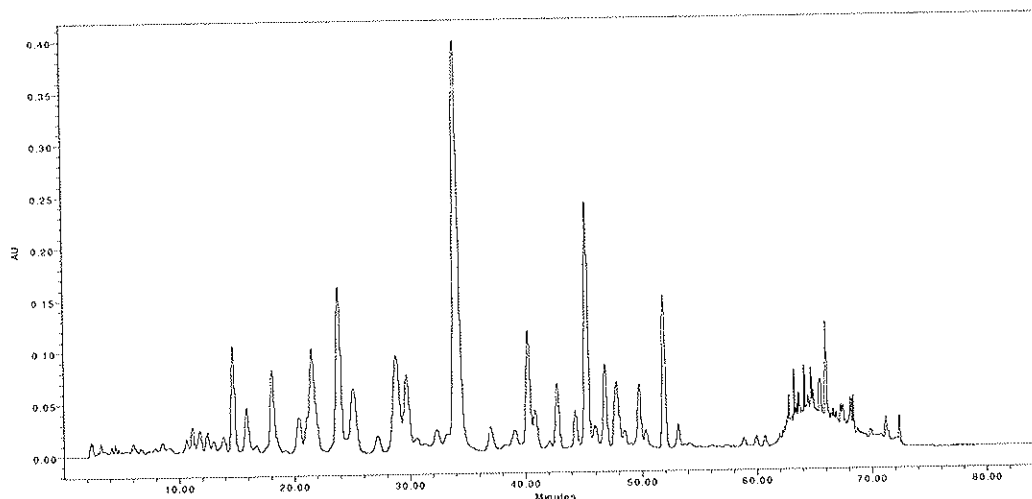


Figure 64 : Profil chromatographique de l'extrait DCM, colonne Zorbax SB-C₁₈; 4,6x250mm ; 3,5µm ; gradient linéaire de solvant: 30% de B pendant 25 minutes, puis à 45% en 30 minutes, puis à 100 % en 1 minute pendant 9 minutes, puis à 30% en 1 minute pendant 20 minutes.

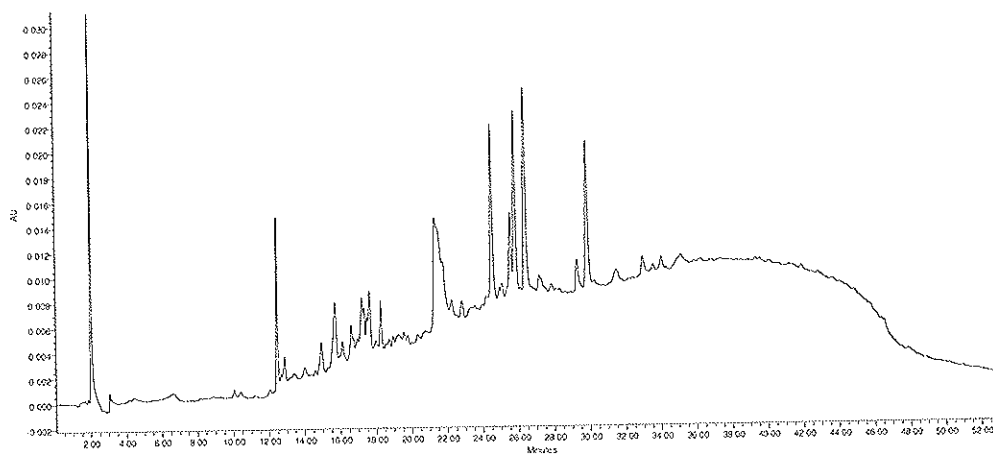


Figure 65 : Profil chromatographique de l'extrait ACN, colonne Sunfire C₁₈; 4,6x150mm ; 5µm à 350 nm ; gradient 5% à 100% solvant B en 40 min

3.2.2.2. Isolement des triterpènes

Les CLHP analytiques et la transposition préparative correspondant à l'isolement de l'acide ganodérique F (Figure 66), l'acide ganodérique H (Figure 67) et l'acide ganodérique A (Figure 68) sont présentés ci-dessous :

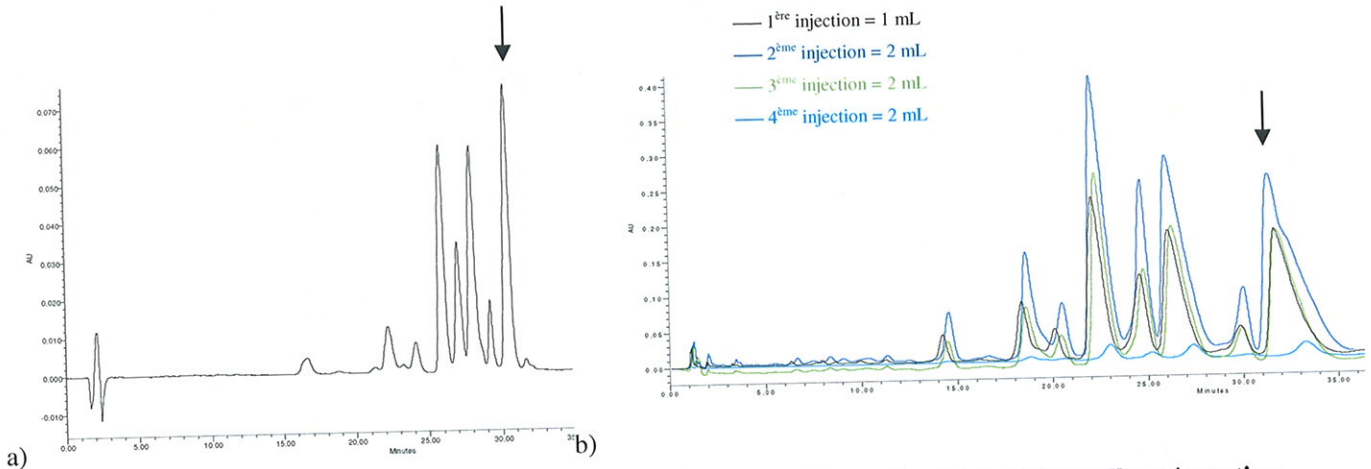


Figure 66 : F3 à l'échelle analytique colonne Sunfire (C₁₈ ; 4,6x150mm ; 5µm) (a) et à l'échelle préparative Colonne Sunfire OBD (C₁₈ ; 19 mm x 150 mm; 5 µm) (b) à 254 nm (isocratique 65/35 (A/B))

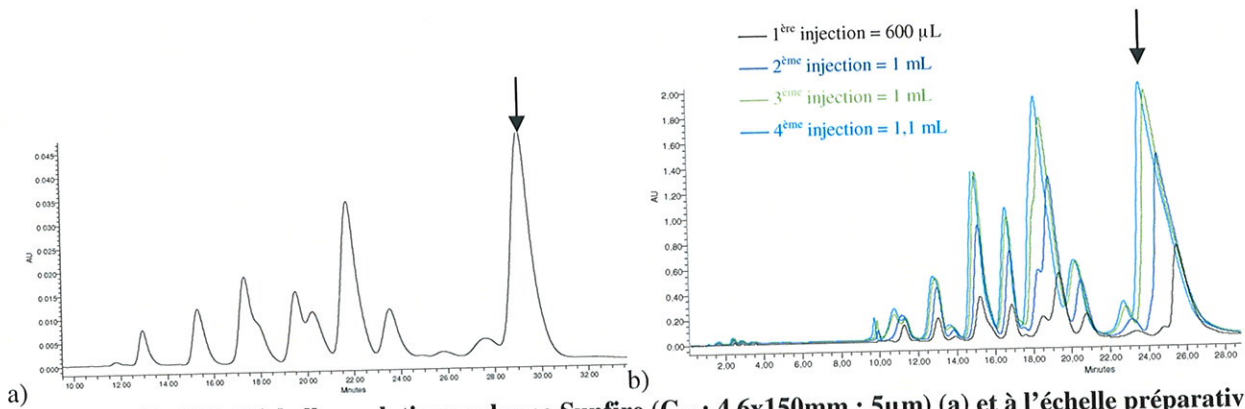


Figure 67 : F7 à l'échelle analytique colonne Sunfire (C₁₈ ; 4,6x150mm ; 5µm) (a) et à l'échelle préparative Colonne Sunfire OBD (C₁₈ ; 19 mm x 150 mm; 5 µm) (b) à 254 nm (isocratique 70/30 (A/B))

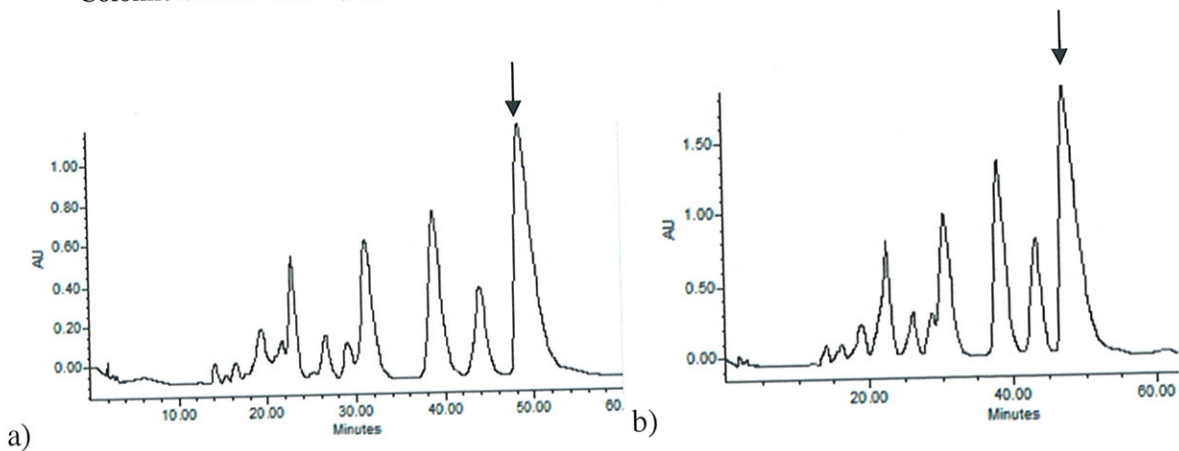


Figure 68 : F10 à l'échelle analytique (a) et à l'échelle préparative (b) à 254 nm (isocratique 71/29 (A/B))

3.2.3. Fractionnement de l'extrait ACN : Etapes 4a et 4b

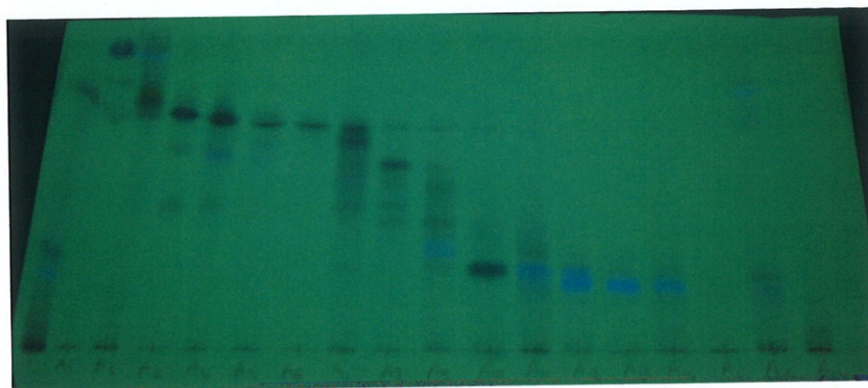


Photo 2 : CCM des fractions réunies (extrait ACN puis les fractions A1 jusqu'à A17)

fractions	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	AMeOH
masse (mg)	12,3	10,9	7,1	2,8	1,5	4,8	8,7	1,6	11,1	4,3	1,1	1,3	2,1	1,2	1,1	4,3	30	112,6

Tableau 5 : Récapitulatif des masses obtenues après réunion des fractions

Seule la fraction A1 présente une masse permettant un fractionnement ultérieur. Une nouvelle chromatographie flash sur pipette pasteur est réalisée

fractions	B1	B2	B3	B4	B5	BMeOH
masse (mg)	3,2	1,9	1,3	2,2	2,6	0,3

Tableau 6 : Récapitulatif des masses obtenues

Les masses des fractions obtenues sont trop faibles pour pouvoir continuer le fractionnement.

3.2.4. Extraction liquide-liquide de l'extrait ACN : Etape 5

Une extraction liquide-liquide de l'extrait ACN a été réalisée avec un système biphasique composé d'un mélange de trois solvants : toluène/MeOH/eau (4/4/2). L'extrait ACN se répartit dans les deux phases selon l'affinité des molécules : les molécules les plus polaires se répartissent dans l'eau (phase aqueuse, m = 480 mg) tandis que les composés moins polaires se distribuent dans la phase contenant le toluène (phase organique m = 180 mg).

3.2.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la phase aqueuse : Etape 6

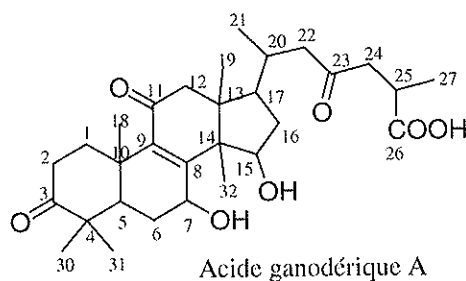
Une chromatographie de partage centrifuge (chromatographie liquide-liquide sans support solide) est réalisée. En raison de sa masse significative, le résidu de phase aqueuse (480 mg) est soumis à une séparation utilisant cette technique. Les résultats obtenus sont en cours d'analyse. Au moins un produit pur (43 mg) a été isolé directement par cette chromatographie.

3.3. Identification structurale : RMN et SM des triterpènes isolés : Etapes 7 et 8

3.3.1. A partir de la fraction F10

L'identification structurale de l'acide ganodérique A a été déterminée par comparaison entre les données des spectres ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC et HMQC avec les données de la littérature. L'analyse du spectre RMN ^1H présente majoritairement des protons aliphatiques. Le spectre RMN ^{13}C JMOD permet d'établir que ce composé comporte 30 atomes de carbone (Annexe 3).

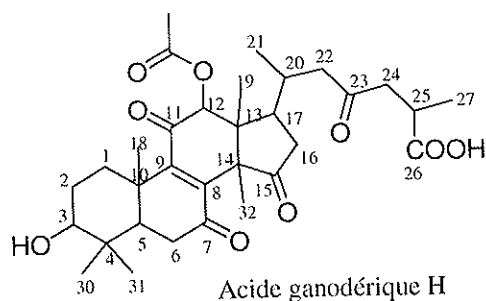
Son analyse par spectrométrie de masse en ionisation APCI et en mode négatif a permis de déterminer sa masse moléculaire comme étant de 516 g/mol ($[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 515), ce qui est compatible avec une formule brute de $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$. Une fragmentation de la molécule donne un autre ion à m/z 497 correspondant à une perte de 18 unités de masse suggérant une perte d'eau.



3.3.2. A partir de la fraction F7

L'analyse du spectre RMN ^1H de l'acide ganodérique H présente majoritairement des protons aliphatiques. Le spectre RMN ^{13}C JMOD permet d'établir que ce composé comporte 32 atomes de carbone en accord avec les données obtenues en SM (Annexe 4) (Kikuchi, Kanomi et al. 1986).

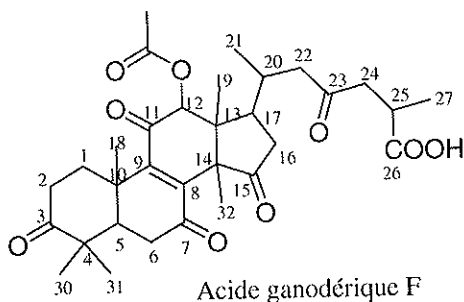
Le spectre de masse en ionisation APCI et en mode négatif montre un pic de base $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 571 permettant de proposer une formule brute $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{O}_9$. Une fragmentation de la molécule donne un autre ion à m/z 554 correspondant à une perte de 17 unités de masse suggérant la perte d'un hydroxyle.



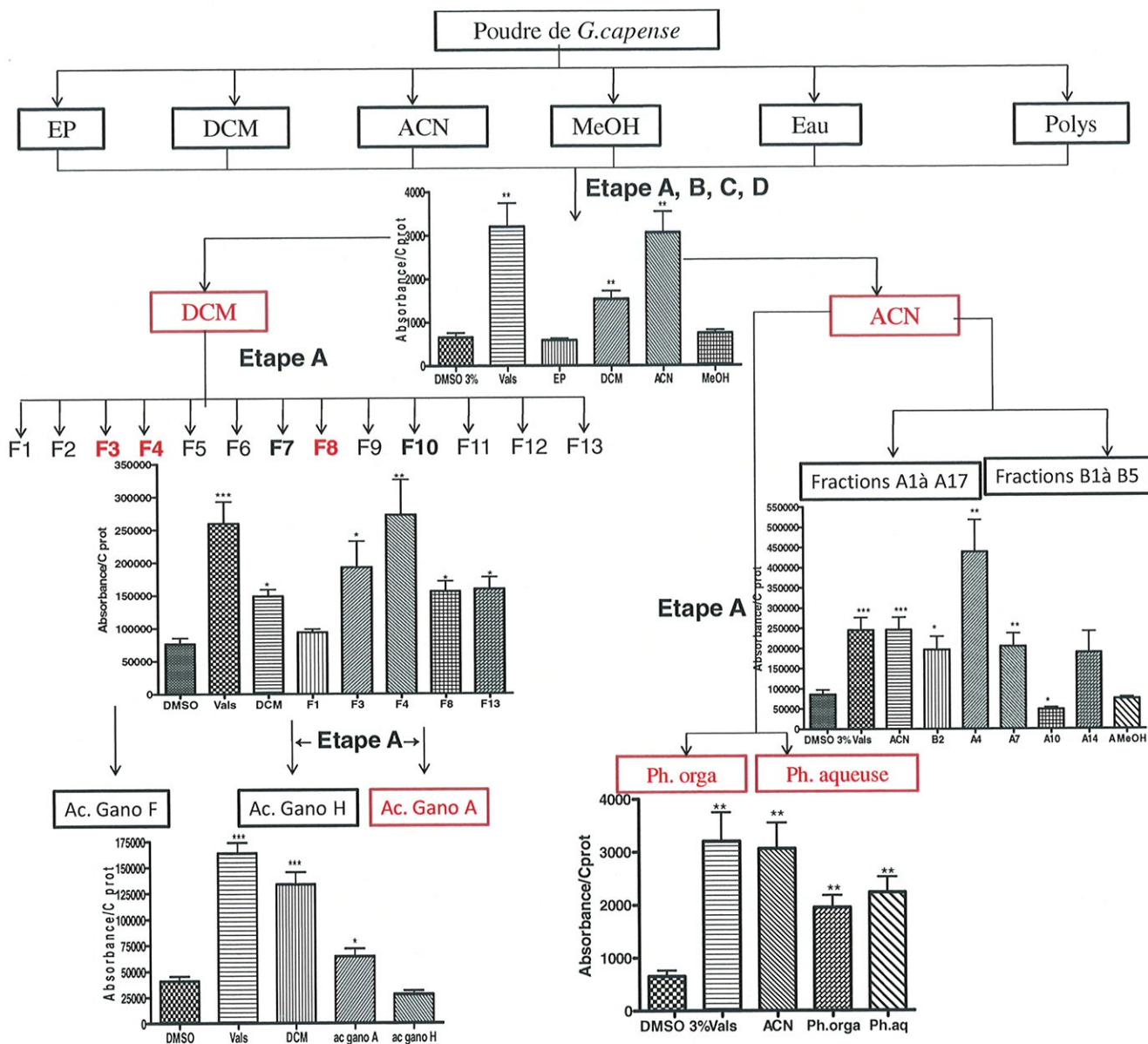
3.3.3. A partir de la fraction F3

L'analyse du spectre RMN ^1H à 400 Hz dans CDCl_3 avec la microsonde XTI 1,7 mm présente majoritairement des protons aliphatiques (Annexe 5).

D'après le spectre ^1H , le nombre de protons présents sur le spectre est compté à 41 c'est-à-dire deux protons de moins que l'acide ganodérique H. Ensuite, le spectre HMBC montre une fonction carbonyle à la place de l'OH en position 3 par comparaison à l'acide ganodérique H. Cette fonction corrèle avec les protons des C_1 , C_{30} et C_{31} caractéristiques, confirmant sa position en C_3 . D'après la littérature (Kikuchi, Kanomi et al. 1986), le déplacement chimique des protons correspond à celui de l'acide ganodérique F.



3.4. Criblage biologique des extraits de *Ganoderma capense*



3.4.1. Test d'inhibition d'ABCB1 : Etape A

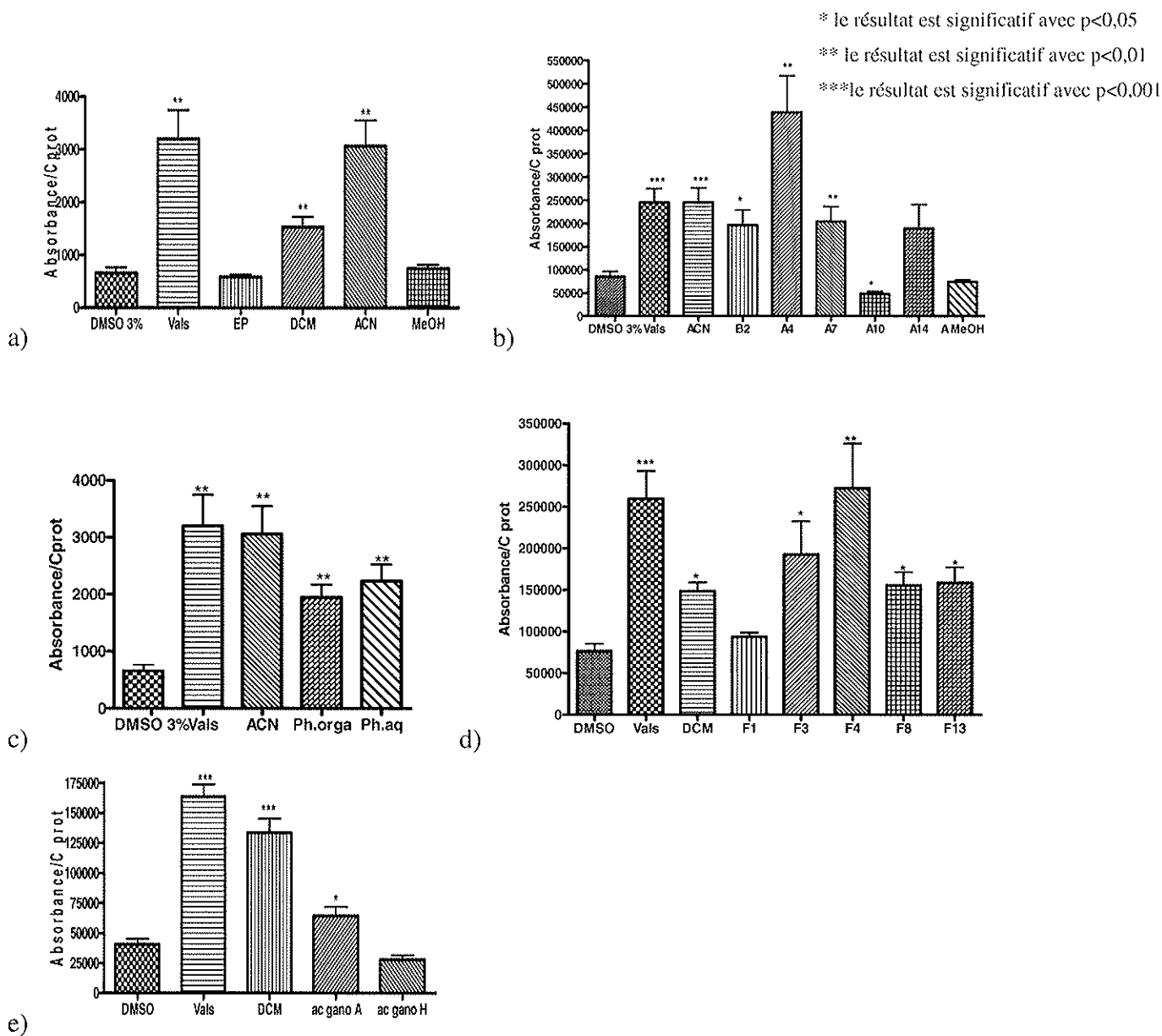


Figure 69 : Tests d'accumulation à la rhodamine 123 sur les cellules GPNT des extraits, fractions et composés isolés à 250 µg/ml

Le valsopodar inhibe ABCB1 témoignant du bon fonctionnement de l'expérience. Les extraits EP et MeOH ne possèdent pas d'activité sur ABCB1, ils ne seront donc pas exploités par la suite. D'après la Figure 69a, seuls les extraits DCM et ACN inhibent ABCB1 de façon significative. Ces deux extraits feront l'objet d'études afin d'en extraire les composés d'intérêts.

L'extrait ACN est confirmé inhibant ABCB1 tout comme les fractions B2, A4 et A7. Les fractions A10, A14 et A MeOH quant à elles, sont dépourvues d'activité. La fraction A4 est particulièrement intéressante car elle possède une activité inhibitrice plus intense que le CP (Figure 69b). Le fractionnement de ces fractions s'arrête à ce stade car les masses sont trop faibles.

Les phases organiques et aqueuses présentent une activité inhibitrice d'ABCB1 significative (Figure 69c). Le fractionnement de ces deux fractions doit se poursuivre pour en extraire le ou les composés actifs.

La fraction F1 ne présente pas d'intérêt. Les fractions F3, F8, F13 et surtout F4 sont des fractions possédant une activité inhibitrice d'ABCB1. Elles seront soumises à un fractionnement supplémentaire (Figure 69d).

L'acide ganodérique A possède une activité inhibitrice de ABCB1 faible mais significative (Figure 69e).

L'acide ganodérique H ne présente pas d'activité inhibitrice d'ABCB1 à 250 µg/mL (soit 437 µM) (Figure 69e).

L'acide ganodérique F et le produit de 43 mg doivent être testés.

3.4.2. Essais de cytotoxicité sur les cellules KB : Etape B

Les fractions et l'extrait ACN n'ont pas démontré une activité cytotoxique contre ces cellules.

L'acide ganodérique A possède une activité cytotoxique très faible sur les cellules KB puisque le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire est évaluée à 2%.

L'acide ganodérique H ne présente pas d'activité cytotoxique sur les cellules KB,

3.4.3. Essais antiparasitaires : Etape C

3.4.3.1. Activité trypanocide

Les extraits présentent une CML comprise entre 25 et 12,5 $\mu\text{g/mL}$, les extraits DCM, EtOH et MeOH étant les plus actifs. Un composé ayant une CML de 10 $\mu\text{g/mL}$ est considéré comme intéressant. Les extraits DCM et EtOH présentent donc une activité modérée, et l'isolement des composés anti-trypanosome ne sera pas envisagé au cours de cette étude (Tableau 7).

extraits	EP	DCM	ACN	EtOH	MeOH
CMT ($\mu\text{g/mL}$)	25	12,5	25	12,5	12,5

Tableau 7 : Evaluation de la CML des extraits de *G. capense*

3.4.3.2. Activité anti-leishmanienne

Les extraits sont testés à 50 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats montrent que les extraits DCM et EP présentent une activité non négligeable, avec une IC_{50} de 27,05 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait EP et de 24,07 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait DCM (IC_{50} amphotéricine B = 0,04 μM) (Tableau 8). Il serait intéressant d'étudier plus précèlement cette activité.

extraits	EP	DCM	ACN	EtOH	MeOH
% parasites tués	50,4	71,8	13,2	25,7	36,3

Tableau 8 : Evaluation de l'activité sur parasites responsables de la leishmaniose

3.4.4. Les essais antifongiques sur *Candida albicans* : Etape D

Les extraits EP, DCM, ACN, EtOH, et MeOH ont été testés sur une souche de *Candida albicans* par la technique de microdilution sur plaque. Aucun extrait ne présente une activité antifongique à 250 $\mu\text{g/mL}$. La concentration minimale inhibitrice est donc supérieure à cette valeur, ce qui indique que *G. capense* ne présente pas d'intérêt en tant qu'antifongique.

4. Conclusion et perspectives

Ce travail, réalisé au sein du laboratoire de chimie des substances naturelles de la faculté de Pharmacie de Paris Sud 11 dans le cadre du stage de Master 2 recherche « Produits naturels : isolement et analyse structurale » s'inscrit dans une thématique de criblage bioguidée d'un champignon : *Ganoderma capense* pour une activité inhibitrice de la protéine ABCB1.

Ce champignon est très utilisé en médecine traditionnelle orientale notamment chinoise comme promoteur de longévité et est présenté comme capable de prévenir et guérir de nombreuses maladies. Chimiquement connu, *G. capense* possède de nombreuses activités biologiques notamment antitumorales et immunostimulantes grâce à ses triterpènes et ses polysaccharides.

Etant donnée l'activité cytotoxique déjà décrite dans la littérature pour ce champignon, l'étude d'une activité inhibitrice sur ABCB1 semble intéressante afin d'évaluer un effet synergique possible entre plusieurs molécules capables d'agir sur différentes cibles dans un même but thérapeutique. A l'heure où aucun inhibiteur de MDR extrait ou synthétisé n'a donné de bons résultats cliniques, étudier ce champignon et évaluer son activité sur ABCB1 présente une certaine pertinence.

Les résultats obtenus durant ce stage ont permis de démontrer que *G. capense* possède une activité inhibitrice d'ABCB1. En effet, le criblage biologique de ce champignon par l'essai fluorimétrique à la rhodamine 123, a permis d'orienter les études chimiques sur les extraits DCM et ACN actifs.

De l'extrait DCM ont été extraits trois acides ganodériques A, H et F identifiés grâce à la spectrométrie de masse et la RMN à 400 MHz. Les études biologiques des deux premiers acides n'ont pas conduit aux mêmes résultats. En effet, l'acide ganodérique A a présenté une activité inhibitrice d'ABCB1 significative contrairement à l'acide ganodérique H qui s'est avéré ne pas posséder d'activité. Des essais d'inhibition d'ABCB1 sur ces deux composés doivent être réitérés afin de confirmer ces résultats. Il est intéressant de noter que les composés anioniques sont de mauvais substrats de la protéine ABCB1 et sont connus pour ne pas être de bons candidats à un efflux. Par conséquent, le mécanisme d'action des acides

ganodériques actifs est vraisemblablement allostérique, par exemple en interagissant avec une partie de la protéine abcb-1 proche de la membrane. Par ailleurs, il est intéressant de constater des activités biologiques différentes pour ces deux molécules, qui ne diffèrent que par un groupement acétoxy en position C₁₂. Dans le cas où ces résultats seraient confirmés, une étude structure-activité des acides ganodériques serait alors intéressante, mettant en évidence l'importance de la non acétylation en position C₁₂ de ces acides pour présenter une activité biologique.

L'étude biologique inhibitrice d'ABCB1 de l'acide ganodérique F extrait reste à réaliser de même que l'extraction d'autres triterpènes, présents dans l'extrait DCM, actifs sur ABCB1 (F4 et F8).

L'étude de l'extrait ACN montre qu'il est également actif sur ABCB1. Dans un premier temps, une extraction liquide-liquide a permis de séparer les composés polaires présents dans l'échantillon (phase aqueuse) des composés moins polaires (phase organique). Biologiquement, ces deux fractions se sont avérées actives sur ABCB1 ne permettant pas d'orienter les recherches préférentiellement sur l'une ou l'autre des deux fractions.

Une séparation par chromatographie de partage centrifuge a été entreprise sur la phase aqueuse afin d'obtenir des composés purs. À ce stade, un composé a été isolé de cet extrait. Sa structure et son activité sur ABCB1 doivent être déterminées.

Le but de cette étude étant de trouver un ou des inhibiteurs d'ABCB1, l'extraction d'autres composés à partir des deux extraits actifs ACN (phase organique) et DCM doivent se poursuivre d'autant plus que les résultats semblent encourageants.

Cette étude met d'ores et déjà en valeur la présence de composés capables d'inhiber ABCB1 comme l'acide ganodérique A. Ces composés, déjà décrits comme anticancéreux dans la littérature scientifique, présentent donc un double intérêt en agissant non seulement directement sur certaines cellules cancéreuses, mais également, en participant à l'inhibition d'ABCB1 responsable du phénomène de MDR récurrent dans les chimiothérapies.

CONCLUSION

D'après la littérature, les champignons du genre *Ganoderma* possèdent de nombreux triperpènes originaux et des polysaccharides décrits comme ayant une activité anticancéreuse et immunostimulante intéressante. Evaluer son activité en tant que modulateur de transporteurs d'efflux et plus particulièrement comme inhibiteur d'ABCB1 permettrait non seulement de valider son utilisation traditionnelle mais également de mettre en évidence un possible effet de synergie avec les composés anticancéreux.

Agir simultanément sur plusieurs cibles thérapeutiques, est un des mécanismes de synergie déjà connu et utilisé. C'est le cas, par exemple, lorsque des antibiotiques sont combinés avec des agents capables de supprimer partiellement ou totalement les mécanismes de résistance des bactéries. Le meilleur exemple reste la combinaison de pénicilline avec l'acide clavulanique qui permet de lutter contre la résistance aux pénicillinases. Pour rester dans le domaine de la phytochimie, *Hydnocarpus wightiana* (Flacourtiaceae) possède un alcaloïde : la berbérine qui agit faiblement comme antibiotique et un flavolignane : le 5'-methoxy-hydrocarpine dépourvu d'activité antimicrobienne. Le composé phénolique est capable d'augmenter l'effet de l'alcaloïde en inhibant totalement son efflux par *Staphylococcus aureus*, éliminant ainsi le phénotype MDR des bactéries (Wagner & Ulrich-Merzenich 2009).

Ce modèle de synergie est applicable aux phénomènes de MDR dans les cancers. Ainsi, associer un inhibiteur de MDR aux chimiothérapies permettrait d'une part de diminuer les doses des cytotoxiques administrés tout en restant pharmacologiquement actifs sur les tumeurs, et d'autre part de diminuer les nombreux effets indésirables liés à la prise de ces médicaments.

Néanmoins, il n'existe toujours pas de molécules utilisées en clinique comme inhibitrice de MDR à ce jour. La recherche est donc nécessaire. Etudier les plantes possédant une activité anticancéreuse et utilisées en médecine traditionnelle comme promoteur de longévité semble une approche pertinente.

Il ne faut pas perdre de vue le fait que d'autres protéines sont impliquées dans le phénomène de MDR comme par exemple ABCC1 ou ABCG4. Elucider leur mécanisme

d'action et rechercher des inhibiteurs spécifiques de ces pompes à efflux permettraient de mieux comprendre le phénomène MDR.

Dans le futur, il sera certainement possible d'avoir accès à la carte d'identité génétique de chaque patient atteint d'un cancer. Il serait alors intéressant de déterminer le traitement approprié pour chaque patient afin que tous voient leur chance de guérison augmenter.

L'association des chimistes, des biologistes et des médecins est nécessaire pour la découverte des futurs outils thérapeutiques qui permettront d'établir des traitements personnalisés et de guérir les malades atteints d'un cancer.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambudkar, S.V., Kim, I. & Sauna, Z.E., 2006. The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5), 392-400.
- Araújo, C.C. & Leon, L.L., 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 723-728.
- Au, T.K., Chick, W.S.H. & Leung, P.C., 2000. The biology of ophiobolins. *Life Sciences*, 67(7), 733-742.
- Bailey, H. et al., 2008. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 62(1), 149-157.
- Balunas, M.J. & Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431-441.
- Banerjee, S. et al., 2008. Efficacy of selected natural products as therapeutic agents against cancer. *Journal of Natural Products*, 71(3), 492-496.
- Bhardwaj, R.K. et al., 2002. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(2), 645-650.
- Bohuon, C. & Monneret, C., 2009. *Fabuleux hasards : Histoire de la découverte des médicaments*, EDP SCIENCES.
- Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*, Tec & Doc Lavoisier.
- Calvo, F. & Mourah, S., 2002. La résistance des tumeurs du sein aux traitements anticancéreux. *Médecine nucléaire*, 26(1), 51-57.
- Chen, N. & Zhong, J., 2009. Ganoderic acid Me induces G1 arrest in wild-type p53 human tumor cells while G1/S transition arrest in p53-null cells. *Process Biochemistry*, 44(8), 928-933.
- Choi, C., 2005. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 5, 30.
- clinicaltrials.gov, 2010. <http://clinicaltrials.gov>.
- Coley, H.M., 2008. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 34(4), 378-390.
- Conlin, A. et al., 2007. Ixabepilone. *Nat Rev Drug Discov*, 6(12), 953-954.

- Cragg, G.M. & Newman, D.J., 2004. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *Journal of Natural Products*, 67(2), 232-244.
- Cragg, G.M. & Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 72-79.
- Da Rocha, A.B., Lopes, R.M. & Schwartzmann, G., 2001. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(4), 364-369.
- EMA, 2010. European Medicines agency. www.ema.europa.eu.
- Felipin, F. & Lebreton, J., 2004. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. *Tetrahedron*, 60(45), 10127-10153.
- Fenical, W. et al., 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(6), 2175-2180.
- Fu, L.W. et al., 2002. The multidrug resistance of tumour cells was reversed by tetrandrine *in vitro* and in xenografts derived from human breast adenocarcinoma MCF-7/adr cells. *European Journal of Cancer*, 38(3), 418-426.
- Gillet, J., Efferth, T. & Remacle, J., 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775(2), 237-262.
- Goetz, P., 2004. Mode d'emploi du ginseng et d'autres adaptogènes. *Phytothérapie*, 2(4), 113-116.
- Goldwasser, F., 2007. Les poisons des topo-isomérases I. *Oncologie*, 9(11), 758-765.
- Gottesman, M.M., Pastan, I. & Ambudkar, S.V., 1996. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(5), 610-617.
- Hande, K.R., 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1514-1521.
- Hill, C., Doyon, F. & Mousannif, A., 2009. *Évolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 2006*, Institut de veille sanitaire.
- Hou, X. et al., 2008. Curcuma drugs and curcumin regulate the expression and function of P-gp in Caco-2 cells in completely opposite ways. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1-2), 224-229.
- Huang, T.H. et al., 2007. Specific reversal of multidrug resistance to colchicine in CEM/VLB(100) cells by *Gynostemma pentaphyllum* extract. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(12), 830-839.

- Huls, M., Russel, F.G.M. & Masereeuw, R., 2009. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(1), 3-9.
- Jakobsen, C.M. et al., 2001. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(26), 4696-4703.
- Jiao, W. et al., 2009. Lathyrane diterpenes from *Euphorbia lathyris* as modulators of multidrug resistance and their crystal structures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(13), 4786-4792.
- Jimeno, J. et al., 2004. New Marine Derived Anticancer Therapeutics — A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Marine Drugs*, 2(1), 14-29.
- Jodoin, J., Demeule, M. & Béliveau, R., 2002. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1542(1-3), 149-159.
- Johri, R.K. & Zutshi, U., 1992. An Ayurvedic formulation "Trikatu" and its constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(2), 85-91.
- Kim, S. et al., 2003. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg3. *Biochemical Pharmacology*, 65(1), 75-82.
- Ko, H. et al., 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69(1), 234-239.
- Kobayashi, J. et al., 1997. Effects of taxoids from *Taxus cuspidata* on microtubule depolymerization and vincristine accumulation in MDR cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7(4), 393-398.
- Kobayashi, J. et al., 1998. Modulation of multidrug resistance by taxuspine C and other taxoids from Japanese yew. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8(12), 1555-1558.
- Lage, H., 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(3), 188-199.
- Ma, Y. & Wink, M., 2008. Lobeline, a piperidine alkaloid from *Lobelia* can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. *Phytomedicine*, 15(9), 754-758.
- Mayer, A.M. & Gustafson, K.R., 2008. Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 44(16), 2357-2387.
- McDevitt, C.A. & Callaghan, R., 2007. How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacology & Therapeutics*, 113(2), 429-441.
- Mi, Q. et al., 2002. Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. *Cancer Letters*, 184(1), 13-20.

- Mi, Q. et al., 2001. Pervilleine A, a novel tropane alkaloid that reverses the multidrug-resistance phenotype. *Cancer Research*, 61(10), 4030-4037.
- Mohanakumara, P. et al., 2010. *Dysoxylum binectariferum* (Meliaceae), a rich source of rohitukine. *Fitoterapia*, 81(2), 145-148.
- Ngai, P.H. & Ng, T., 2004. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(4), 988-993.
- Nguyen, V.T.B. et al., 2009. Selective modulation of P-glycoprotein activity by steroidal saponines from *Paris polyphylla*. *Fitoterapia*, 80(1), 39-42.
- Nobili, S. et al., 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59(6), 365-378.
- Ozben, T., 2006. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters*, 580(12), 2903-2909.
- Pan, L., Chai, H. & Kinghorn, A.D., 2010. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemistry Letters*, 3(1), 1-8.
- Pardo, B. et al., 2008. Phase I clinical and pharmacokinetic study of kahalalide F administered weekly as a 1 hour infusion to patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 14(4), 1116-1123.
- Ramalhete, C. et al., 2009. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(19), 6942-6951.
- Robert, J., 2007. Les poisons du fuseau. *Oncologie*, 9(11), 766-772.
- Russell, 2006. Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985-2001.
- Sato, N. et al., 2009. Triterpene-farnesyl hydroquinone conjugates from *Ganoderma sinense*. *Journal of Natural Products*, 72(5), 958-961.
- Shah, J.C., Chen, J.R. & Chow, D., 1989. Preformulation study of etoposide: identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide. *Pharmaceutical Research*, 6(5), 408-412.
- Simmons, T.L. et al., 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333-342.
- Smith, A.B. & Freeze, B.S., 2008. (+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation. *Tetrahedron*, 64(2), 261-298.

Srivastava, V. et al., 2005. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(21), 5892-5908.

Sun, Cui & Qu, 2009. Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on research of natural products. *Drugs of the Future*, 34(1), 53-59.

Sunila, E.S. & Kuttan, G., 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3), 339-346.

Teodori, E. et al., 2002. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Il Farmaco*, 57(5), 385-415.

Theodoulou, F.L., 2000. Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2), 79-103.

Vidal, 2010. *Vidal 2010* 86 éd.,

Wagner, H. & Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97-110.

Wang, G. et al., 2007. Enhancement of IL-2 and IFN- γ expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo. *International Immunopharmacology*, 7(6), 864-870.

Yin, F., Hu, L. & Pan, R., 2004. Novel dammarane-type glycosides from *Gynostemma pentaphyllum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52(12), 1440-1444.

Yoshida, N. et al., 2006. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by terpenoids contained in herbal medicines and natural products. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12), 2033-2039.

Yoshida, N. et al., 2005. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by extracts of and monoterpenoids contained in *Zanthoxyl Fructus*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(2), 167-173.

Zhou, Lim, L.Y. & Chowbay, B., 2004. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metabolism Reviews*, 36(1), 57-104.

Zhou, X. et al., 2007. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(4), 559-574.

ANNEXE 1



Aplidium albicans (Polyclinidae)¹⁰



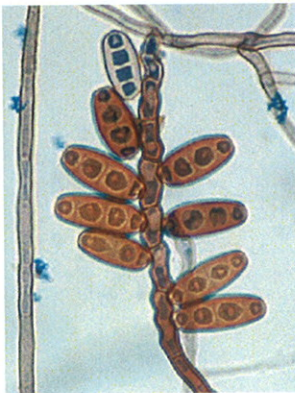
Camellia sinensis (Theaceae)¹³



Betula sp. (Betulaceae)¹¹



Camptotheca acuminata (Nyssaceae)¹⁴



Bipolaris sp. (Dematiaceae)¹²



Catharanthus roseus (Apocynaceae)¹⁵

¹⁰http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=384
Consulté le 12/09/2010

¹¹http://www.florelaurentienne.com/flore/NotesUsages/images/Betula_papyrifera_007_350.jpg (à gauche)
<http://www.speloncato.com/images/bouleau2.jpg>
Consulté le 08/09/2010 (à droite)

¹²http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptors/Hyphomycetes_%28dematiaceous%29/Bipolaris/
Consulté le 12/09/2010

¹³http://www.gymnosperms.org/users/dws/10_6_06_3/CameliaSinensis/CameliaSinensis7.JPG Consulté le 12/09/2010

¹⁴http://www.bh-froe.com/ZC/images/camptotheca_acuminata1.jpg Consulté le 03/09/2010

¹⁵ http://www.biologie.uni-regensburg.de/Botanik/Schoenfelder/kanaren/images/Catharanthus_roseus.jpg
Consulté le 02/09/2010



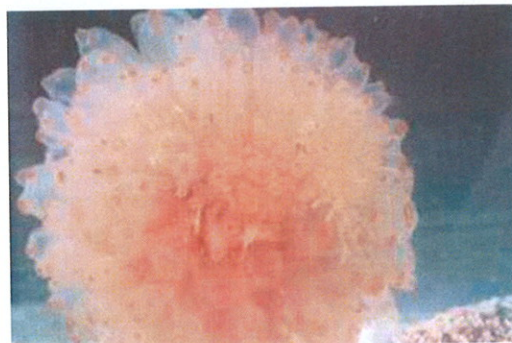
Cephalotaxus harringtonia (Cephalotaxaceae)¹⁶



Curcuma longa (Zingiberaceae)¹⁹



Citrus x paradisi (Rutaceae)¹⁷



Ecteinascidia turbinata (Perophoridae)²⁰



Combretum caffer (Combretaceae)¹⁸



Euphorbia lathyris (Euphorbiaceae)²¹

¹⁶http://www.jardindupicvert.com/4daction/w_partner/pin_japonais_queue_vache_cephalotaxus_harringtonia.4837 Consulté le 03/09/2010

¹⁷http://www.anniesremedy.com/images/oils/iStock_grapefruit.jpg Consulté le 12/09/2010

¹⁸http://www.sunshinseeds.de/thumbs/combretum_caffer.jpg Consulté le 02/09/2010

¹⁹<http://media-2.web.britannica.com/eb-media/35/39835-004-A1C7FE47.jpg> et <http://medsource.fr/uploads/assets/curcuma1.jpg> Consultés le 12/09/2010

²⁰<http://www.nature.com/nbt/journal/v21/n10/images/nbt880-11.jpg>

²¹http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:%C3%89purge_feuilles01.jpg Consulté le 12/09/2010



Gynostemma pentaphyllum (Cucurbitaceae)²²



Momordica balsamina (Cucurbitaceae)²⁵



Halichondria okadai (Halichondriidae)²³



Panax ginseng (Araliaceae)²⁶



Lobelia inflata (Lobeliaceae)²⁴



Paris polyphylla (Trilliaceae)²⁷

²²<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shoyaku/photo/Japan/Gunma/020812gokiduru2.jpg> Consulté le 12/09/2010

²³<http://kanagawa-yc.jp/sizen/kuroisokaimen2.jpg> Consulté le 12/09/2010

²⁴http://www.homeopathyandmore.com/med_images/LOBELIA_INFLATA.jpg Consulté le 12/09/2010

²⁵http://www.ethnopharmacologia.org/photoprelude/Momordica_balsamina2.jpg Consulté le 12/09/2010

²⁶<http://www.livingtouch.com/images/2007/ginseng.jpg> Consulté le 12/09/2010

²⁷http://farm4.static.flickr.com/3044/2769648816_44c5b8ddc9.jpg?v=0 Consulté le 12/09/2010



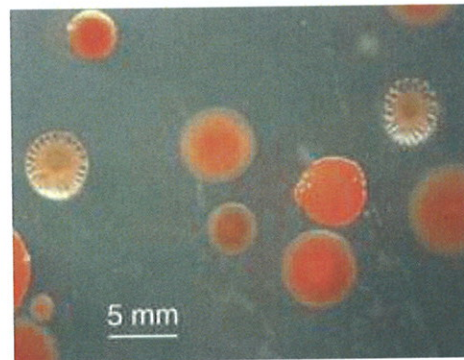
Piper nigrum (Piperaceae)²⁸



Silybum marianum (Asteraceae)³¹



Podophyllum peltatum (Berberidaceae)²⁹



Sorangium cellulosum (Polyangiaceae)³²



Raphanus sativus (Brassicaceae)³⁰



Stephania tetrandra (Menispermaceae)³³

²⁸<http://media-2.web.britannica.com/eb-media/95/118195-004-4294A180.jpg> Consulté le 12/09/2010

²⁹<http://en.wikipedia.org/wiki/File:PoisonousMayApple099.jpg> Consulté le 02/09/2010

³⁰http://database.prota.org/PROTAhtml/Raphanus%20sativus_Fr.htm Consulté le 12/09/2010

³¹http://en.wikivisual.com/images/4/4f/Silybum_marianum.jpg Consulté le 12/09/2010

³²<http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/EN/funding.did=68142.html> Consulté le 12/09/2010

³³<http://www.rchm.co.uk/Photographs/Stephania.jpg> Consulté le 12/09/2010



Tabebuia avellanedae (Bignoniaceae)³⁴



Taxus brevifolia (Taxaceae)³⁵



Trididemnum solidum (Didemnidae)³⁶

³⁴<http://fr.wikipedia.org/wiki/Lapacho>
Consulté le 03/09/2010

³⁵<http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:TXbaccata.jpg>
Consulté le 02/09/2010

³⁶http://seanet.stanford.edu/Urochordata/trididem_spp580.jpg
Consulté le 15/09/2010

ANNEXE 2

Expression of ABC transporters in normal tissues:

Members: symbol(s)	Location	Transcript length	Genbank Accession no. (mRNA)	Protein ^a	Primary Acc. ^b	Expression	Function
Sub-family A/ABC1 [4-5]							
ABC A1/ABC1/CERP/TGD	9q31.1	10412 bp	NM_005502	2261 AA/ 254,286 Da	Q95477	Ubiquitous	Cholesterol efflux to HDL [6-10]
ABC A2/ABC2/STGD	9q34.3	8172 bp	NM_001606	2436 AA/ 269,974 Da	Q9BZC7	Brain, kidney, lung, heart	Drug resistance, role in macrophage lipid metabolism and neural development, trafficking of LDL [11-14]
ABC A3/ABC3	16p13.3	6623 bp	NM_001089	1704 AA/ 191,362 Da	Q99758	Lung, lamellar bodies in type II cells	Surfactant secretion, implication in MDR suggested [15-17]
ABC A4/ABC4	1p21.3	7326 bp	NM_000350	2273 AA/ 255,944 Da	P78363	Roof and cone photoreceptors	N-Retynylidene-PE efflux [18-20]
ABC A5/ABC5	17q24.3	7644 bp	NM_018672	1642 AA/ 186,508 Da	Q9WVZ7	Brain, lung, heart, and thyroid gland, lysosomes and late endosomes	Unknown yet. Importance in cardiomyocytes and follicular cells. Relationship suggested with lysosomal diseases, including DCM (dilated cardiomyopathy) [21,22]
ABC A6	17q24.3	5296 bp	NM_080284	1617 AA/ 184,286 Da	Q8N139	Ubiquitous, highest expression in liver, lung, heart and brain	Potentially involved in macrophage lipid homeostasis [23]
ABC A7/ABCX	19p13.3	6704 bp	NM_019112	2146 AA/ 234,364 Da	Q8LZY2	Spleen, thymus, bone marrow, peritoneal leukocytes	Mediates apolipoprotein-derived generation of HDL, role in the clearance of apoptotic cells [24-26]
ABC A8	17q24.3	5736 bp	NM_007168	1581 AA/ 179,245 Da	Q94911	In most organs, especially in heart skeletal muscle, and liver	Function unknown [27]
ABC A9	17q24.3	6310 bp	NM_080283	1624 AA/ 184,362 Da	Q8TUA7	Heart, brain, fetal tissue	Likely involved in mosaic to different differentiation and macrophage lipid homeostasis [28]
ABC A10	17q24.3	6348 bp	NM_080282	1543 AA/ 175,746 Da	Q9WVZ4	Heart, brain, gastro-intestinal tract, monocytes	Involvement suggested in macrophage lipid homeostasis [29]
ABC A12	2q34	8067 bp	NM_015687	2595 AA/ 293,251 Da	Q96LX0	Lamellar granules and lamellar bodies	Lipid metabolism, see references Table 2 [30]
ABC A13	7p12.3	17268 bp	NM_152761	5058 AA/ 576,239 Da	Q96LX4	Human trachea, testes, bone marrow	By chromosomal position and expression pattern, this gene is a candidate for several pathologies such as Shwachman-Diamond syndrome and cancers (CNS, prostate, leukemias) [31]

Expression of ABC transporters in normal tissues

Members: symbol/alias	Location	Transcript length	Genbank Accession no. (mRNA)	Protein ^a	Primary Acc. ^b	Expression	Function
Sub-family B/MDR-TAP ABC B1/MDR1P-gpPgly1	7q21.12	4872 bp	NM_000927	1280 AA/ 141,463 Da	P08183	Many tissues especially those with barrier functions: liver, BBB, kidney, intestine, placenta, apical membranes Most cells, ER (Endoplasmic Reticulum)	Multidrug resistance. Provide protection against hydrophobic xenobiotics [32-34] Peptide transport [35,36]
ABC B2/TAP1	6p21.3	2974 bp	NM_000593	748 AA/ 80,965 Da	Q03518	Most cells, ER	Peptide transport [35,37]
ABC B3/TAP2	6p21.3	5679 bp	NM_000544	686 AA/ 75,664 Da	Q03519	Liver, apical membranes	Phosphatidylcholine transport [38,39]
ABC B4/MDR2-3PFC3PGY3	2q21.12	3967 bp	NM_000443	1279 AA/ 140,682 Da	P21439	Testes, breast, melanocytes, melanomas	Drug resistance, membrane potential and regulator of cell fusion in physiologic skin progenitor cells, melanomas [40-43]
ABC B5	7p21.1	2908 bp	NM_178559	812 AA/ 89,831 Da	Q2MGG0		Heme transport and biosynthesis [44,45]
ABC B6/MTABC3	2q36	2893 bp	NM_005689	842 AA/ 93,886 Da	Q9NP58	Mitochondria	Fe/S cluster transport, biosynthesis of heme, essential for hemoglobinosis [46-48]
ABC B7/ABC7 (Aml p	Xq12-q13	2464 bp	NM_004299	752 AA/ 82,641 Da	Q75027	Mitochondria	Function not determined yet. This protein may also play a role in the transport of phospholipids, heme as well as peptides [49,50]
ABC B8/ABC1	7q36.1	2439 bp	NM_007188	735 AA/ 79,948 Da	Q9NLT2	Mitochondria	Peptide transport [51-53]
ABC B9/TAPL	12q24.31	3377 bp	NM_019624	766 AA	Q9NP78	Testes, moderately in the brain and spinal	
ABC B10/MTABC2	1q42.13	3857 bp	NM_012089	738 AA/ 79,099 Da	Q9NRK6	Mitochondria	Heme biosynthesis [50,54-56]
ABC B11/BSEP/PFIC2/SPEP	2q24.3	4775 bp	NM_003742	1321 AA/ 146,393 Da	O95342	Liver	Bile salt transport [57-59]

Expression of ABC transporters in normal tissues						
Members: symbol/alias	Location	Transcript length	Genbank Accession no. (mRNA)	Protein ^a	Primary Acc ^b	Expression
Sub-family C/MRP ABC C1MRP1	6p13.12	5927 bp	NM_004996	1531 AA/ 171,561 Da	P33527	Lung, testes. Peripheral Blood Mononuclear Cell, lateral membrane
ABC C2MRP2/CMOAT	16q24.2	4930 bp	NM_000592	1545 AA/ 174,191 Da	Q92887	Liver, intestine, kidney, apical membrane
ABC C3MRP3/CMOAT2	17q21.33	3176 bp	NM_003786	1327 AA/ 169,343 Da	O15438	Lung, intestine, liver, kidney, lateral membrane
ABC C4MRP4/MOATB	13q32.1	5871 bp	NM_005845	1325 AA/ 149,541 Da	O15439	Many tissues
ABC C5MRP5/MOATC	5q27.1	5851 bp	NM_005868	1437 AA/ 160,660 Da	O15440	Many tissues
ABC C6MRP6/MOATPNE	16p13.12	5111 bp	NM_001171	1503 AA/ 164,904 Da	O95255	Kidney, liver, lateral membranes
ABC C7CFTR	7q31.31	6132 bp	NM_000492	1480 AA/ 168,174 Da	P13569	Exocrine tissues, apical membranes
ABC C8SUR1	11p15.1	4980 bp	NM_000352	1580 AA/ 176,891 Da	Q06428	Pancreas
ABC C9SUR2	12p12.1	4670 bp	NM_005691	1549 AA/ 174,260 Da	O60786	Skeletal muscle, heart
ABC C10MRP7	6p21.1	5118 bp	NM_003429	1492 AA/ 161,629 Da	Q5TBU5	Low in all tissues except pancreas
ABC C11MRP8	16q12.1	4576 bp	NM_002583	1382 AA/ 154,301 Da	Q94466	Low in all tissues except kidney, spleen, colon, brain
ABC C12MRP9	16q12.1	5168 bp	NM_003226	1359 AA/ 152,244 Da	Q96365	Breast, testes (4.5 kb transcript), brain, skeletal, and ovary (1.3 kb transcript) [96]
ABC C13PREP6	21q 11.2	Pseudogene	Seq. suppressed			
Sub-family D/ALD [97] ABC D1ALD1/ALDP	Xq28	3616 bp	NM_000033	745 AA/ 82,937 Da	P33897	Peroxisomes
ABC D2ALD2/ALDR	12q11	3669 bp	NM_005164	740 AA/ 81,233 Da	Q94BJ2	Peroxisomes
ABC D3PMP1/PMP70	1p22.1	3423 bp	NM_002458	659 AA/ 75,478 Da	P28288	Peroxisomes
ABC D4PMP6/PMP1L	14q24.3	3149 bp	NM_005050	688 AA/ 68,596 Da	O14678	Peroxisomes
Sub-family E/OABP ABC E1RLRN5/HRP88	4q31.31	4184 bp	NM_002940	599 AA/ 67,314 Da	P01221	Ubiquitous

Drug resistance, organic anion transporter involved in inflammation mediated by LTC₄ release for excellent reviews [60,61]

Drug resistance, organic anion efflux including bile salt transport [62-65]

Drug resistance, organic anion efflux including bile salts [66-70]

Drug resistance, organic anion efflux including bile acids and salts [71-73]

Drug resistance, organic anion efflux [74,75]

Drug resistance, physiological function undetermined [76-79]

Chloride ion channel [80-84]

Sulfonyl urea receptor, modulator of ATP-sensitive K⁺ channels and insulin release; see for review [85]

K(ATP) channel regulation [85]

Drug resistance, E2(1)PhenG transport [86-89]

E2(1)PhenG, steroid sulfates, glutathione conjugates and monoamine bile acids [89-93]

Function unknown. Potential target for the immunotherapy of breast cancer [89,93-95]

VLCFA transport regulation [98-100]

Function unknown. Modify the ALD phenotype. [99,101,102]

Peroxisome biogenesis [103-104]

Function not determined yet. May modify the ALD phenotype. May also play a role in the process of peroxisome biogenesis [105,106]

Inhibitor of RNase L, required for the assembly of HIV-1 and other lentiviruses, role in the initiation of translation [107-111]

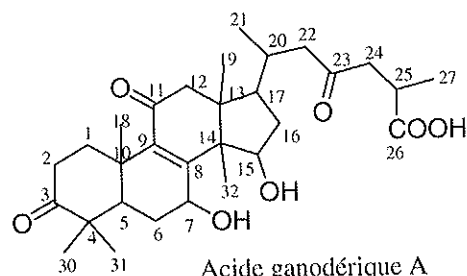
Expression of ABC transporters in normal tissues

Members: symbol/alias	Location	Transcript length	Genbank Accession no. (mRNA)	Protein ^a	Primary Acc ^b	Expression	Function
Sub-family F/G/C/N/O							
ABC F1/ABC50	6p21.1	3474 bp	NM_001025094	845 AA/ 95,926 Da	Q8NE71	Ubiquitous	mRNA translation [109,112,113]
ABC F2	7q36.1	3552 bp	NM_007189	623 AA/ 71,290 Da	Q9UG63	Ubiquitous	mRNA translation [109]
ABC F3	3q27.1	2547 bp	NM_018358	769 AA/ 79,745 Da	Q9NUQ8	Ubiquitous	mRNA translation [109]
Sub-family G/WHITE [114]							
ABC G1/WHITE1	21q22.3	3498 bp	NM_007630	678 AA/ 75,592 Da	P48844	Brain, spleen, lung, liver, macrophages	Cholesterol efflux to HDL and tissue lipid homeostasis [115-117]
ABC G2/BCRPMXR/ABCP	4q22	4445 bp	NM_004827	655 AA/ 72,314 Da	Q9UNQ0	Placenta, intestine, liver, breast, apical membranes	Drug resistance, Riboflavin (vitamin B2) pump, heme efflux [118-120]
ABC G3	No human gene has been found until now						
ABC G4/WHITE2	11q23	3874 bp	NM_022169	646 AA/ 71,896 Da	Q9H172	Macrophage, brain, eye, spleen	Cholesterol efflux to HDL [117,121,122]
ABC G5/Steroin 1	2p21	2740 bp	NM_022436	673 AA/ 75,679 Da	Q9H221	Liver, small intestine	Sterol transport [38,123]
ABC G8/Steroin	2p21	2679 bp	NM_022437	673 AA/ 75,679 Da	Q9H221	Liver, small intestine	Sterol 2 transport [38,123]

^a This is the length and the molecular weight of the unprocessed precursor.

^b <http://ca.expasy.org/uniprot>.

ANNEXE 3



Dans CDCl₃ à 400 MHz

position	1H (ppm)	J (Hz)	JMOD/HMQC
1	1,45 m	-	35,6 Cs
	2,85 m	-	
2	2,47 m	-	34,3 Cs
3			217,1 Cq
4			46,8 Cq
5	1,68 m	-	48,9 Ct
6	1,68 m	-	28,9 Cs
	2,02 m	-	
7	4,62 s like	-	68,9 Ct
8			159,2 Cq
9			140,3 Cq
10			38,0 Cq
11			199,7 Cq
12 α	2,76 d like	16	51,7 Cs
12 β	2,50 m	-	
13			46,7 Cq
14			53,9 Cq
15	4,79 s like	-	72,5 Ct
16	1,84 m	-	36,2 Cs
17	-	-	47,8 Ct
18	0,97 s		16,9 Cp
19	1,28 s		19,3 Cp
20	2,02 m	-	32,6 Ct
21	0,90 d	4,8	19,7 Cp
22	2,40 m	-	49,5 Cs
23			208,8 Cq
24	2,43 m	-	46,5 Cs
	2,86 m	-	
25	2,95 s like	-	34,6 Ct
26			180,3 Cq
27	1,23 d	6,4	17,1 Cp
30	1,11 s		27,2 Cp
31	1,10 s		20,7 Cp
32	1,25 s		19,6 Cp

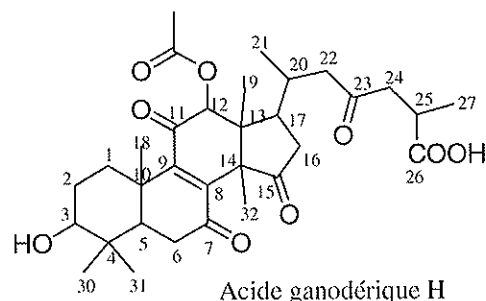
position	1H (ppm)	J (Hz)	JMOD/HMQC
1 α	1,46 dt	14; 8	35,5 Cs
1 β	2,85 dt	14; 7	
2	2,45 dd	8; 7	34,3 Cs
3			217,4 Cq
4			46,8 Cq
5	1,67 m	-	48,7 Ct
6 α	1,69 m	-	29,0 Cs
6 β	2,06 m	-	
7	4,62 dd	10; 6,2	68,9 Ct
8			159,3 Cq
9			140,1 Cq
10			38,0 Cq
11			199,6 Cq
12 α	2,75 d like	16	51,7 Cs
12 β	2,50 d	16	
13			46,6 Cq
14			54,0 Cq
15	4,8 t like	8	72,4 Ct
16	1,82 m	-	36,2 Cs
17	1,83 m	-	48,1 Ct
18	0,99 s		17,3 Cp
19	1,28 s		19,4 Cp
20	2,02 m	-	32,7 Ct
21	0,89 d	6,5	19,6 Cp
22	2,26 dd	16,5; 9,2	49,7 Cs
22	2,40 dd	16,5; 2,8	
23			208,7 Cq
24	2,46 dd	17,5 ; 5	46,8 Cs
24	2,83 dd	17,5; 8,5	
25	2,95 dqd	8,5 ; 7; 5,5	34,6 Ct
26			176,3 Cq
27	1,18 d	7	17,1 Cp
30	1,12 s		27,4 Cp
31	1,10 s		20,7 Cp
32	1,26 s		19,5 Cp

a)

b)

Comparatif des spectres RMN de l'acide ganodérique H expérimentaux (a) et publiés dans la littérature (b) (Kikuchi, Kanomi et al. 1986)

ANNEXE 4



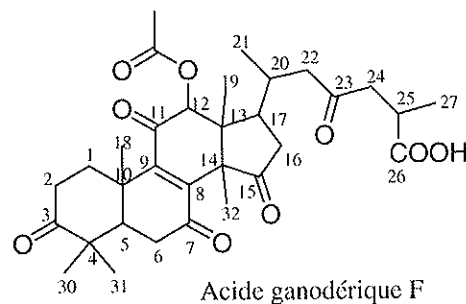
Dans CDCl₃ à 400 MHz

position	1H (ppm)	J (Hz)	JMOD/HMBC
1	2,70 m	-	33,2 Cs
	1,15 m	-	
2	1,66 m	-	27,2 Cs
3	3,24 dd	10 ; 5,2	77,4 Ct
4			40,3 Cq
5	1,54 dd	2 ; 14,4	51,3 Ct
6	2,64 t	14,4	36,5 Cs
	2,57 m	-	
7			198,9 Cq
8			145,7 Cq
9			151,7 Cq
10			39,0 Cq
11			193,9 Cq
12	5,60 s		79,1 Ct
12-OCOCH ₃			170,2 Cq
12-OCOCH ₃	2,22 s		20,8 Cp
13			47,9 Cq
14			58,4 Cq
15			205,8 Cq
16	2,74 dd	18 ; 8,8	37,8 Cs
	1,89 dd	18 ; 8	
17	2,52 m	-	44,6 Ct
18	0,79 s		12,1 Cp
19	1,31 s		17,9 Cp
20	2,30 m	-	29,3 Ct
21	0,958 d	5,6	21,7 Cp
22	2,42 m	-	48,3 Cs
	2,30 m	-	
23			207,5 Cq
24	2,79 dd	18 ; 8,4	46,3 Cs
	2,42	18,4 ; 5,2	
25	2,94 m	7,2 ; 14,4	34,4 Ct
26			180,1 Cq
27	1,19 d	7,2	16,9 Cp
30	1,00 s		27,8 Cp
31	0,86 s		15,5 Cp
32	1,70 s		21,2 Cp

position	1H (ppm)	J (Hz)	JMOD/HMBC
1 α	1,18 td	13 ; 5	33,2 Cs
1 β	2,73 dt	13,5 ; 4	
2 α	1,67 tt like	-	27,3 Cs
2 β	1,74 m	-	
3	3,26 dd	11 ; 5	77,3 Ct
4			40,4 Cq
5	1,56 dd	14,5 ; 2,5	51,4 Ct
6 α	2,58 dd	14 ; 2,5	36,6 Cs
6 β	2,68 t	14	
7			198,5 Cq
8			151,6 Cq
9			145,7 Cq
10			39,1 Cq
11			193,9 Cq
12 α	5,62 s		79,1 Ct
12-OCOCH ₃			170,1 Cq
12-OCOCH ₃	2,24 s		20,8 Cp
13			47,9 Cq
14			58,4 Cq
15			205,5 Cq
16 α	2,77 dd	18 ; 9,8	37,8 Cs
16 β	1,91 dd	18 ; 8	
17	2,53 ddd	9,5 ; 8 ; 6	44,7 Ct
18	0,82 s		12,1 Cp
19	1,33 s		17,9 Cp
20	2,31 m	-	29,3 Ct
21	0,99 d	6	21,7 Cp
22	2,31 d like	-	48,4 Cs
22	2,42 m	-	
23			207,4 Cq
24	2,42 dd	17,5 ; 5	46,6 Cs
24	2,82 dd	17,5 ; 8,5	
25	2,95 dqd	8,5 ; 7 ; 5	34,6 Ct
26			176,0 Cq
27	1,18 d	7	17,0 Cp
30	1,03 s		27,9 Cp
31	0,88 s		15,5 Cp
32	1,73 s		21,2 Cp

Comparatif des spectres RMN de l'acide ganodérique H expérimentaux (a) et publiés dans la littérature (b) (Kikuchi, Kanomi et al. 1986)

ANNEXE 5



Dans CDCl_3 à 400 MHz (microsonde)

position	^1H (ppm)	J(Hz)	HSQC/HMBC
1 α	1,70 ddd	(15,2; 9,6; 6,8)	34,5
1 β	2,74 m	-	
2 α	2,44 m	-	33,5
2 β	2,58 ddd	(15,6; 9,6; 6)	
3			215
4			
5	2,29 dd	(15,2; 2,4)	50
6 α	2,46 dd	(14; 2,8)	37
6 β	2,74 m	-	
7			198
8			150
9			146
10			
11			194
12	5,65 s		79
12-OCOCH ₃			170
12-OCOCH ₃	2,22 s		21
13			47
14			59
15			205
16 α	2,77 dd	(17,6; 7,6)	38
16 β	1,89 dd	(18,4; 8,4)	
17	2,57 m	-	44,5
18	0,82		12
19	1,31		19
20	2,27 m	-	29,5
21	0,96	(7,2)	22
22	2,42 m	-	47,5
	2,28 m	-	
23			207
24	2,44 m	-	48
	2,74 m	-	
25	2,94 m	-	39
26			180
27	1,2	(7,2)	17,5
30	1,11		28
31	1,09		20,5
32	1,8		21

position	^1H (ppm)	J(Hz)	^{13}C
1 α	1,72 ddd	(14; 9; 6)	34,1 Cs
1 β	2,76 ddd	(14; 8; 5)	
2 α	2,47 ddd	(15,5; 8,5; 6)	33,7 Cs
2 β	2,61 ddd	(15,5; 9,5; 6)	
3			214,8 Cp
4			46,9 Cp
5	2,31 dd	(15; 2,5)	51,0 Ct
6 α	2,49 dd	(14; 2,5)	37,5 Cs
6 β	2,72 dd	(15; 14)	
7			198,7 Cp
8			149,9 Cp
9			146,1 Cp
10			39,3 Cp
11			194,1 Cp
12	5,67 s		79,0 Ct
12-OCOCH ₃			170,2 Cp
12-OCOCH ₃	2,25 s		20,9 Cp
13			47,7 Cp
14			58,6 Cp
15			205,4 Cp
16 α	2,79 dd	(18; 10)	37,8 Cs
16 β	1,91 dd	(18; 8)	
17	2,57 ddd	(18; 10)	44,5 Ct
18	0,85 s		12,1 Cp
19	1,33		18,7 Cp
20	2,3 m	-	29,4 Ct
21	0,99	(6)	21,6 Cp
22	2,42 d-like	(14)	48,5 Cs
	2,31 d-like	(13,5)	
23			207,4 Cp
24	2,42 dd	(17,5; 5)	46,7 Cs
	2,83 dd	(17,5; 8,8)	
25	2,95 dqd	(8,5; 7; 5)	34,7 Ct
26			176,0 Cp
27	1,18 d	(7)	17,1 Cp
30	1,14 s		27,6 Cp
31	1,12 s		20,4 Cp
32	1,77 s		20,8 Cp

Comparatif des spectres RMN de l'acide ganodérique F expérimentaux (a) et publiés dans la littérature (b) (Kikuchi, Kanomi et al. 1986)

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	6
ABREVIATIONS	8
SOMMAIRE	10
INTRODUCTION.....	12
PREMIERE PARTIE	
LES PRODUITS NATURELS COMME SOURCE D'ANTICANCEREUX	13
1. Epidémiologie du cancer et surveillance en France	14
1.1. Evolution de la mortalité des cancers entre 1950 et 2006.....	14
1.2. Evolution de l'incidence.....	15
1.3. Conclusion.....	18
2. Les anticancéreux issus des produits naturels	19
2.1. Les agents interagissant avec la tubuline	20
2.1.1. Les vinca-alcaloïdes	21
2.1.2. Les taxanes	23
2.1.3. Les épothilones.....	25
2.1.4. Les combrestatines	26
2.2. Les agents interagissant avec les topoisomérase	27
2.2.1. Les dérivés de la podophyllotoxine.....	28
2.2.2. La camptothécine	30
2.3. Les agents alkylants	32
2.3.1. L' homoharringtonine	32
2.3.2. La trabectédine	33
2.3.3. L'aplidine, un analogue de la didemnine B.....	34
2.4. D'autres molécules naturelles anticancéreuses	35
2.4.1. Le flavopiridol.....	35

2.4.2.	La roscovitine	36
2.4.3.	L'acide bétulinique.....	37
2.4.4.	La β -lapachone	38
2.4.5.	L' halichondrine B	39
2.4.6.	D'autres molécules naturelles anticancéreuses	39
3.	Conclusion.....	41

DEUXIEME PARTIE

LA RESISTANCE DES CELLULES CANCEREUSES AUX TRAITEMENTS		42
1.	Les transporteurs impliqués dans le phénomène de MDR	43
2.	Le rôle physiologique des transporteurs ABC	44
3.	La protéine ABCB1	46
3.1.	Structure d'ABCB1	46
3.2.	Mécanisme de transport	47
3.3.	Le rôle physiologique d'ABCB1	48
3.4.	Son implication dans le phénomène de MDR	49
4.	Les méthodes d'exploration du fonctionnement et de l'inhibition d'ABCB1	51
5.	Les modulateurs d'ABCB1	52
5.1.	Les inhibiteurs de première génération	53
5.2.	Les inhibiteurs de deuxième génération.....	54
5.3.	Les inhibiteurs de troisième génération	55
6.	Conclusion.....	57

TROISIEME PARTIE

LES PRODUITS NATURELS COMME SOURCE D'INHIBITEUR D'ABCB1		58
1.	Les terpènes.....	60
1.1.	Les monoterpènes.....	61
1.2.	Les diterpènes.....	63

1.3.	Les sesquiterpènes : l'ophioboline A issue de <i>Bipolaris sp.</i> (Dematiaceae).....	64
1.4.	Les triterpènes	65
2.	Les saponosides	66
2.1.	Les ginsénosides issus de <i>Panax Ginseng</i> (Araliaceae).....	66
2.2.	Les saponosides stéroïdiques issues de <i>Paris polyphylla</i> (Trilliaceae).....	70
2.3.	Les gypénosides issus de <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Cucurbitaceae).....	71
3.	Les polyphénols.....	73
3.1.	Les flavonoïdes	73
3.1.1.	Les jus de Rutaceae	73
3.1.2.	Le chardon-marie, <i>Silybum marianum</i> (Asteraceae).....	75
3.2.	Les tanins.....	75
3.3.	Les curcuminoïdes.....	77
4.	Les alcaloïdes	79
4.1.	Alcaloïdes pipéridiniques	79
4.1.1.	La pipérine, issue de <i>Piper nigrum</i> ou <i>Piper longum</i> (Piperaceae).....	79
4.1.2.	La lobéline, issue de <i>Lobelia inflata</i> (Lobeliaceae)	81
4.2.	Alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiniques	83
4.3.	Alcaloïdes tropaniques	85
5.	Conclusion.....	87

QUATRIEME PARTIE

TRAVAUX EXPERIMENTAUX PERSONNELS : GANODERMA, UNE SOURCE POTENTIELLE DE MODULATEURS D'ABCBI

1.	Recherches bibliographiques : présentation de la drogue	89
1.1.	Classification mycologique des Ganodermas et leurs utilisations	89
1.2.	Composition chimique et propriétés thérapeutiques	90
1.2.1.	Les triterpènes	90
1.2.2.	Les polysaccharides.....	92

1.2.3.	Protéines	93
2.	Matériels et méthodes.....	93
2.1.	Extraction	93
2.1.1	<i>Ganoderma capense</i> comme matière première.....	93
2.1.2	Etape 1.....	94
2.2.	Fractionnement et isolement	94
2.2.1.	Etape 2 : Fractionnement de l'extrait DCM.....	94
2.2.2.	Etape 3 : Isolement des acides ganodériques par CLHP/UV.....	94
2.2.2.1.	La CLHP analytique	95
2.2.2.2.	La CLHP préparative	95
2.2.2.3.	Isolement des acides ganodériques	96
2.2.3.	Etape 4 : La chromatographie flash de l'extrait ACN.....	96
2.2.3.1.	Etape 4a : Sur chaîne chromatographique.....	96
2.2.3.2.	Etape 4b : Sur pipette pasteur	97
2.2.4.	Etape 5 : L'extraction liquide-liquide	97
2.2.5.	Etape 6 : La chromatographie de partage centrifuge (CPC)	98
2.3.	Identification des composés extraits	98
2.3.1.	Etape 7 : Analyse par résonance magnétique nucléaire	98
2.3.2.	Etape 8 : Analyse par spectrométrie de masse	99
2.4.	Tests Biologiques	99
2.4.1.	L'inhibition d'ABCB1 (étape A)	99
2.4.1.1.	Culture cellulaire de la lignée immortalisée GPNT	99
2.4.1.2.	Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur les cellules GPNT par le test de prolifération cellulaire MTT.....	100
2.4.1.3.	Essai d'accumulation intracellulaire, Essai à la rhodamine.....	101
2.4.1.4.	Dosage des protéines par l'acide bicinchonique (BCA).....	103
2.4.1.5.	Analyse statistique	103

2.4.2.	Cytotoxicité <i>in vitro</i> sur cellules KB (Etape B)	104
2.4.3.	Les essais antiparasitaires <i>in vitro</i> (Etape C)	104
2.4.3.1.	Criblage antileishmanien <i>in vitro</i> de la leishmaniose viscérale	104
2.4.3.2.	Criblage <i>in vitro</i> de la trypanosomiase Africaine : détermination de la Concentration Minimale Létale (CML)	106
2.4.4.	Criblage antifongique <i>in vitro</i> : détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> (Etape D).....	108
3.	Résultats	110
3.1.	Stratégie d'extraction de <i>G. capense</i>	110
3.2.	Fractionnements et isolements	111
3.2.1.	Fractionnement de l'extrait DCM : Etape 2	111
3.2.2.	CLHP/UV : Etape 3.....	112
3.2.2.1.	Evaluation des profils chromatographiques des extraits DCM et ACN ...	112
3.2.2.2.	Isolement des triterpènes.....	113
3.2.3.	Fractionnement de l'extrait ACN : Etapes 4a et 4b	114
3.2.4.	Extraction liquide-liquide de l'extrait ACN : Etape 5.....	114
3.2.5.	Chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la phase aqueuse : Etape 6	115
3.3.	Identification structurale : RMN et SM des triterpènes isolés : Etapes 7 et 8.....	115
3.3.1.	A partir de la fraction F10	115
3.3.2.	A partir de la fraction F7	116
3.3.3.	A partir de la fraction F3	116
3.4.	Criblage biologique des extraits de <i>Ganoderma capense</i>	117
3.4.1.	Test d'inhibition d'ABCB1 : Etape A.....	118
3.4.2.	Essais de cytotoxicité sur les cellules KB : Etape B	119
3.4.3.	Essais antiparasitaires : Etape C.....	120
3.4.3.1.	Activité trypanocide.....	120
3.4.3.2.	Activité anti-leishmanienne	120

3.4.4. Les essais antifongiques sur <i>Candida albicans</i> : Etape D.....	120
4. Conclusion et perspectives	121
CONCLUSION	123
BIBLIOGRAPHIE	125
ANNEXE 1	130
ANNEXE 2	135
ANNEXE 3	139
ANNEXE 4	140
TABLE DES MATIERES	142
TABLE DES ILLUSTRATIONS	148
SERMENT DE GALIEN	152

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Evolution de la mortalité liée aux principales localisations de cancer en France (a) chez l'homme et (b) chez la femme (Hill et al. 2009).....	15
Figure 2: (a) Evolution de la mortalité et de l'incidence du cancer du poumon chez la femme et (b) évolution de la mortalité du myélome multiple chez l'homme (●) et chez la femme(□).....	16
Figure 3 : Evolution de la mortalité et de l'incidence du cancer de la prostate (a) et du sein (b).....	17
Figure 4 : Evolution de la mortalité et de l'incidence du cancer de l'estomac.....	18
Figure 5 : Le cycle cellulaire et les anticancéreux	19
Figure 6 : Représentation de la tubuline.....	20
Figure 7: Structure des Vinca-alcaloïdes.....	22
Figure 8: Structure de la vinflunine.....	23
Figure 9: Structure du paclitaxel et son analogue hémisynthétique	24
Figure 10: Structure de l'épothilone B et son analogue semi-synthétique.....	25
Figure 11: Structure des combrestatines et un analogue hémisynthétique	27
Figure 12: Structure de la podophyllotoxine et ses analogues	29
Figure 13: Structure de la camptothécine et ses analogues hémisynthétiques	31
Figure 14 : Les analogues de la camptothécine en études cliniques.....	32
Figure 15: Structure de l'homoharringtonine	33
Figure 16: Structure de la trabectedine et son précurseur hémisynthétique	34
Figure 17 : Structure de la didemnine B et son analogue.....	35
Figure 18: Structure de la rohitukine et du flavopiridol.....	36
Figure 19: Structure de l'olomucine et son analogue synthétique.....	37
Figure 20: Structure de l'acide bétulinique	37
Figure 21: Structure de la β lapachone.....	38
Figure 22: Structure de l'halichondrine B et son analogue synthétique	39
Figure 23 : Schéma présentant les différents transporteurs de médicaments (adapté de (Lage 2003)).....	43
Figure 24 : Schémas de la structure d'ABCB1 (Gillet et al. 2007).....	46
Figure 25 : Schéma représentant les différents modèles de cycle de transport des substrats d'ABCB1 (Ambudkar et al. 2006)	48

Figure 26 : Exemple de structure des modulateurs de première génération.....	54
Figure 27 : Exemple de structure des modulateurs de seconde génération	55
Figure 28 : Exemple de structure des modulateurs de troisième génération	56
Figure 29 : Evolution du nombre de publications éditées entre 1977 et 2009 pour une recherche de mots-clé « extract » et « P-gp »	59
Figure 30 : Activité de 70 terpènes naturels sur l'accumulation de $[H]^3$ digoxine sur les cellules LLC-GA5-COL1550 (Yoshida et al. 2006).....	60
Figure 31 : Test à la $[H]^3$ dioxine de différents extraits AE d'agrumes (250 μ g/ml) : (1) fruit d' <i>Aurantium</i> , (2) fruit d' <i>Evoda</i> ; (3) fruit immature d' <i>Aurantium</i> ; péricarpe d' <i>Aurantium nobilis</i> ; (5) écorce de <i>Phellodendumi</i> ; (6) fruit de <i>Zanthoxilum</i>	61
Figure 32 : Test à la $[H]^3$ digoxine de différents monoterpènes issus de <i>Zanthoxili</i> (1 mM) : (1) géranol, (2) geranyl acetate, (3) (R)-(+)-linalool, (5) citronellal, (6) (R)-(+)-citronellal, (7) DL-citronellol, (8) (S)-(-)- β -citronellol, (9) cinéol.....	62
Figure 33 : Structures chimiques du citronellal et du citronellol, inhibiteurs d'ABCB1	62
Figure 34 : Structure de diterpènes capables d'inhiber ABCB1	64
Figure 35 : Structure de sesquiterpènes ayant une activité inhibitrice d'ABCB1	65
Figure 36 : Structures des triterpènes présentant une activité inhibitrice d'ABCB1.....	66
Figure 37 : Test d'accumulation de la rhodamine 123 sur les cellules KB en présence de vérapamil (●) et de ginsénoside Rg3 (▲) et sur les cellules résistantes KBV20C en présence de vérapamil (■) et de ginsénoside Rg3 (▼) (S. Kim et al. 2003).....	68
Figure 38 : Structure des ginsénosides capables de moduler ABCB1 (Zhou et al. 2004).....	69
Figure 39 : Inhibition relative d'ABCB1 des différents extraits de <i>Paris polyphylla</i> sur les cellules K562/R7 ; Les composés isolés ont été testés à 10 μ M ; 3-O-Rha(1→2)[Ara(1→4)]Glc-pennogénine (1), gracilline (2), et polyphylline D (3) (Nguyen et al. 2009).....	70
Figure 40 : Structure des saponosides stéroïdiques actives de <i>Paris polyphylla</i>	71
Figure 41 : IC ₅₀ de la colchicine (COL) en présence ou absence de l'extrait total de gypénosides ou des gypénosides de la fraction 100 sur les cellules CEM/VBL ₁₀₀ (T. H. Huang et al. 2007).....	72
Figure 42 : Structure des gypénosides présents dans <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Cucurbitaceae)	72
Figure 43 : Structure chimique de flavonoïdes	74
Figure 44 : Structure de la sylimarine	75
Figure 45 : L'accumulation de la rhodamine 123 sur les cellules CH ^R C5 à des concentrations croissantes de polyphénols du thé (Jodoin et al. 2002)	76
Figure 46 : Structure des polyphénols présents dans le thé (Zhou et al. 2004)	76
Figure 47 : Représentation de la curcumine.....	77

Figure 48 : Effet des extraits MeOH des Curcumas (0,1 mg/ml) et de la curcumine (30µM) sur le taux d'expression du gène MDR1 et de la protéine ABCB1 dans les cellules Caco-2 (Hou et al. 2008)	78
Figure 49 : Inhibition d'ABCB1 par la pipérine calculée via le transport de 5 µM de digoxine dans les cellules Caco-2 (Bhardwaj et al. 2002)	80
Figure 50 : Courbe représentant la formation du métabolite D-617 sans (■) ou avec (▼) l'addition de pipérine (Bhardwaj et al. 2002).....	80
Figure 51 : Structure de la pipérine.....	80
Figure 52 : Structure chimique de la lobéline	81
Figure 53 : Pourcentage d'inhibition d'ABCB1 en fonction de la concentration de lobéline (Y. Ma & Wink 2008).....	82
Figure 54 : Comparaison des IC50 de la doxorubicine en présence ou non d'inhibiteurs d'ABCB1 (Y. Ma & Wink 2008)	83
Figure 55 : Intensité de la fluorescence de la mitoxandrone dans les cellules (Y. Ma & Wink 2008).....	83
Figure 56: Structure de la tétrandrine et de la 5-bromotétrandrine	85
Figure 57 : Augmentation de l'accumulation de la [³ H]vinblastine (16 nM) par la pervilleine A (○) et le vérapamil (●) sur les cellules KB-V1 (Mi et al. 2001).....	86
Figure 58 : Structure de la Pervilleine A, B et C.....	86
Figure 59 : Représentations de <i>Ganoderma capense</i> (Ganodermataceae)	89
Figure 60 : Classification mycologique des Ganodermas	90
Figure 61 : Structures de triterpènes retrouvés dans les Ganodermas	91
Figure 62 : Structure de l'acide ganodérique Me	92
Figure 63 : Structure chimique de la rhodamine	101
Figure 64 : Profil chromatographique de l'extrait DCM, colonne Zorbax SB-C ₁₈ ; 4,6x250mm ; 3,5µm ; gradient linéaire de solvant: 30% de B pendant 25 minutes, puis à 45% en 30 minutes, puis à 100 % en 1 minute pendant 9 minutes, puis à 30% en 1 minute pendant 20 minutes.	112
Figure 65 : Profil chromatographique de l'extrait ACN, colonne Sunfire C ₁₈ ; 4,6x150mm ; 5µm à 350 nm ; gradient 5% à 100% solvant B en 40 min	112
Figure 66 : F3 à l'échelle analytique colonne Sunfire (C ₁₈ ; 4,6x150mm ; 5µm) (a) et à l'échelle préparative Colonne Sunfire OBD (C ₁₈ ; 19 mm x 150 mm; 5 µm) (b) à 254 nm (isocratique 65/35 (A/B)).....	113
Figure 67 : F7 à l'échelle analytique colonne Sunfire (C ₁₈ ; 4,6x150mm ; 5µm) (a) et à l'échelle préparative Colonne Sunfire OBD (C ₁₈ ; 19 mm x 150 mm; 5 µm) (b) à 254 nm (isocratique 70/30 (A/B))	113
Figure 68 : F10 à l'échelle analytique (a) et à l'échelle préparative (b) à 254 nm (isocratique 71/29 (A/B)).....	113
Figure 69 : Tests d'accumulation à la rhodamine 123 sur les cellules GPNT des extraits, fractions et composés isolés à 250 µg/ml	118

Tableau 1 : Les molécules naturelles en développement clinique ou pré-clinique	40
Tableau 2 : Distribution physiologique d'ABCB1 dans les tissus (Coley 2008)	49
Tableau 3 : Les substrats de quelques transporteurs ABC (Choi 2005).....	50
Tableau 4 : Sélection de molécules synthétiques qui présentent une activité sur le phénotype MDR (Teodori et al. 2002)	53
Tableau 5 : Récapitulatif des masses obtenues après réunion des fractions.....	114
Tableau 6 : Récapitulatif des masses obtenues	114
Tableau 7 : Evaluation de la CML des extraits de <i>G. capense</i>	120
Tableau 8 : Evaluation de l'activité sur parasites responsables de la leishmaniose	120

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères, si j'y manque.

Sandrine AUGET

Titre de la thèse : Substances naturelles anticancéreuses et inhibant la chimiorésistance :
Revue bibliographique et travaux personnels.

Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie
Université de Limoges, 2010, 152 pages

RESUME

Le cancer est un fléau mondial que la communauté scientifique étudie intensément afin de trouver les meilleures stratégies thérapeutiques. L'une des sources principales d'obtention de nouveaux agents anticancéreux est la nature (plantes, animaux, organismes marins ou bactéries). Plusieurs anticancéreux issus de produits naturels sont largement utilisés actuellement en clinique, d'autres, font l'objet d'études cliniques et pré-cliniques.

Actuellement, de nombreux traitements anti-cancéreux échouent à cause d'un phénomène appelé « multi-drug resistance ». Il est principalement dû à la surexpression de pompes à efflux appartenant à la famille des ATP-binding cassette comme ABCB1. Cette protéine membranaire est capable de transférer de nombreux substrats à travers les membranes cellulaires et d'expulser de la cellule des médicaments comme les anticancéreux (taxoïdes, vinca-alcaloïdes, anthracyclines...). L'association des chimiothérapies anticancéreuses avec des inhibiteurs d'ABCB1 permettrait donc une nouvelle approche stratégique des traitements anticancéreux.

Depuis 1977, de nombreux travaux ont permis d'étudier les substances naturelles sur l'activité d'ABCB1. Ces études montrent que de nombreuses molécules naturelles ayant des structures et des masses moléculaires totalement différentes sont capables d'inhiber ABCB1. Cependant, du fait de l'hétérogénéité des études (l'utilisation de lignées cellulaires différentes, essais biologiques différents), il est difficile de pouvoir comparer l'activité inhibitrice d'ABCB1 des molécules entre elles.

Un fractionnement bioguidé d'un champignon chinois : *Ganoderma capense* a été réalisé sur l'activité inhibitrice d'ABCB1. Ce champignon, utilisé traditionnellement depuis l'antiquité, est présenté comme promoteur de longévité et anticancéreux. Ses triterpènes et ses polysaccharides sont les métabolites secondaires responsables de l'activité antitumorale. L'utilisation du test d'accumulation à la rhodamine a permis de sélectionner les extraits de *G. capense* inhibiteurs d'ABCB1 : dichlorométhane (DCM) et acétonitrile (ACN). Trois composés ont été isolés de l'extrait DCM par CLHP préparative : l'acide ganodérique A, l'acide ganodérique H et l'acide ganodérique F.

Les essais biologiques réalisés, montrent que *Ganoderma capense* possède une activité inhibitrice d'ABCB1. L'activité de l'acide ganodérique A est faible mais significative tandis que l'acide ganodérique H en est dépourvu.

DISCIPLINE – SPECIALITE DOCTORALE

Pharmacognosie

MOTS-CLES

Substances naturelles, cancer, cytotoxiques, MDR, ABCB1, P-gp, *Ganoderma capense*.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

Faculté de Pharmacie
Université de Limoges
2 Rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES

Laboratoire de Pharmacognosie
UMR CNRS 8076 BioCIS - 5 rue J.-B. Clément
Université Paris-Sud XI
92296 CHATENAY-MALABRY