

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

---

ANNÉE 2011

THÈSE N°

Implication du stress oxydant  
dans la biologie tumorale  
&  
Intérêt d'une supplémentation en antioxydants  
au cours d'une chimiothérapie.

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 28 septembre 2011

Par

**Philippe BOTHOREL**

Né le 28 septembre 1986, à Saint-Renan (Finistère)

Examineurs de la thèse

Pr. Jean-Luc DUROUX, Directeur de thèse ..... Président  
Dr. Catherine FAGNERE, Maître de conférences ..... Juge  
Dr. Caroline SOL-TOUATI, Praticien Hospitalier ..... Juge  
Dr. Bertrand LIAGRE, Maître de conférences ..... Juge



UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

---

ANNÉE 2011

THÈSE N°

Implication du stress oxydant  
dans la biologie tumorale  
&  
Intérêt d'une supplémentation en antioxydants  
au cours d'une chimiothérapie.

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 28 septembre 2011

Par

**Philippe BOTHOREL**

Né le 28 septembre 1986, à Saint-Renan (Finistère)

Examineurs de la thèse

Pr. Jean-Luc DUROUX, Directeur de thèse ..... Président

Dr. Catherine FAGNERE, Maître de conférences ..... Juge

Dr. Caroline SOL-TOUATI, Praticien Hospitalier ..... Juge

Dr. Bertrand LIAGRE, Maître de conférences ..... Juge

# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

## FACULTÉ DE PHARMACIE

---

DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**  
1<sup>er</sup> VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences  
2<sup>ème</sup> VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

### PROFESSEURS :

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACOTECHNIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACOLOGIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>ROGEZ</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES :

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS-PRATICIENS HOSPITALIERS DES  
DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

**DREYFUSS Marie-Françoise**

**CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE**

**PROFESSEUR CERTIFIÉ :**

**MARBOUTY Jean-Michel**

**ANGLAIS**

# Remerciements

---

À notre Directeur de thèse et Président de jury, Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX,

Nous vous sommes très reconnaissants pour le temps que vous nous avez consacré et la disponibilité dont vous avez fait preuve à notre égard, pour votre aide précieuse dans l'élaboration de notre sujet et pour tous les conseils avisés que vous nous avez apporté au cours de ce travail. Nous vous remercions également pour le soutien et la confiance que vous nous avez témoigné au cours de notre cursus universitaire.

À Madame le Docteur Catherine FAGNERE,

Nous vous remercions pour votre soutien, votre écoute et les conseils que vous nous avez prodigué au cours de notre cursus universitaire. Nous sommes très heureux que vous ayez accepté de faire partie de ce jury.

À Madame le Docteur Caroline SOL-TOUATI,

Nous sommes très touchés de l'honneur que vous nous faites d'être présente dans ce jury et nous vous remercions pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce travail.

À Monsieur le Docteur Bertrand LIAGRE,

Nous sommes très honorés que vous ayez accepté d'être membre de ce jury. Nous vous remercions également pour le temps passé à la lecture de cette thèse.

Nous souhaitons également témoigner notre reconnaissance à l'Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie de l'Université de Limoges, au sein de laquelle il nous a été très agréable d'évoluer pendant ces six dernières années.

À ma fiancée dont le soutien indéfectible ne quittera jamais ma mémoire, je te remercie pour ta patience, tes conseils avisés et la confiance que tu m'accordes. Je souhaite te témoigner ici tout mon amour.

À ma mère et ma soeur qui méritent toute mon affection,

À ma deuxième famille qui a su m'apporter un soutien inestimable,

En hommage à mon père par lequel ce travail prend tout son sens.

# Plan

---

I. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PRINCIPAUX PRO-OXYDANTS CELLULAIRES	13
1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	14
1.1. Les différentes ERO	15
1.2. Le radical superoxyde et sa forme protonée	15
1.3. Le radical hydroxyle	19
1.4. Le peroxyde d'hydrogène	24
1.5. Les radicaux peroxydes, les hydroperoxydes et les radicaux alkoxydes	24
2. Les espèces réactives de l'azote (ERN)	25
2.1. Le monoxyde d'azote	25
2.2. Le peroxydinitrite	26
II. PHÉNOMÈNES D'OXYDATION CELLULAIRE ET MÉCANISMES DE COMPENSATION	29
1. Les antioxydants enzymatiques (AE)	30
1.1. Les superoxydes dismutases	30
1.1.1. Généralités	
1.1.2. Mn SOD et cancer	
1.1.3. CuZn SOD et cancer	
1.2. Glutathion peroxydases (GPx)	33
1.2.1. Généralités	
1.2.2. GPx et cancer	
1.3. Les catalases	36
1.4. Conclusion	37
2. Systèmes tampons du potentiel rédox cellulaire	38
2.1. Le glutathion (GSH)	38
2.2. Le système thiorédoxine (Trx) - thiorédoxine réductase (TrxR)	39
2.3. Les pyridines nucléotides	39
3. Les chélateurs de métaux	40
4. Les antioxydants non enzymatiques (ANE)	41
4.1. Antioxydants inhibant les réactions en chaîne d'origine radicalaire consécutives à la peroxydation lipidique	41
4.1.1. La Vitamine C ou Acide ascorbique	
4.1.2. La Vitamine E ou $\alpha$ -tocophérol	
4.2. Polyphénols	43
III. VARIATIONS DU STATUT RÉDOX DES CELLULES TUMORALES. ERO ET ÉTABLISSEMENT DES CARACTÉRISTIQUES DU CANCER.	45
1. Le stress oxydant	46
1.1. Définition	46
1.2. La dualité des ERO	47
1.2.1. ERO et mort cellulaire	
1.2.2. ERO et prolifération cellulaire	
1.3. Rôle des ERO dans la signalisation cellulaire	48
1.3.1. Mécanisme d'oxydation des cystéines « sensibles »	
1.3.2. Action des ERO sur les protéines tyrosine phosphatases	

1.3.3. Action des ERO sur les facteurs de transcription	
1.3.4. Inhibition des interactions protéine-protéine par les ERO	
1.3.5. Stabilisation des protéines de la signalisation cellulaire par les ERO	
2. Implication des ERO dans l'établissement des caractéristiques essentielles du cancer	51
2.1. Les caractéristiques du cancer	51
2.2. Instabilité et mutations du génome	52
2.3. Promotion tumorale par l'inflammation	54
2.4. Accentuation des signaux de prolifération	56
2.4.1. ERO et récepteurs aux facteurs de croissance	
2.4.2. Les ERO et les MAP-Kinases	
2.4.3. ERO et modulation de la voie des ERK	
2.5. Dérégulation métabolique	60
2.5.1. Importance du métabolisme tumoral	
2.5.2. L'effet Warburg	
2.5.3. Participation des ERO au shift métabolique	
2.5.4. Les conséquences de l'effet Warburg	
2.5.5. Adaptation des cellules tumorales au stress oxydant	
2.5.6. Effet Warburg et équation de Nernst	
2.6. Échappement à l'apoptose	69
2.7. Angiogenèse	71
2.8. Invasion et métastases	73
2.8.1. Transition épithéliale-mésenchymateuse	
2.9. Conclusion	75
IV. ANALYSE DES ÉTUDES PUBLIÉES ET PERSPECTIVES D'UNE SUPPLÉMENTATION EN ANTIOXYDANTS	77
1. État des lieux de la supplémentation en antioxydants	78
2. Un sujet non consensuel	79
3. Arguments en défaveur d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie	79
3.1. Les antioxydants : antagonistes des chimiothérapies ?	80
3.2. Intérêt naissant du ciblage des systèmes tampons : un contrepied à la supplémentation en antioxydants	81
3.3. Mise en garde des études de prévention contre le cancer	82
4. Arguments en faveur d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie	83
4.1. Supplémentation visant à diminuer les effets indésirables des chimiothérapies	84
4.1.1. Supplémentation en glutathion	
4.1.2. Supplémentation en sélénium	
4.2. Supplémentation à visée curative	88
4.2.1. Ciblage des NOX	
4.2.2. Thé vert et inhibition des voies signalétiques	
4.2.3. Les polyphénols : une grande famille au fort potentiel	
V. CONCLUSION	93
VI. BIBLIOGRAPHIE	98

# Liste des Abréviations

---

AA	acide aminé
AO	antioxydants
AOE	antioxydants enzymatiques
BZM	bortezomib
CaP	cancer de la prostate
CE	cellule endothéliale
DHA	acide déshydroascorbique
EGCG	(-)-épigallocatechine-3-gallate
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
$E_{hc}$	potentiel de demi-cellule
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ERO	espèces réactives de l'oxygène
ERN	espèces réactives de l'azote
ETC	electron transport chain
FAK	focal adhesion kinase
GPx	glutathion peroxydase
GSH	glutathion
GSSG	glutathion réduit
HER2	epidermal growth factor receptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HIF1 $\alpha$	facteur inductible de l'hypoxie 1 $\alpha$ (hypoxia inductible factor)
HSP	heat-shock protein
iNOS	NO-synthase inductible
KEAP1	kelch-like ECH associating protein 1
LDL	low density lipoprotein
LMW-PTP	low molecular weight-PTP
MEC	matrice extra-cellulaire

MICI	maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MMP	matrix métalloprotéinase
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOS	NO-synthase
NOX	NADPH oxydase
OXPPOS	phosphorylation oxydative
PARP	polyADP-ribose polymérase
PDGF	platlet derived growth factor
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PHD	prolyl 4-hydroxylase fer-dépendante
PTP	protéine tyrosine phosphatase
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
Se	sélénium
Sec	sélocystéine
SHP-2	SH2 domain phosphatase
SOD	superoxyde dismutase
TEM	transition épithélio-mésenchymateuse
TGF	transforming growth factor
Trx	thioredoxine
Trx-SS	thioredoxine réduite
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
XO	xanthine oxydase

# Introduction

---

S'il existe certains sujets intarissables dans le domaine scientifique, la prévention du cancer par les antioxydants en est bien un. Il est source d'ailleurs d'un clivage manichéen qui ne cesse d'alimenter la curiosité des médias. Tandis que certains antioxydants sont mis sur le devant de la scène, d'autres sont décriés.

Lorsque le cancer est déclaré, la prévention n'est plus d'actualité. Le recours fréquent aux « thérapies alternatives ou complémentaires », <sup>[1, 2]</sup> démontre que les patients souhaitent s'investir activement dans leur projet de soins. Malheureusement, en France l'offre dans le domaine de l'éducation thérapeutique du patient en oncologie est quasi inexistante. <sup>[3]</sup> Diverses études récentes mettent en exergue le recours croissant aux antioxydants par les patients atteints de cancer et ce, sous forme de supplémentation orale. Ce phénomène a notamment été observé aux États-Unis et en France, alors que l'utilisation de ces compléments est loin d'être systématiquement encadrée par les cliniciens. <sup>[2, 4-7]</sup> La littérature scientifique foisonne à ce sujet mais des discordances notables entre les auteurs, et donc l'absence de consensus, ne permet pas de répondre de manière succincte à la question suivante : la supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie présente-t-elle un intérêt ?

Ce sujet fait débat depuis un certains temps déjà. En effet dès 1974 l'Américain Linus Carl Pauling, prix Nobel de chimie en 1954, et prix Nobel de la Paix en 1962, ainsi que le cancérologue britannique Ewan Cameron ont mis en avant un bénéfice apporté par l'utilisation de vitamine C chez le patient cancéreux. <sup>[8]</sup> Même s'ils ont initié un débat qui n'a toujours pas à l'heure actuelle l'approbation unanime de leurs pairs, il trouve toutefois écho auprès de certains médecins et chercheurs. En France, la publication de livres grand public largement médiatisés tels que, *Anticancer* de David Servan-Schreiber avec plus de 400 000 exemplaires vendus ou encore *Le Vrai Régime anticancer* du Pr David Khayat, contribue à l'engouement de certains patients pour les antioxydants. <sup>[9, 10]</sup> Ces livres traitent essentiellement de la prévention contre le cancer, et prônent, certes de manière plus laconique, l'intérêt des antioxydants dans l'accompagnement du traitement chez le patient cancéreux. L'ambiguïté alors dégagée prête parfois à la confusion des rôles des antioxydants entre prévention et traitement.

À côté de ces livres, des articles publiés dans les plus grands journaux scientifiques du domaine de la cancérologie mettent en garde les praticiens vis à vis d'une supplémentation en antioxydants. En effet, selon eux, cette supplémentation serait source de résistance pour les thérapies anticancéreuses. <sup>[1, 11]</sup>

L'ambition de ce travail est de réunir les différentes connaissances actuelles sur ce sujet afin d'émettre une synthèse permettant de répondre au mieux à la question posée en préambule.

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION  
DES PRINCIPAUX PRO-OXYDANTS  
CELLULAIRES

La section qui suit constitue une synthèse des connaissances actuelles en terme de biochimie radicalaire. Ces éléments constituent un pré-requis nécessaire afin d'évaluer le bénéfice éventuel d'une thérapie antioxydante. Il faut pouvoir définir les cibles d'une telle thérapie et renseigner dans quels cas et par quelles actions les pro-oxydants peuvent être délétères pour l'organisme chez le patient cancéreux.

## 1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La formation de radicaux libres résulte du métabolisme basal chez l'homme, elle est donc physiologique et étroitement liée à l'utilisation de dioxygène par nos cellules. <sup>[12]</sup> Les ERO peuvent jouer un rôle important de défense de l'organisme lors des mécanismes de phagocytose des micro-organismes. De récentes études démontrent leur rôle dans certaines voies de signalisation cellulaire. En effet, beaucoup d'ERO jouent un rôle de second messenger lors de la sécrétion de cytokines ou dans les voies de signalisation du NF- $\kappa$ B. <sup>[13-16]</sup> D'autre part, l'expression du programme génétique des cellules peut varier en réponse aux modifications des taux d'ERO intracellulaires. <sup>[17]</sup>

Un radical libre est un atome ou une molécule qui comporte un électron célibataire. La présence de cet électron célibataire est explicitement signalée sur les formules chimiques des radicaux libres par l'ajout du symbole  $^{\circ}$  ou  $\cdot$  en exposant de l'atome qui le porte. Par exemple, le radical superoxyde est noté  $O_2^{\circ}$  ou  $O_2\cdot$ . Cette caractéristique est à l'origine de l'instabilité énergétique et cinétique de ces espèces chimiques. Elles entraînent généralement des réactions en chaîne formant à nouveau des radicaux libres. <sup>[18]</sup> La majeure partie des espèces réactives de l'oxygène sont des radicaux libres et possèdent donc ces propriétés. Si ces espèces semblent être pourvues d'un intérêt physiologique, la recherche les a d'abord incriminées lors de lésions tissulaires ou de maladies. <sup>[19]</sup> De nombreuses situations physiopathologiques telles que l'asthme, l'athérosclérose, les maladies rhumatismales, le vieillissement et le cancer retrouvent une surproduction d'ERO. <sup>[20]</sup> En 1991, une découverte surprenante montra que différentes lignées cellulaires cancéreuses provenant d'une large variété de tissus étaient capables de produire une grande quantité de peroxyde d'hydrogène de manière constitutive. <sup>[21]</sup> Or le déséquilibre du statut antioxydant crée un stress oxydatif, responsable entre autres, de dommages moléculaires liés à la forte réactivité des ERO. Les acides nucléiques de l'ADN, les lipides des membranes cellulaires, les protéines enzymatiques ou structurales qui jouent un rôle fondamental pour la survie cellulaire, sont les cibles moléculaires de ces ERO. <sup>[12]</sup> Certaines interrogations peuvent d'ores et déjà être suscitées : la supplémentation en antioxydants lors d'une surproduction d'ERO avérée permet-elle de rétablir l'équilibre pro-oxydants/antioxydants et d'éviter ainsi les dommages moléculaires ?

## 1.1. Les différentes ERO

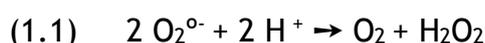
Toutes les ERO ne sont pas des radicaux libres. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) ne possèdent pas d'électrons célibataires et ne peuvent donc pas être considérés comme radicaux libres. [12] Ces deux espèces dérivées de l'oxygène se retrouvent néanmoins à l'origine de la formation d'autres radicaux libres. Il est donc courant de parler d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui permet d'inclure l'ensemble des espèces qui dérivent de l'oxygène moléculaire O<sub>2</sub>.

## 1.2. Le radical superoxyde et sa forme protonée

### ♦ *Découverte*

La découverte du radical superoxyde en milieu cellulaire est étroitement liée à la description de la superoxyde dismutase (SOD). Cette métalloprotéine a été initialement décrite et extraite des érythrocytes de bovins par Mann et Keilin en 1939. Puis en 1969, McCord et Fridovich ont pu établir son activité enzymatique qui catalyse l'obtention de peroxyde d'hydrogène à partir de la dismutation du radical superoxyde (réaction 1.1).

Réaction 1.1 | Réaction de dismutation du radical superoxyde catalysée par la SOD.



Dès lors, des essais sur différents tissus ont établi une large distribution de cette métalloprotéine dans les cellules des mammifères. [22]

### ♦ *Réactivité*

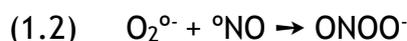
La découverte indirecte de l'implication du radical superoxyde dans le métabolisme n'est pas le fruit du hasard. En milieu aqueux, la durée de vie de l'anion superoxyde n'est que très éphémère. Rapidement, l'acceptation d'un autre électron ou le transfert de cet électron libre sur une autre molécule va permettre d'annihiler sa réactivité ou du moins de la transmettre à une autre espèce précédemment stable. Cette caractéristique lui vaut l'étiquette de « toxique à action différée ». La cinétique de réaction avec les biomolécules est très faible car les constantes de vitesse<sup>i</sup> décrites pour les réactions avec l'ADN, les protéines et les lipides sont inférieures à 10<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>. Cela traduit le fait que ces réactions ne peuvent avoir lieu sans énergie d'activation. [23] La toxicité de ce radical vis-à-vis des biomolécules va donc passer par des intermédiaires.

<sup>i</sup> Réaction élémentaire de deuxième ordre, avec  $v = k \times [\text{réactif A}] \times [\text{réactif B}]$ . Les réactifs A et B sont exprimés en mol.L<sup>-1</sup>, la constante de vitesse  $k$  en mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup> et la vitesse de réaction  $v$  en mol.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.

Plusieurs hypothèses réactionnelles ont été émises à ce sujet pour établir cette toxicité « différée » :

- Il est probable que la majorité de l' $O_2^{\circ-}$  soit transformée en peroxyde d'hydrogène par la réaction de dismutation sus-citée (réaction (1.1)).<sup>[15]</sup> En effet, à pH 7, la constante de vitesse pour cette réaction est de l'ordre de  $\sim 7.10^9 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$  en présence de SOD et de  $10^5 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$  en son absence.<sup>[23]</sup> Or le peroxyde d'hydrogène issu de cette dismutation est à l'origine de la formation de radicaux hydroxyles, la plus délétère des ERO, via la réaction de Fenton en présence de cations métalliques (réaction 1.6).
- La forme protonée est plus toxique.
- D'autre part, la réaction biradicalaire entre le radical superoxyde et le monoxyde d'azote produit du peroxynitrite. En effet quand deux radicaux libres se rencontrent, ils peuvent associer leurs électrons non appariés pour former une liaison covalente (réaction 1.2).<sup>[15, 23]</sup>

Réaction 1.2 | Réaction biradicalaire formant du peroxynitrite.

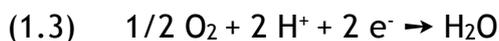


Les espèces néoformées par ces réactions à savoir, le radical hydroxyle et l'anion peroxynitrite, ont une toxicité biologique démontrée sur l'ADN, les protéines, et les lipides. D'ores et déjà, il est possible de noter une variabilité réactionnelle des ERO selon leur nature. Le radical superoxyde, bien que peu réactif par rapport aux autres ERO, constitue toutefois la première forme radicalaire et reste le précurseur d'espèces bien plus dangereuses tel que le radical hydroxyle, forme la plus toxique des ERO.<sup>[20]</sup>

#### ♦ *Lieux de synthèse*

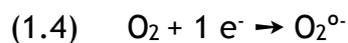
Dans les cellules saines de l'organisme, la présence de radical superoxyde et le métabolisme énergétique producteur d'ATP sont intriqués. La phosphorylation oxydative mitochondriale est une étape régénératrice des coenzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs. Elle permet aussi de produire la majeure partie de l'ATP des voies métaboliques oxydatives. Ce métabolisme, permanent et indispensable, combine un système réducteur de transfert d'électrons et du dioxygène responsables de la production de radical superoxyde. Le dioxygène est de ce point de vue, le récepteur terminal des électrons issus du métabolisme du glucose (réaction 1.3).<sup>[24]</sup>

Réaction 1.3 | Le dioxygène : accepteur d'électrons lors de la respiration cellulaire.



Or cette réaction n'est pas totale. Selon les auteurs 1 à 6% du dioxygène va être transformé en radical superoxyde par l'addition d'un seul électron sur le dioxygène (réaction 1.4).

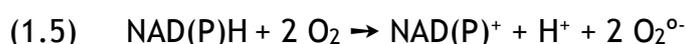
Réaction 1.4 | Synthèse du radical superoxyde dans la mitochondrie.



C'est à l'issue de cette production mitochondriale initiale, que le radical superoxyde va pouvoir alimenter la synthèse d'ERO. [14, 18, 24, 25] Certaines auteurs estiment la production de cet élément radicalaire à 2 kg par an chez l'être humain. [15] Les radicaux superoxydes ont la capacité de diffuser au niveau de la membrane mitochondriale externe, de la matrice, et de part et d'autre de la membrane interne. [26]

Mais la mitochondrie n'est pas le seul lieu de prédilection pour le radical superoxyde. Il est produit par les cellules immunitaires : les phagocytes (e.g., monocytes, neutrophiles, macrophages et éosinophiles) à des fins de défense contre les agressions bactériennes et virales. [12, 15] Ces cellules possèdent des organites spécifiques à même d'abriter ces ERO et de les maîtriser par la présence d'enzymes de détoxification. Dans les membranes des neutrophiles, la NAD(P)H oxydase membranaire (NOX) catalyse la formation de radical superoxyde par réduction de l'oxygène (réaction 1.5). [25, 27]

Réaction 1.5 | Synthèse du radical superoxyde par les NOX.



D'autres cellules non phagocytaires sont capables de produire de l' $O_2^{\circ-}$  via la NOX. Il s'agit entre autres des fibroblastes, des lymphocytes, des phagocytes et des cellules endothéliales. [15] Dans ces cellules, les fonctions engendrées par la production d'ERO seront différentes. Par exemple, les fibroblastes comportent deux isoformes de NOX : NOX1 & NOX2 inductibles par des stimuli différents et elles vont respectivement jouer un rôle dans la prolifération ou la nécrose cellulaire (tableau 1.1). [16]

Tableau 1.1 | Rôle des NOX dans la signalisation cellulaire des fibroblastes. [16]

<i>Isoforme NOX</i>	<i>Stimulus</i>	<i>Voie de signalisation</i>	<i>Fonction</i>
NOX1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Erk 1/2 / cycline D1	Prolifération
NOX2	TNF <sub>α</sub>	NF-κB	Nécrose

La xanthine oxydase (XO) produit également des radicaux  $O_2^{\bullet-}$  qui seront ensuite réduits en peroxyde d'hydrogène (figure 1.1). La XO est issue de la dimérisation de la xanthine deshydrogénase en conditions de basse pression en oxygène lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion<sup>1</sup>.

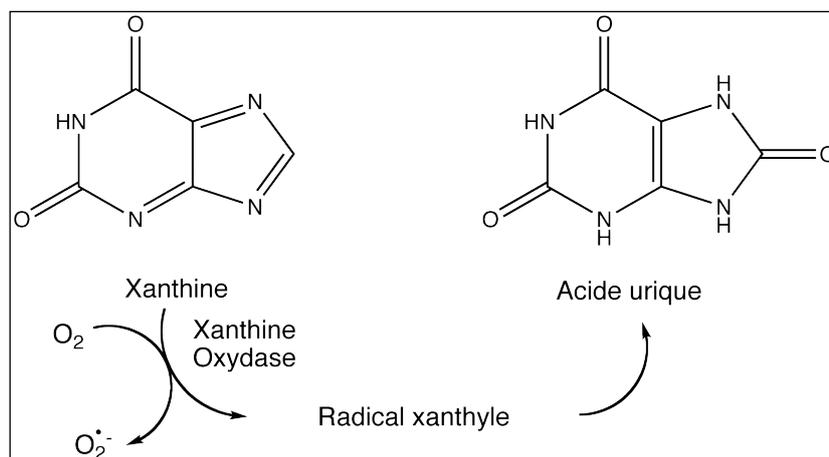


Figure 1.1 | Formation de radical superoxyde par l'action de la xanthine oxydase sur la xanthine. [25]

Les cytochromes P450 du réticulum endoplasmique, permettant la métabolisation des xénobiotiques et des acides gras par oxydation, produisent à cette occasion des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. La caractéristique commune des NOX, de la XO et des CYP450 est d'avoir leur activité régulée par différents facteurs. Une activation inadaptée de ces systèmes enzymatiques en réponse à différents stimuli peut donc entraîner un déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants, en faveur des premiers.

Les sources de radical superoxyde sont donc nombreuses. Il s'agit d'une ERO incontournable car dans tous les cas, il sert de base pour la production des autres ERO.

#### ♦ La forme protonée

Comme toutes les molécules, les radicaux libres ont des propriétés acido-basiques. La présence de la forme protonée est liée au pH du milieu environnant. Dans certains organites cellulaires acides (e.g., lysosomes) dont le pH est de l'ordre de 5, on retrouve le radical hydroperoxyde ou perhydroxyde  $HO_2^{\bullet}$ . Cette forme « acide » possède un pouvoir oxydant plus important et serait la forme « active » du radical superoxyde. [16] Elle peut initier la peroxydation lipidique contrairement à la forme non protonée. [25] Effectivement, la constante de vitesse avec les acides gras insaturés est de l'ordre de  $10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ .

<sup>1</sup> Le phénomène d'ischémie-reperfusion est rencontré notamment au cours des greffes d'organes. Il conduit, après une période de privation en oxygène (ischémie), à une surproduction d'ERO lors de la réoxygénation (reperfusion) dans les tissus touchés. Il s'agit d'un modèle d'étude intéressant du stress oxydatif.

### 1.3. Le radical hydroxyle

#### ♦ Réactivité

Les radicaux hydroxyles sont des oxydants très puissants altérant de nombreuses biomolécules dont l'intégrité garantit la pérennité cellulaire (e.g., ADN, lipides membranaires, protéines). Toutefois, leur grande réactivité est contrebalancée par un faible pouvoir de diffusion. De plus, la très grande réactivité associée à la faible durée de vie de cette ERO donne lieu à des réactions non spécifiques. C'est pourquoi, le radical hydroxyle réagit dans la promiscuité avec tous types de molécules. Le potentiel standard d'oxydo-réduction pour le couple  $^{\circ}\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  ( $E^{\circ} = 2,34 \text{ V}$ ) explique la puissance de la capacité oxydante du radical hydroxyle. D'un point de vue thermodynamique, c'est l'ERO la plus avide d'électrons. Il va pouvoir oxyder tout réducteur d'un couple ayant un potentiel standard inférieur. Or, la majorité des biomolécules appartiennent à un couple oxydant/réducteur doté d'un potentiel standard inférieur à 2,34 V. L'attaque des biomolécules s'effectue par oxydation mono-électronique. Après réaction, les cibles réactionnelles deviennent à leur tour des radicaux libres. Les sites radicalaires néoformés apparaissent sur des atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'oxygène et peuvent devenir le siège de réactions en chaîne.

De nombreuses études *in vitro* ont permis d'établir les différents dommages « stables » consécutifs à l'action du radical hydroxyle sur les cibles biomoléculaires. À l'heure actuelle, plus de 100 produits d'oxydation de l'ADN ont été identifiés. [28] L'ADN peut subir des ruptures simple brin ou double brin par arrachement des atomes d'hydrogène appartenant aux liaisons phosphodiester en 5' du desoxyribose (figure 1.2).

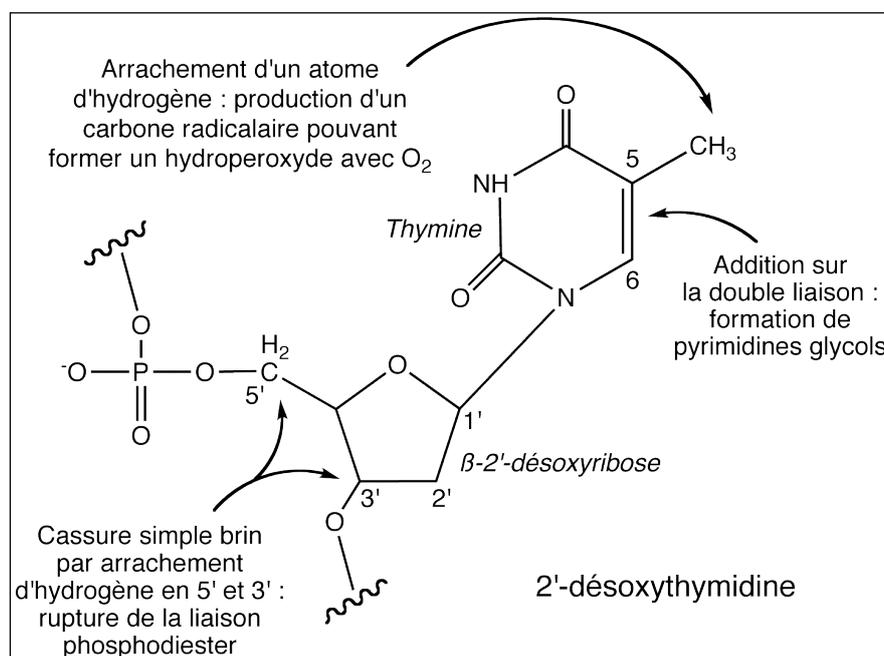


Figure 1.2 | Dommages oxydatifs de l'ADN : exemple de différentes cibles pour le radical hydroxyle sur la désoxy-thymidine. [25, 29]

Il est à noter que des pontages protéine-ADN ou glucides-ADN consécutifs aux réactions biradicalaires mixtes peuvent avoir lieu entre deux types de biomolécules. [23] En effet, les produits d'oxydation issus de chaque classe de biomolécules (e.g., ADN, protéines, lipides) peuvent interagir pour former des adduits. [29] Les purines sont très vite oxydées par les radicaux °OH. Ces oxydations ont lieu au niveau des doubles liaisons 7,8 des purines et des doubles liaisons 5,6 des pyrimidines (figure 1.2). Les modifications apportées aux bases de l'ADN donnent des produits d'oxydation caractéristiques tels que la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) (figure 1.3).

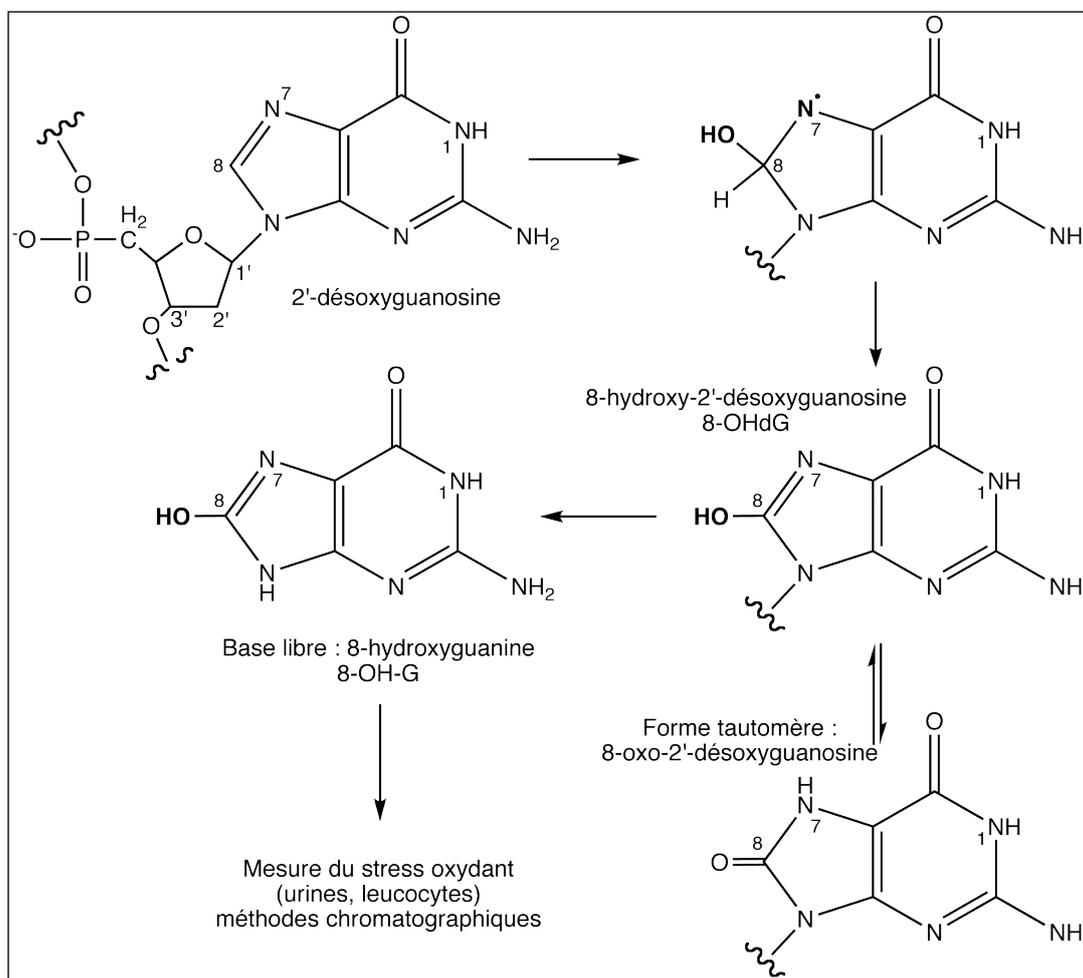


Figure 1.3 | Formation du 8-OH-G après oxydation de la désoxyguanosine par le radical hydroxyle. [15, 25, 28, 29]

À l'état physiologique, une désoxyguanosine sur 100 000 est ainsi oxydée. Le taux urinaire résiduel de la 8-OH-G (la base libre de la 8-OHdG) subit une augmentation franche lors d'un stress oxydatif. Afin d'apprécier l'importance du stress oxydant, il est possible d'exploiter en clinique les produits d'oxydation de l'ADN comme biomarqueurs car ils sont retrouvés dans les fluides biologiques (e.g., urine, sang). [25, 28] Des taux élevés de lésions oxydatives de l'ADN ayant été retrouvés dans plusieurs types de cancers, le 8-OH-G a été décrit comme marqueur (non spécifique) de la cancérogénèse. Les bases libres oxydées sont obtenues par digestion enzymatique ou hydrolyse

acide de l'ADN et sont ensuite mesurées grâce à la chromatographie couplée soit à la spectrométrie de masse soit à une détection électrochimique. [28, 29]

Les protéines quant à elles, peuvent faire l'objet de lésions oxydatives diverses. Dans un milieu aérobie, l'exposition des protéines aux radicaux hydroxyles peut conduire à la rupture des liaisons peptidiques. Ce clivage est consécutif à la formation de fonction carbonyle par arrachement d'un hydrogène sur le carbone  $\alpha$  d'une liaison peptidique (figure 1.4). [23, 25, 29]

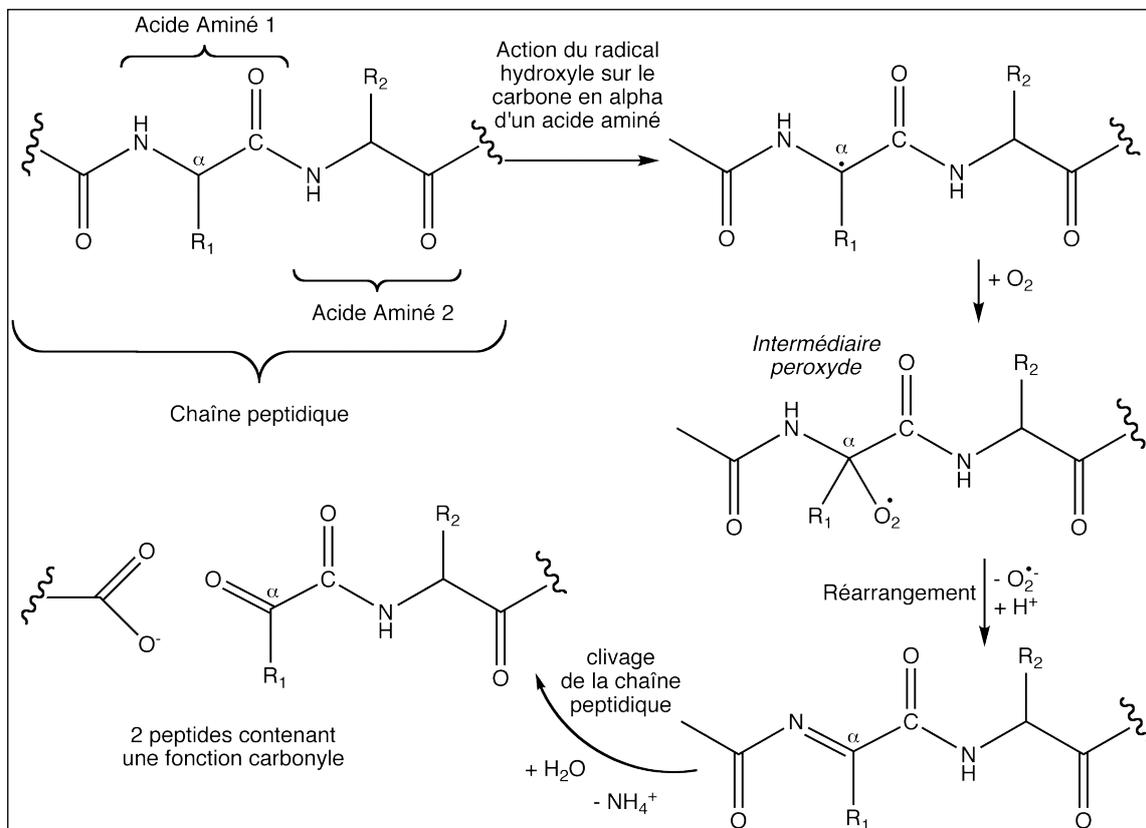


Figure 1.4 | Clivage des chaînes peptidiques par carbonylation. [25, 29]

Le radical hydroxyle peut attaquer les chaînes latérales des acides aminés et plus particulièrement celles des acides aminés soufrés (e.g., cystéine, méthionine), basiques (e.g., arginine, lysine, histidine) et aromatiques (e.g., thyrosine, phénylalanine, tryptophane). Il forme des fonctions sulféniques par oxydation du groupement thiol de la cystéine. Si cette nouvelle fonction réagit avec un thiol voisin sur la chaîne polypeptidique, la structure protéique tridimensionnelle peut s'en retrouver bouleversée par la création de pont disulfure. L'oxydation de la méthionine crée une fonction sulfoxyde. [23, 29] Certains auteurs ont montré que l'oxydation de la méthionine constitue un moyen de protection contre l'oxydation. Cette oxydation est en effet temporaire et réversible par le biais d'une enzyme : la méthionine sulfoxyde réductase. Elle permet alors d'éviter l'oxydation d'autres acides aminés. [30] Quant aux modifications apportées par l'oxydation de la thyrosine, elles sont en général irréversibles et sont capables d'inactiver les protéines. L'ensemble des catégories de protéi-

nes nécessaires au bon fonctionnement cellulaire sont des cibles potentielles de ces attaques radicalaires. Des enzymes aux protéines structurales, en passant par les facteurs de transcription, ils sont tous susceptibles d'être dégradés par la voie du protéasome car ils ne seront plus considérés par la cellule comme fonctionnels. <sup>[23, 29]</sup> Une seule attaque ne suffit pas forcément pour inactiver une protéine, car la structure tridimensionnelle des protéines protège en partie des attaques radicalaires. En effet, il apparaît que les sites catalytiques se retrouvent à « l'abri », situés dans des zones profondes des chaînes polypeptidiques et donc moins sensibles aux attaques. <sup>[23]</sup>

Pour conclure de l'activité du radical hydroxyle sur les biomolécules, il reste à analyser sa réactivité sur les lipides. Quand on s'intéresse à cette catégorie de biomolécules, on pense nécessairement à leur importance dans le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires. Les doubles liaisons des acides gras insaturés portés par les phospholipides membranaires sont des parties très sensibles aux dommages oxydatifs. Cependant, les membranes cellulaires restent distantes des sites de production des ERO et ces dernières ont une réactivité limitée en raison de leur faible capacité à diffuser dans la cellule. Les membranes devraient donc être épargnées des attaques radicalaires. Or elles sont soumises à la peroxydation lipidique, réaction qui comporte trois étapes clefs : l'initiation, la propagation et la terminaison. Selon plusieurs auteurs, la présence simultanée de fer ferreux, de fer ferrique et d'oxygène permet d'initier la réaction. <sup>[31, 32]</sup> Les réactions en chaîne engagées conduisent alors à la formation d'espèces intermédiaires réactives permettant la propagation : les peroxydes et les hydroperoxydes de lipides (figure 1.5). La terminaison aboutit à la formation de produits de dégradation divers et très toxiques. Par exemple, les aldéhydes dont les plus importants sont le 4-hydroxy-2-nonal et le malonedialdéhyde sont des produits très réactifs et utilisés comme marqueurs du stress oxydant. Ces aldéhydes peuvent former des adduits hautement mutagènes sur les groupements aminés exocycliques des bases de l'ADN. <sup>[25, 29, 33]</sup> Les ERO produites par le stress oxydant peuvent donc attaquer l'ADN directement ou indirectement. Dans les deux cas la conséquence reste la même, si les mécanismes de compensation ne suffisent pas, l'intégrité du génome ne pourra être conservée. Il a été démontré que la persistance d'un stress oxydatif associé un excès de peroxydation lipidique joue un rôle dans la genèse de certains cancers, notamment ceux à composante inflammatoire. <sup>[34, 35]</sup> Les données récentes suggèrent que ces adduits soient utilisés comme biomarqueurs pour étudier le rôle du stress oxydant dans les cancers associés à des infections chroniques, et certains processus inflammatoires. Par ailleurs, ils pourraient être utilisés pour évaluer la progression de maladies chroniques et évaluer le risque de cancer. <sup>[35]</sup> La peroxydation lipidique a une répercussion importante sur les propriétés de la membrane cellulaire, elle entraîne entre autre, une perte de fluidité conséquente et une modification de la perméabilité. <sup>[25]</sup>

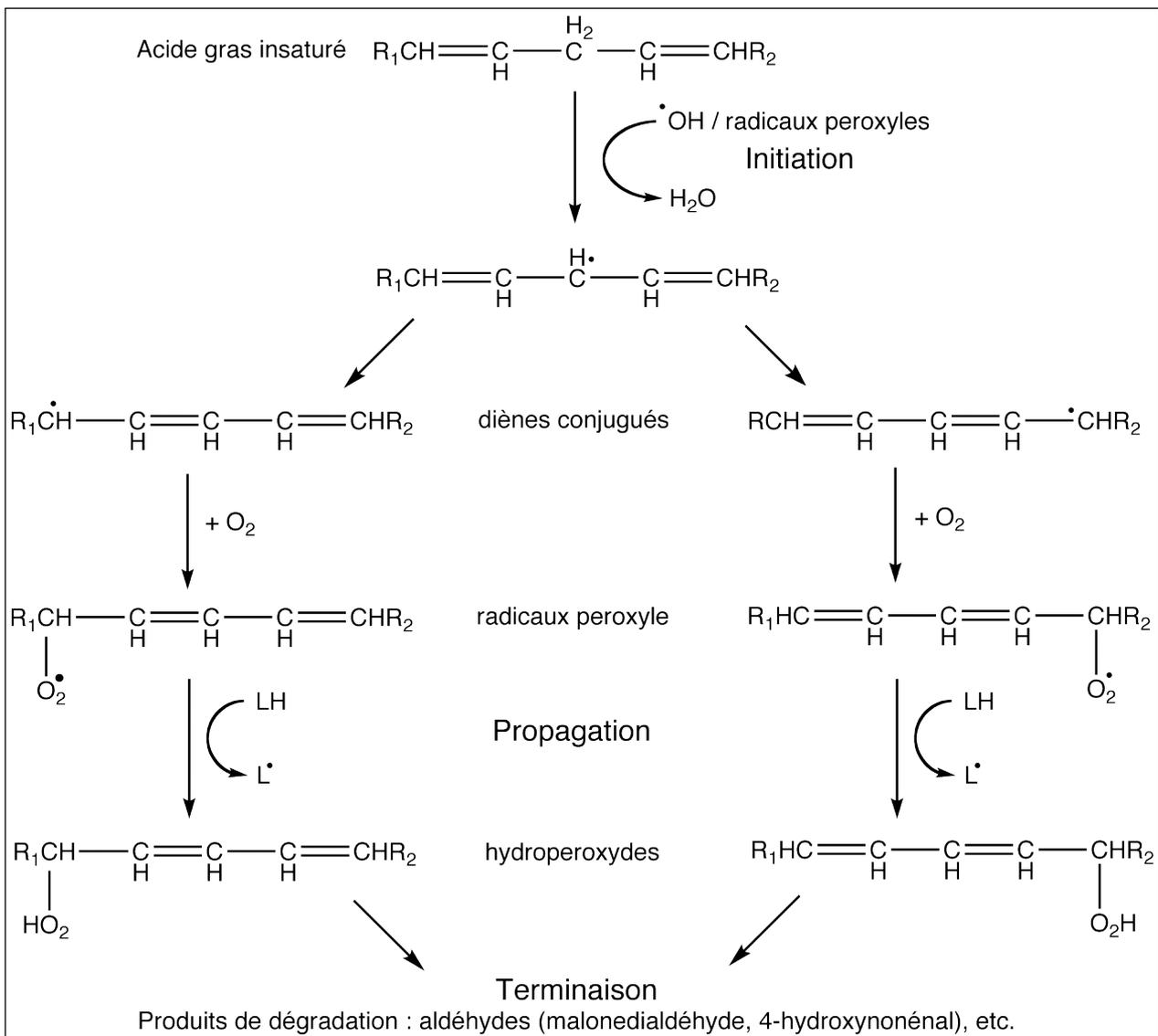
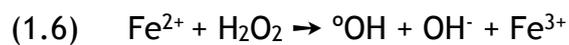


Figure 1.5 | Mode réactionnel de la peroxydation lipidique. [25]

### ♦ Synthèse

Le radical hydroxyle est formé en majorité par la réaction de Fenton à partir du peroxyde d'hydrogène qui réagit très rapidement avec les cations métalliques, notamment avec les ions ferreux (réaction 1.6). [12, 25]

#### Réaction 1.6 | Réaction de Fenton.



Physiologiquement, les ions métalliques sont retrouvés en faibles quantités car ils sont fixés à des protéines porteuses tel que la ferritine. Mais leur concentration peut être augmentée dans certaines situations comme sur les sites inflammatoires. [20]

#### 1.4. Le peroxyde d'hydrogène

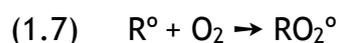
C'est l'ERO endogène la plus abondante. Le peroxyde d'hydrogène est une espèce non radicalaire et possède un faible potentiel oxydant. Cela ne l'empêche pas de causer des dommages oxydatifs aux protéines qui possèdent un groupement thiol. La propriété la plus intéressante du peroxyde d'hydrogène réside en sa capacité à diffuser librement dans le cytoplasme et au travers des membranes du fait de sa stabilité. Cette propriété lui confère le grade de second messager dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. Il est par exemple impliqué dans la régulation de certains gènes par le biais de facteurs de transcription comme le NF- $\kappa$ B. [15, 36] La réaction (1.1) est à l'origine de la production majeure du peroxyde d'hydrogène par dismutation du radical superoxyde catalysée par la SOD. [12, 15] Dans l'organisme, le peroxyde d'hydrogène peut également être produit par l'action de différentes enzymes comme la xanthine oxydase (XO) qui catalyse dans les conditions normales la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique. Lors de cette réaction, l'oxygène est réduit simultanément en peroxyde d'hydrogène et en radical superoxyde. Certaines études relatent une augmentation du taux de xanthine oxydase à la suite de traumatismes cellulaires ou de privation en oxygène, qui peut être la source d'un stress oxydant.

Les microsomes et les peroxysomes produisent physiologiquement d'importantes quantités de peroxyde d'hydrogène. Des systèmes enzymatiques sont donc nécessaires en cas de surproduction. Deux systèmes, les catalases et les glutathion peroxydases, permettent de réduire le peroxyde d'hydrogène en espèces non réactives.

#### 1.5. Les radicaux peroxyes, les hydroperoxydes et les radicaux alkoxyes

Leur synthèse est consécutive à l'addition de dioxygène sur des sites radicalaires carbonés, eux-mêmes formés par attaque de radicaux hydroxyes (figure 1.5 ; réaction 1.7 ; réaction 1.8). Il s'agit d'intermédiaires radicalaires classés comme ERO. Leur existence est liée à la présence dans le milieu vivant de dioxygène dissout qui modifie profondément le devenir des radicaux libres. En effet, l'O<sub>2</sub> permet d'entretenir les réactions en chaînes.

Réaction 1.7 | Synthèse des radicaux peroxyes.



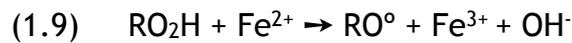
Cette réaction est spontanée en milieu aérobie avec une constante de vitesse de l'ordre de 10<sup>8</sup> à 10<sup>9</sup> mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>.

Réaction 1.8 | Synthèse des hydroperoxydes.



La synthèse de radicaux alkoxyyles nécessite la présence de fer ferreux et emprunte un mécanisme réactionnel de type Fenton (réaction 1.9).

Réaction 1.9 | Synthèse des radicaux alkoxyyles.



Les constantes de vitesses réactionnelles avec les biomolécules sont assez élevées, ce qui procure aux radicaux alkoxyyles une toxicité directe. La peroxydation lipidique inducible par les radicaux hydroxyyles ou par des radicaux peroxyyles eux-mêmes est une source importante de production de radicaux peroxyyles et alkoxyyles. Ces réactions entraînent des dommages par propagation radicalaire.

## 2. Les espèces réactives de l'azote (ERN)

Les ERO ne sont pas les seuls radicaux libres du milieu cellulaire. Le monoxyde d'azote radicalaire  $^\bullet\text{NO}$  est produit à partir d'arginine par la NO-synthase (NOS) dans l'organisme à différents niveaux. À l'instar des ERO, cette espèce radicalaire joue un rôle considérable dans les processus physiologiques mais également dans certains événements physiopathologiques. Le peroxy-nitrite retrouvé à la croisée des chemins entre ERO et des espèces réactives de l'azote (ERN), résulte de l'addition du radical superoxyde au monoxyde d'azote (figure 1.7).

### 2.1. Le monoxyde d'azote

Il comporte de nombreuses fonctions physiologiques : régulation du tonus musculaire, défense contre les agents infectieux, maintien de la pression sanguine et agent de prévention de l'agrégation plaquettaire. Il est synthétisé par une famille de métalloenzymes à groupement hémique : les NO-synthases (NOS) (figure 1.6).

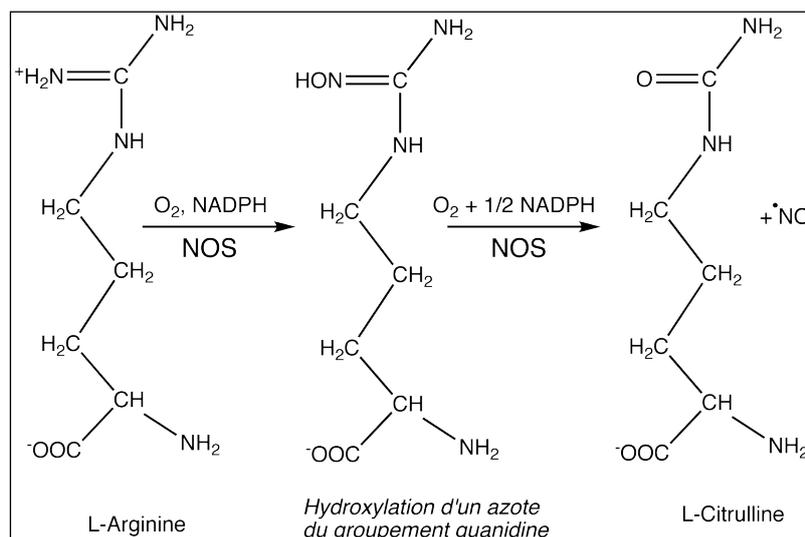


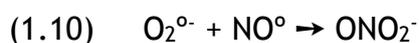
Figure 1.6 | Production de monoxyde d'azote par les NO-synthases à partir de L-arginine. [25, 27]

Le monoxyde d'azote est à l'origine de plusieurs produits qui peuvent créer des dommages oxydatifs sur l'ADN. Le peroxydinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), le nitrosoperoxycarbonate ( $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$ ), et le trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) peuvent réagir directement avec les bases de l'ADN pour former des dérivés nitrés. Tout comme les NOX et la XO, les NOS peuvent être régulées au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. La NO-synthase inductible (iNOS), une des isoformes des NOS, est capable de produire de grandes quantités de monoxyde d'azote dans les tissus inflammatoires via l'activation de cytokines et du NF- $\kappa$ B. Les ERO sont également capables d'induire la transcription du gène codant pour la iNOS via une activation du NF- $\kappa$ B. [25, 27] Des concentrations croissantes en monoxyde d'azote consécutives à une surexpression de l'isoforme iNOS ont été rapportées de manière significative dans divers cancers humains. Ce phénomène est d'ailleurs un facteur de mauvais pronostic des tumeurs primaires au regard de leur susceptibilité à la dissémination. En effet, le monoxyde d'azote a été incriminé dans certains phénomènes de remaniement vasculaire au sein des tumeurs, leur permettant une croissance rapide. Toutefois, de très fortes concentrations de NO conduisent à l'apoptose des tumeurs solides. [34, 37] Le monoxyde d'azote est une molécule fondamentale du développement, de la progression mais également du traitement du cancer. Cette espèce peut agir en fonction de sa concentration soit comme inhibiteur soit comme inducteur de l'apoptose. De faibles concentrations inhibent les voies de signalisation cellulaire conduisant à l'apoptose (e.g voie des caspases), tandis que des concentrations plus élevées les promeuvent. [38]

## 2.2. Le peroxydinitrite

Cette espèce se forme par combinaison du monoxyde d'azote avec le radical superoxyde (réaction 1.10).

Réaction 1.10 | Synthèse du peroxydinitrite.

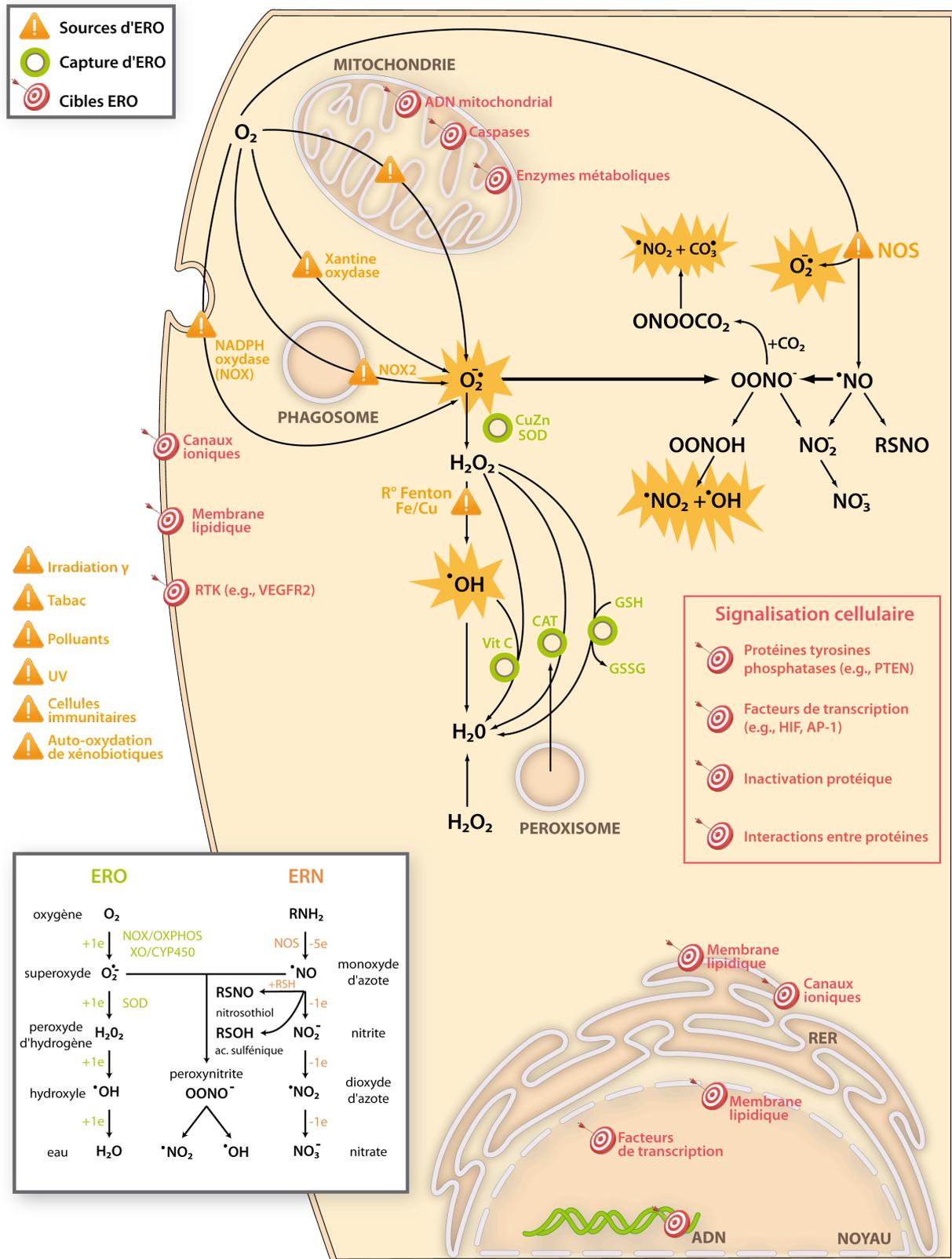


Le peroxydinitrite possède une réactivité assez proche de celle du radical hydroxyle dans le sens où il est responsable de dommages importants infligés aux biomolécules. Mais il possède la stabilité du peroxyde d'hydrogène car cette espèce n'est pas radicalaire. Il peut conduire à des modifications mutagènes de l'ADN (e.g., rupture de brin, modification de bases), initier la peroxydation lipidique et causer des modifications protéiques (acides aminés aromatiques et soufrés). Cette ERN possède une grande affinité pour les groupements thiols des protéines ce qui la rend nocive envers le glutathion. Ainsi le peroxydinitrite peut désactiver ce système antioxydant enzymatique et devenir responsable de dommages oxydatifs intracellulaires via les ERO. Le peroxydinitrite est incriminé à la fois dans l'augmentation du risque cancérogène et dans la mort cellulaire. [39] Cette espèce peut engen-

drer des radicaux libres très oxydants :  $^{\circ}\text{NO}_2$  et  $^{\circ}\text{OH}$ . Les polypeptides peuvent être soumis à l'addition de  $\text{NO}_2^{\circ}$  sur des résidus tyrosine formant la 3-nitrotyrosine. À l'issue de cette réaction, les polypeptides modifiés sont dirigés vers le protéasome et la 3-nitrotyrosine est retrouvée dans les fluides biologiques : c'est un marqueur du stress oxydant. L'addition de  $\text{CO}_2$  au peroxy-nitrite conduit à la formation d'un produit instable qui se décompose en deux radicaux libres très réactifs  $^{\circ}\text{NO}_2$  et  $\text{CO}_3^{\circ}$  susceptibles à leur tour d'engendrer des dommages vis-à-vis des biomolécules.

Les ERO tout comme les ERN ont une toxicité directe envers les biomolécules via le radical hydroxyle, le peroxy-nitrite et leurs produits de décomposition radicalaire. Les ERN et ERO agissent en synergie et potentialisent le stress oxydatif. La figure 1.7 résume la réactivité des espèces de l'oxygène et de l'azote. Elle dévoile également les thèmes abordés dans les deux prochaines parties, à savoir : la mise en place de mécanismes de régulation des ERO/ERN et les cibles des ERO/ERN favorisant le développement des phénotypes tumoraux.

**Figure 1.7 Réactivité des Espèces de l'Oxygène et de l'Azote** [12, 16, 25, 29, 40, 41, 42, 43]



PHÉNOMÈNES D'OXYDATION  
CELLULAIRE ET MÉCANISMES  
DE COMPENSATION

Les phénomènes d'oxydation sont nécessaires afin que l'organisme puisse produire de l'énergie et assurer une partie de la signalisation cellulaire. Lors de ces réactions physiologiques, certaines espèces réactives telles que les ERO et ERN peuvent être produites. [44] Une seule cellule de l'organisme est soumise à environ  $1,5 \cdot 10^5$  attaques oxydatives par jour, initiées par les radicaux hydroxyles et autres espèces réactives. [28] Les mécanismes de compensation des lésions oxydatives sont donc indispensables au maintien de l'intégrité cellulaire. Les cellules sont capables de synthétiser en réponse aux agressions oxydantes des entités antioxydantes soit enzymatiques, soit issues du métabolisme. Toutefois, un certain nombre d'antioxydants présents dans notre organisme sont exogènes et proviennent de la présence dans notre alimentation de fruits et légumes (e.g., polyphénols, alpha-tocophérol, acide ascorbique, caroténoïdes). [44]

## 1. Les antioxydants enzymatiques (AE)

Il s'agit de systèmes enzymatiques dont l'activité peut être régulée par différents événements. Leur taux peut croître par up-régulation à mesure que le stress oxydant se fait ressentir dans une cellule. [24, 45] Ils peuvent de cette façon pallier immédiatement à une agression oxydative ponctuelle sans être subordonnés à un apport exogène. Cette caractéristique les différencie des antioxydants non enzymatiques qui sont nécessairement soumis à l'alimentation ou aux stocks cellulaires. Comme le démontrent plusieurs auteurs, l'intégrité des AE est donc primordiale pour la survie. [25, 44, 45]

### 1.1. Les superoxydes dismutases

#### 1.1.1. Généralités

Cela fait à peine plus de 40 ans que ces AE ont été découverts. Les SOD catalysent la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène [réaction (1.1)]. Il s'agit de la réaction enzymatique la plus rapide de toutes les réactions catalysées par des enzymes connues à ce jour. En effet, la constante de vitesse de  $\sim 7 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  flirte avec la valeur limite supérieure imposée par la diffusion des molécules ( $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ). [23, 44] Le statut de ces enzymes est ambigu, d'un côté elles permettent l'élimination de la forme radicalaire élémentaire de l'oxygène la moins réactive :  $\text{O}_2^\bullet$  et d'un autre elles créent à distance une ERO diffusible et toxique car plus réactive. La synthèse des SOD est régulée par le produit de catalyse, c'est à dire la concentration cellulaire en peroxyde d'hydrogène. La nature des SOD varie en fonction de leur lieu d'activité. La mitochondrie abrite la forme à manganèse Mn SOD, tandis que le cytosol et le milieu extracellulaire voient évoluer la forme cuivre-zinc CuZn SOD. Ce sont des enzymes indispensables à la survie de tout organisme aérobie. [25, 45] Des modèles murins exonérés du patrimoine génétique leur permettant de synthétiser les Mn SOD (i.e., souris knock-out) meurent au cours de leurs dix premiers jours de vie avec un tableau de cardiomyopathie dilatée associé à une accumulation de lipides dans les muscles et le foie,

et une acidose métabolique. La Mn SOD est le principal acteur de l'évacuation des radicaux superoxydes au sein de la mitochondrie. D'autres expériences ont montré que l'absence de CuZn SOD reste compatible avec la vie de modèles murins qui présentent toutefois des anomalies du développement musculaire et une surmortalité engendrée par une incidence accrue d'hépatocarcinomes. [25, 44-46] La perte de l'intégrité des SOD peut être à l'origine de plusieurs processus physiopathologiques. Par exemple, la mutation du gène codant pour la CuZn SOD est impliquée dans une forme de sclérose latérale amyotrophique. [47] Dans cette pathologie, la capacité antioxydante de la SOD est diminuée par glycation, la génération des ERO n'est donc plus sous contrôle et crée un stress oxydant. Plusieurs études ont montré que ce mécanisme peut être responsable de mort cellulaire par apoptose de cellules neuronales. [13, 46]

### 1.1.2. Mn SOD et cancer

Les cellules cancéreuses ont comme caractéristique commune de voir l'activité de leur SOD diminuer par rapport aux cellules saines. [48, 49] À un stade précoce du développement cancéreux, la faible teneur en Mn SOD favorise les dommages oxydatifs de l'ADN et de la cellule. [45] Les différents processus à l'origine de la faible expression de Mn SOD sont multiples et similaires à ceux qui perturbent l'expression des gènes suppresseurs de tumeur. Dans certaines cellules cancéreuses, il s'agit d'une mutation au niveau du promoteur du gène codant pour la Mn SOD alors qu'au sein d'autres lignées le phénomène est consécutif à une importante méthylation ou une mutation sur la séquence codante. [49] De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (modèles murins) portant sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines très diverses ont montré que la surexpression des Mn SOD (présence de 5 fois plus d'enzyme) conduisait à la suppression de la croissance cellulaire. De plus, pour l'ensemble de ces types tumoraux testés, une partie des cellules perdait leur phénotype malin. Ces études ont été réalisées en utilisant des techniques de thérapie génique par transfert de cDNA. [50] À l'inverse, des souris transgéniques hétérozygotes présentant une réduction de 50% de l'activité des Mn SOD sont confrontés à une incidence plus importante de cancer. À la suite de ces expériences, il a été établi que certains mélanomes cutanés sont associés à la perte d'hétérozygotie pour la Mn SOD. [51] C'est pourquoi, les Mn SOD ont été qualifiées de protéines « suppresseur de tumeurs » au regard de leur rôle de défense contre les pro-oxydants et contre les cellules tumorales à croissance rapide. [49, 52] Il est démontré que l'effet « suppresseur » de tumeurs est étroitement lié à l'activité enzymatique des Mn SOD. Cette donnée est confortée par l'étude des différentes versions génétiques existantes pour la Mn SOD. Il existe un polymorphisme caractérisé par la présence d'une substitution d'une valine (Val) par une alanine (Ala) au sein de la chaîne polypeptidique de la Mn SOD. Les deux versions de la protéine sont fonctionnelles, mais la substitution altère le transport de la Mn SOD dans la mitochondrie et modifie la capacité de l'hôte à lutter contre le stress

oxydant. Dans une étude cas-témoin, les femmes en préménopause homozygotes *MnSOD<sup>Ala/Ala</sup>* pour l'allèle codant une Mn SOD avec une alanine ont montré un risque de cancer du sein 4 fois plus élevé que les femmes hétérozygotes *MnSOD<sup>Ala/Val</sup>* ou homozygotes *MnSOD<sup>Val/Val</sup>* pour la version codant la valine (Odds ratio : 4,3 ; IC<sub>95%</sub> : 1,7-10,8). La même étude a montré que ce risque pouvait néanmoins être soit augmenté soit limité par une consommation enrichie en antioxydants d'origine alimentaire contenus dans les fruits et légumes. Les données montrent que la faible consommation en vitamine C est associée à un risque presque 8 fois plus élevé de déclarer un cancer du sein pour les femmes en préménopause avec le génotype homozygote *MnSOD<sup>Ala/Ala</sup>* (Odds ratio : 7,7 ; IC<sub>95%</sub> : 2,5-23,9). Inversement, une consommation suffisante en fruits et légumes ou en antioxydants ne suffit pas à gommer ce polymorphisme génétique même si elle peut le réduire. Ainsi, les personnes présentant une Mn SOD moins active sont plus exposées au risque de cancérogenèse. [53] Cette étude apporte une notion supplémentaire à notre sujet en réduisant l'intérêt d'une supplémentation systématique en antioxydants sans toutefois en exclure la pertinence : nous ne sommes pas tous égaux face au stress oxydant.

La littérature scientifique établit clairement une corrélation entre radicaux libres, antioxydants enzymatiques et cancer. Mais cette corrélation est peu informative quant aux mécanismes à l'origine de l'effet suppresseur de tumeurs des SOD. Deux cas de figure permettent de définir deux mécanismes d'action distincts des SOD. Dans le cas illustré précédemment par un défaut en Mn SOD, l'absence de régulation du taux de radicaux superoxydes responsables de dommages oxydatifs semble favoriser l'induction et la promotion du cancer. Cette intuition est validée par le fait qu'une expression suffisante de SOD inhibe la transformation maligne des cellules. Le deuxième cas de figure fait référence aux situations de surexpression en Mn SOD. Dans ces cas particuliers, l'équilibre du rapport  $[O_2^{\bullet-}/H_2O_2]$  est perturbé au bénéfice d'une augmentation intracellulaire de  $H_2O_2$ , modifiant inmanquablement le statut rédox cellulaire. Les autres AE responsables de la prise en charge du  $H_2O_2$  (e.g., catalase, glutathion peroxydase) sont submergés. La surproduction consécutive de  $H_2O_2$  est étroitement impliquée dans l'inhibition des voies de signalisation cellulaire responsables de la prolifération. D'autre part, une accumulation importante de  $H_2O_2$  peut déclencher l'apoptose cellulaire. La modification du statut rédox cellulaire par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène à la suite d'une surexpression en Mn SOD est donc en mesure d'agir comme suppresseur de la croissance tumorale. [44, 49, 54]

La prise en charge des ERO fait donc l'objet d'une régulation fine. Une prise en charge trop faible des radicaux superoxydes par les SOD favorise la mutagenèse tandis qu'un déploiement massif des mécanismes antioxydants possède des effets anticancéreux.

### 1.1.3. CuZn SOD et cancer

La CuZn SOD possède un rôle important dans les phénomènes d'invasion cellulaire et métastatiques. En effet des études réalisées *in vitro* sur des cellules issues de carcinome ORL humain, montrent qu'une sous-expression de CuZn SOD confère aux cellules une plus grande motilité et donc une capacité à la dissémination. De même que la Mn SOD l'a montré, la surexpression de la CuZn SOD entraîne une inhibition de la croissance tumorale et peut annihiler une partie des phénotypes malins parmi les cellules cancéreuses. La surexpression de CuZn SOD est accompagnée d'une nette accentuation, 3 à 5 fois plus par rapport aux cellules parentales, de la production d'ERO. Le peroxyde d'hydrogène issu de la catalyse enzymatique médiée par les SOD doit être pris en charge par d'autres systèmes antioxydants enzymatiques (glutathion peroxydase et/ou catalase) capables de le transformer en espèce non réactive. Une trop faible teneur en SOD dans les cellules par rapport à ces AE entraîne une accumulation de radical superoxyde. De la même manière, un taux trop élevé de SOD par rapport à ces AE donne lieu à une surproduction de peroxyde d'hydrogène qui, ne pouvant être transformé en eau, est converti en radical hydroxyle via la réaction de Fenton. Les propriétés antitumorales d'une surexpression en CuZn SOD sont donc intimement liées à l'accumulation d'ERO au sein de la cellule. Cette donnée a été renforcée par la confrontation des résultats exposés précédemment à ceux obtenus avec des cellules tumorales qui surexpriment à la fois les CuZn SOD et la glutathion peroxydase. Ces dernières n'ont pas vu leur croissance ralentir, et cela s'explique par la faible valeur du rapport [SOD/glutathion peroxydase] qui ne permet pas l'accumulation de peroxyde d'hydrogène. <sup>[50]</sup>

Bien que le rôle des SOD dans la prise en charge des ERO est considérable, le rôle des autres antioxydants enzymatiques leur est indissociable afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène issu de la catalyse enzymatique : il s'agit des glutathion peroxydases et des catalases.

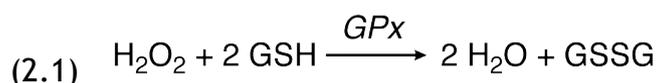
## 1.2. Les glutathion peroxydases (GPx)

### 1.2.1. Généralités

La GPx a été découverte un peu plus tôt que la SOD en 1957, et a été décrite comme une enzyme capable de protéger l'hémoglobine des dommages oxydatifs dans les érythrocytes. Depuis, cinq de ces enzymes à sélénium ont été identifiés chez l'homme, elles sont notées GPx1 à GPx4 et GPx6. Ces enzymes contiennent un acide aminé (AA) rare au niveau de leur site catalytique : la sélénocystéine (Sec). Seules 30 protéines se partagent l'exclusivité de cet AA. Contrairement aux autres AA rares, la Sec est directement incorporée lors de la synthèse peptidique, et n'est donc pas le fruit d'une maturation post-traductionnelle. La Sec est codée au niveau du génome par un « agent double » : le codon UGA qui sert à la fois de codon stop et code également la sélénocystéine. <sup>[55]</sup> GPx1

et GPx2 sont des enzymes intracellulaires très proches en terme de structure et de spécificité pour le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes d'acides gras. La GPx3 est une enzyme extra cellulaire glycosylée et sécrétée dans le plasma, elle utilise la thiorédoxine en plus du glutathion comme donneur d'électrons afin d'élargir l'éventail de substrats à réduire (hydroperoxydes d'acides gras et hydroperoxydes de phospholipides). La GPx4 exprimée dans la muqueuse gastrointestinale est la seule à pouvoir réduire certains hydroperoxydes lipidiques complexes comme les hydroperoxydes de cholestérol et de thymine. De plus, la GPx4 agit en synergie avec la vitamine E au sein des membranes cellulaires afin de prévenir la peroxydation lipidique. Dans le génome, le gène codant pour la GPx4 fait l'objet d'épissages différents et donne lieu à une forme cytosolique, mitochondriale et nucléaire de la GPx4. La GPx6 est retrouvée au niveau des muqueuses olfactives. GPx1 et GPx3 sont rapidement dégradées lors d'un déficit en Se, tandis que GPx2 et GPx4 vont mieux résister aux fluctuations de Se. <sup>[56]</sup> À la différence des SOD, les GPx permettent de prendre en charge des ERO (peroxyde d'hydrogène, et hydroperoxydes lipidiques) pour les transformer en espèce non réactive (eau) par réduction. Pour y parvenir, les GPx font appel au glutathion comme cofacteur réactionnel permettant de fournir les protons nécessaires à la réduction (réaction 2.1).

Réaction 2.1 | Réaction catalysée par les glutathion peroxydases.



Cette réaction est extrêmement rapide (constante de vitesse  $\sim 10^7 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$ ) ce qui garantit l'élimination immédiate du peroxyde d'hydrogène quand sa concentration devient trop importante et dangereuse. Les SOD et les GPx sont donc des enzymes indissociables de la régulation du stress oxydant car leur mode d'action est complémentaire et indispensable pour éliminer complètement les ERO. Toutefois afin de fonctionner à plein régime les GPx ont besoin de plusieurs enzymes secondaires (glutathion réductase et glucose-6-phosphate deshydrogénase) ainsi que de cofacteurs (glutathion réduit, NADPH, et glucose-6-phosphate) afin de pérenniser leur action.

### 1.2.2. GPx et cancer

**GPx et carcinome épidermoïde ORL.** Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression de Mn SOD est capable de lutter contre la croissance de tumeurs. Il est donc légitime de prêter attention à la réponse d'une surexpression de GPx au sein de cellules cancéreuses. Les études *in vitro* effectuées sur des cellules issues de carcinome épidermoïde ORL humain, ont montré que la surexpression de GPx pouvait contrebalancer l'effet anticancéreux d'une surexpression de Mn SOD. D'autres études vont également en ce sens car, toujours sur les mêmes lignées cellulaires, l'inhibition indirecte de la GPx par le BCNU (agent anticancéreux alkylant : la carmustine) potentialise

l'effet anti-prolifératif consécutif à la surexpression de la Mn SOD. <sup>[57]</sup> Mais étonnement, en fonction des lignées cancéreuses étudiées, cet antagonisme d'action peut être substitué par un effet synergique.

**GPx et adénocarcinomes pancréatiques.** C'est le cas d'adénocarcinomes pancréatiques qui présentent des taux de Mn SOD et de GPx plus faibles comparativement aux cellules saines. *In vitro* et *in vivo*, la surexpression de GPx empêche la croissance de ces cellules. De manière inattendue, la combinaison d'une surexpression des Mn SOD et des GPx au sein de ces lignées est plus efficace sur l'inhibition de la croissance tumorale qu'une surexpression séparée. Cette double surexpression a même augmenté la survie des modèles murins. Le gène codant pour le GPx a donc été qualifié de gène suppresseur de tumeurs pancréatiques par les auteurs. <sup>[58]</sup> La contradiction avec les études précédentes peut être expliquée entre autre par une biologie tumorale particulière des adénocarcinomes pancréatiques, liée notamment à la présence d'une mutation de l'oncogène K-Ras présent dans plus de 85% des cas. Cette mutation entraîne une activation permanente de la protéine Ras. <sup>[59]</sup> Or l'activation de RAS déclenche une augmentation de la production intracellulaire d'ERO et notamment de peroxyde d'hydrogène. Cette augmentation d'ERO médiée par l'oncogène Ras a même été associée à une transformation cellulaire importante et dangereuse. En effet, l'accroissement modéré d'ERO engendre des modifications de la forme cellulaire, de l'organisation du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire permettant aux cellules cancéreuses d'évoluer vers un stade métastatique. <sup>[60]</sup> Encore une fois le peroxyde d'hydrogène est incriminé. Quand il ne participe pas à la destruction cellulaire, sa relative stabilité lui confère des propriétés d'intermédiaire dans les voies signalétiques impliquées lors de différents processus de prolifération.

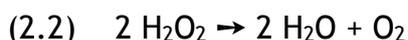
**GPx3 et cancer.** Une étude très récente s'est intéressée à la GPx plasmatique : la GPx3. Il s'agit de l'espèce antioxydante enzymatique la plus importante du plasma. Elle est facilement détectable dans le plasma et les muqueuses. La perte de l'expression de cet AE par hyperméthylation de sa séquence promotrice est fréquemment observée dans de nombreux cancers humains (étude *in vitro*). La méthylation du promoteur a été corrélée aux cancers « tête et cou » chimiorésistants (étude *in vivo*). L'état de méthylation du GPx3 pourrait donc servir d'indicateur pronostique chez les patients traités afin d'ajuster au mieux la thérapeutique. Le mécanisme selon lequel l'inactivation du GPx3 contribue à la chimiorésistance n'a pas bien été défini. Les auteurs supposent que l'inactivation du GPx3 pourrait conduire à la surexpression d'autres mécanismes compensatoires neutralisant alors l'augmentation d'ERO induite par les chimiothérapies. En accord avec cette hypothèse, une surexpression des GPx1 a été retrouvée dans les lignées cellulaires comportant une GPx3 hyperméthylée. La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des chimiorésistances est fondamentale pour développer de nouvelles stratégies dans le traitement des tumeurs. Il semble dès lors évident

que cette compréhension passe en partie par l'étude des phénomènes de compensation du stress oxydant.

### 1.3. Les catalases

L'action combinée des GPx et des CAT représente l'essentiel de l'activité peroxydasique intracellulaire. Découverte il y a presque deux siècles, cette enzyme catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène avec une rapidité semblable à l'action des GPx (réaction 2.2). [61]

Réaction 2.2 | Décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase.



Les CAT peuvent également détoxifier d'autres substrats tels que les phénols et les alcools, par une réaction couplée à la réduction du peroxyde d'hydrogène. La liaison des CAT au NADPH leur assure une protection contre une éventuelle inactivation et augmente leur efficacité. [62] Les CAT sont constituées de 4 chaînes peptidiques d'environ 500 acides aminés contenant chacune un noyau héminique responsable de l'activité enzymatique. Lors de la réaction enzymatique, l'atome de fer présent au centre du noyau héminique est successivement oxydé (Fe VI), puis réduit (Fe III) afin de retourner à l'état initial. La structure particulière en homotétramère confère aux CAT une plus grande stabilité et rigidité par rapport aux autres AE. De plus, elles résistent mieux aux variations de pH, de température ainsi qu'à la protéolyse. Ces capacités concordent avec une activité surtout retrouvée dans les peroxysomes (organites cellulaires riches en peroxyde d'hydrogène) où elles éliminent l'excès de peroxyde d'hydrogène. [49, 61, 63] La quantité de CAT disponible dans le cytoplasme et dans les organites cellulaires est difficile à estimer en raison des ruptures fréquentes des peroxysomes lors des mesures. Des études, dont certaines ont été détaillées plus haut, soulignent l'implication du peroxyde d'hydrogène dans l'induction de la mort cellulaire. Une partie des arguments ayant conduit à cette conclusion émanent d'études révélant que la supplémentation en antioxydants s'oppose à la mort cellulaire par capture des ERO. En outre, certaines expériences menées *in vitro* ont montré une action ambiguë de la CAT vis-à-vis de l'apoptose sur des lignées myéloïdes. D'une part, la CAT est capable d'atténuer les effets de différentes molécules anticancéreuses génératrices d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un médiateur de l'apoptose. [64] D'autre part, la CAT est capable de potentialiser l'apoptose cellulaire via un tout autre mécanisme impliquant l'inhibition de la surexpression des protéines de choc thermique HSP (heat-shock protein) lors d'un stress cellulaire. Les HSP, peuvent modifier les fonctions d'une large variété d'autres protéines en s'y fixant : ce sont des protéines chaperones. Elles sont naturellement présentes dans le cytosol mais peuvent faire l'objet d'une surexpression lors d'un stress (Choc

thermique, radicaux libres, métaux lourds). Les protéines HSP70 et HSP27 sont alors capables d'exercer une répression sur des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'apoptose cellulaire induite par l'activation des caspases. La CAT possède donc deux actions opposées sur l'apoptose cellulaire :

- une action antiapoptotique directe par capture des ERO ; [64]
- une action proapoptotique indirecte par inhibition des HSP. [65]

En ce qui concerne les cellules myéloïdes étudiées, la résultante de cette dualité d'action est en faveur du deuxième mécanisme et favorise donc l'apoptose lors d'un stress cellulaire. Toutefois les auteurs ont nuancé leur propos en concluant à une variabilité de cette « résultante » en fonction de la gestion du stress oxydatif exercé par le type cellulaire étudié. [65, 66] Cet exemple montre encore une fois l'importance de l'action des ERO dans des voies de signalisation cellulaire très variées.

La recherche sur les protéines chaperonnes a longtemps été controversée, notamment à cause de leur coût. Les rares équipes de recherche s'attachant à ce sujet n'ont d'ailleurs pas toujours été comprises par leurs pairs. Mais au mois d'août 2011, la célèbre revue *Nature* rapporte que ces protéines pourraient bien jouer un rôle clef dans le traitement de plusieurs maladies dont le cancer du sein résistant aux inhibiteurs de l'aromatase. À l'heure actuelle 20 molécules ciblant la HSP90 font l'objet d'essais cliniques. [67, 68]

#### 1.4. Conclusion

La description des AE établie ci-dessus est loin d'être exhaustive. Il a donc été choisi pour chaque AE d'explorer une partie des recherches actuelles ayant un rapport avec la biologie du cancer. L'intrication étroite entre AE et ERO est assez intéressante. En effet, les recherches décrites montrent que l'étude des AE permet de prendre la mesure de l'importance des effets des ERO et notamment du peroxyde d'hydrogène dans les processus cancéreux. La recherche fondamentale sur les ERO s'appuie donc en partie sur la biologie des AE. De nombreuses questions restent encore sans réponse dans le domaine de la biologie radicalaire, et laissent le champ libre à de nombreuses découvertes.

## 2. Systèmes tampons du potentiel rédox cellulaire

La production d'ERO modifie sensiblement les systèmes tampons du potentiel rédox cellulaire largement impliqués dans la signalisation cellulaire.

### 2.1. Le glutathion (GSH)

Le glutathion est la molécule soufrée la plus importante dans le cytosol avec une concentration avoisinant quelques millimoles ( $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>). [12, 16, 25] Hormis cette importance d'ordre quantitative, le GSH constitue un système antioxydant intracellulaire incontournable car ce tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) est le garant du statut rédox cellulaire. [41] Les cellules et les tissus sains possèdent un milieu intracellulaire réducteur dans lequel plus de 90% du glutathion est à l'état monomérique réduit (GSH). La forme oxydée est notée GSSG et correspond à un dimère de GSH dont les fonctions soufrées sont engagées dans un pont disulfure. Une augmentation permanente du ratio [GSSG/GSH] constitue un stress oxydant. [44] En plus de son rôle tampon dans l'équilibre rédox, le GSH est à même de neutraliser de nombreuses espèces réactives seul ou en tant que cofacteur des AE (i.e., GPx, CAT). Il peut également chélater le cuivre et donc inhiber ainsi la synthèse de radicaux hydroxyles via des réactions Fenton-like. Il est également apte à régénérer d'autres antioxydants indispensables tels que l'alpha-tocophérol et l'acide ascorbique. Une fois oxydé, le GSSG peut être réduit à l'aide d'une flavoenzyme NADPH dépendante appelée glutathion réductase. [62] Les stocks de GSH sont compartimentalisés en plusieurs pools dans la cellule. Cette répartition est faite entre le cytoplasme, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau, et permet d'augmenter la spécificité d'action du GSH. [69]

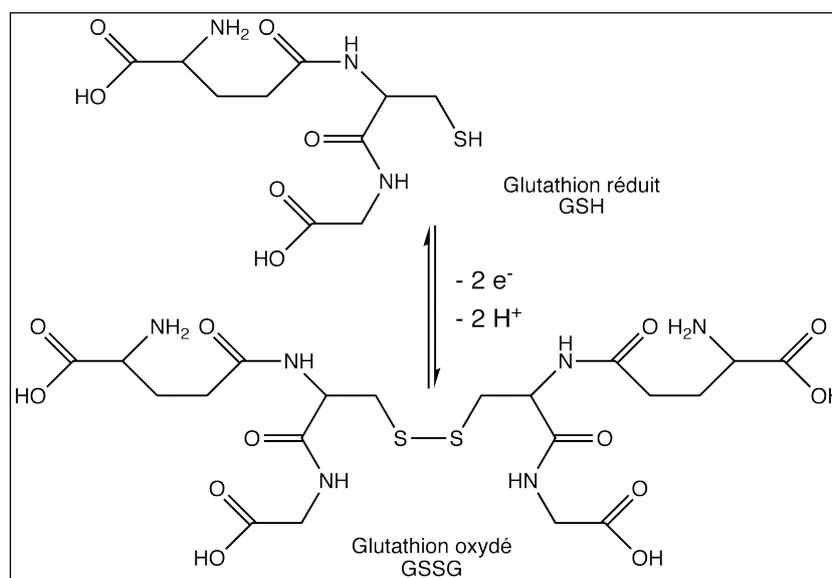


Figure 2.1 | Structure moléculaire du glutathion sous forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG). [25]

## 2.2. Le système thiorédoxine (Trx) - thiorédoxine réductase (TrxR)

La Trx est une petite protéine intracellulaire capable de réduire les ponts disulfures de protéines présentes dans le cytoplasme. Elle est retrouvée en faible concentration dans le milieu intracellulaire (i.e., 1-10  $\mu\text{M}$ ).<sup>[25]</sup> Trois variants de cette protéine sont présents chez l'homme et sont encodés par des gènes différents. La Trx-1 est le variant le plus étudié. La Trx-2 est une isoenzyme localisée dans la mitochondrie. Et pour finir la SpTrx est une forme exprimée en grande quantité dans les spermatozoïdes. Ces trois variants comportent une séquence conservée -Cys-Gly-Pro-Cys- essentielle pour leur activité enzymatique. La ribonucléotide réductase et certains facteurs de transcription (e.g., p53, NF- $\kappa$ B, AP-1) sont des cibles spécifiques pour les Trx. De plus, la forme réduite de la Trx permet d'inhiber l'apoptose par une liaison à l'ASK-1 (i.e., apoptosis signal-regulating kinase 1). L'implication de cette petite protéine dans les phénomènes physiopathologiques, dont le cancer, est considérable. Le stress oxydatif amplifie l'expression des Trx. Les Trx peuvent ainsi moduler les dommages cellulaires des ERO en réduisant les ponts protéiques disulfures créés et en diminuant directement le taux d'ERO. Au cours du stress oxydant, la Trx et d'autres antioxydants peuvent promouvoir le facteur AP-1 de part leur potentiel antioxydant. L'activité du NF- $\kappa$ B est inhibée par les Trx et par les autres antioxydants de manière dose-dépendante. Les doses micromolaires retrouvées en conditions physiologiques inhibent l'activité du NF- $\kappa$ B. Cependant au dessus de ces doses normales, le Trx fait l'objet d'une translocation vers le noyau au sein duquel il favorise la liaison entre le NF- $\kappa$ B et l'ADN par réduction d'un résidu cystéine.

Les isoenzymes de la TrxR sont des oxydoréductases NADPH-dépendantes. Ces enzymes sont capables de réduire une large variété de substrat en plus de la Trx-SS (Trx réduite). Ce sont des sélénoprotéines tout comme les GPx, mais il convient de noter une différence importante entre ces deux protéines. En effet au cours d'un cancer, une supplémentation en Se n'est pas suivie d'une augmentation significative de la GPx, tandis que l'activité de la TrxR y est très sensible.<sup>[62]</sup>

## 2.3. Les pyridines nucléotides

Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) sont des pyridines nucléotides dont l'état rédox est intimement lié à celui des GSH et des Trx. Les formes réduites du NAD et du NADP sont notées respectivement NADH et NADPH tandis que les formes oxydées sont notées NAD<sup>+</sup> et NADP<sup>+</sup>. Les pyridines nucléotides réduites sont des donneurs d'électrons qui permettent la régénération des stocks de GSH et Trx oxydés. De cette façon, les pyridines nucléotides participent à la protection de la cellule contre le stress oxydant. Le NAD est également associé à la synthèse d'ATP en raison de sa participation à la transduction de l'énergie par transport d'électrons au cours du métabolisme glucidique. Au niveau nucléaire, l'oxy-

dation soutenue du NAD concourt à la surexpression de proto-oncogènes à la suite d'un stress oxydant. Le NADP est quant à lui impliqué dans de nombreuses voies de biosynthèse nécessitant un apport d'électrons. Il est responsable de la production des ERO au niveau des NOX et de la chaîne de transport d'électrons. Toutefois, le NADPH constitue un élément indispensable nécessaire à la réduction du GSSG et du Trx-SS. D'ailleurs, la voie des pentoses phosphates est capable de produire du NADPH dans le but d'assurer une protection contre l'apoptose induite par le stress oxydatif. C'est une voie métabolique du glucose inductible par le métabolisme tumoral. [69, 70]

### 3. Les chélateurs de métaux

Il s'agit pour la majorité de protéines synthétisées par l'organisme. De nombreux antioxydants de faible poids moléculaire (e.g., acide ascorbique, alpha-tocophérol, glutathion, caroténoïdes, flavonoïdes) peuvent également chélater les métaux.

L'action antioxydante de ces éléments est non négligeable car ils préviennent la formation du radical hydroxyle par inhibition des réactions Fenton-like. Les métaux de transition (Cuivre, Fer, Manganèse, Zinc) ont une valence variable qui leur permet d'intervenir dans les réactions de transfert d'un seul électron à l'exemple de la réaction de Fenton. Ces métaux sont utilisés par les AE au sein de leur site catalytique. La réaction de Fenton est possible *in vivo* mais elle est confrontée à la présence des AE qui prennent en charge le peroxyde d'hydrogène, substrat de la réaction. De plus, la plupart des stocks de Fer et de Cuivre présents dans le milieu biologique ne sont pas mobilisables car ils sont séquestrés par les protéines chélatrices. Il s'agit entre autre de la céruloplasmine, de l'albumine et de la transferrine. Toutefois les réactions entre peroxyde d'hydrogène et métaux de transition restent à l'origine de la majorité des radicaux hydroxyles produits *in vivo*. [41]

En conditions physiologiques normales, le fer est lié aux protéines. De cette façon la formation de radical hydroxyle par la réaction de Fenton est limitée. En revanche, une perturbation de l'homéostasie des ions métalliques peut conduire à une perturbation de l'équilibre rédox. De même, il a été démontré que l'excès de radical superoxyde conduisait à la libération de fer par ses protéines porteuses (e.g., ferritine). [71] Certains auteurs citent le fer comme étant un cofacteur de la prolifération tumorale. Effectivement dans certaines situations pathologiques comme l'hémochromatose, l'infection par l'hépatite B ou C, la surcharge en fer est corrélée à l'augmentation de l'incidence des cancers. [72]

À l'exemple du fer, le cuivre doit rester étroitement lié à ses protéines porteuses (e.g., albumine) sous peine d'induire un stress oxydatif. Notons par ailleurs que des taux élevés de cuivre dans le sérum ont été directement associés à la progression du cancer, et en particulier par leur participation

aux mécanismes d'angiogenèse. *In vitro*, l'expression de différents molécules pro-angiogéniques telles que IL-1, IL-6, TNF- et le VEGF est inhibée par l'élimination du cuivre. [71]

## 4. Les antioxydants non enzymatiques (ANE)

Ce sont eux qui font couler tant d'encre et font l'objet de nombreuses convoitises, et cela non sans raison. À la différence des précédents, ils constituent pour la plupart, un levier sur lequel nous pouvons agir au quotidien par le biais de l'alimentation. Plus que de simples piègeurs de radicaux libres, ils peuvent intervenir dans différents processus de signalisation cellulaire. Certains d'entre eux possèdent même *in vitro* une activité anticancéreuse : potentialisation du système immunitaire, répression des oncogènes ou encore inhibition de l'angiogenèse. Nous allons décrire ici succinctement leur mode d'action, puis leur intérêt au cours d'une supplémentation sera abordé dans le dernier chapitre.

### 4.1. Antioxydants inhibant les réactions en chaîne d'origine radicalaire consécutives à la peroxydation lipidique

#### 4.1.1. La Vitamine C ou Acide ascorbique

L'acide ascorbique est un ANE hydrosoluble décrit comme l'antioxydant majeur du plasma humain. Il possède une action antioxydante indirecte par réduction de l'alpha-tocophérol, et directe par réduction des peroxydes et des ERO (i.e., radical superoxyde). Dans le plasma, la régénération de l'alpha-tocophérol par l'acide ascorbique est essentielle afin d'éviter l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques en hydroperoxydes de lipides (i.e., athérosclérose). Cette synergie assure la protection des membranes cellulaires. [62] La régénération de l'acide ascorbique à partir de sa forme oxydée, l'acide déshydroascorbique (DHA), fait appel aux antioxydants à groupement thiol tels que le GSH et la Trx (figure 2.1). Le DHA peut être pris en charge par des transporteurs transmembranaires mitochondriaux de type GLUT-1. Dans la mitochondrie, le DHA participe à la stabilisation du potentiel rédox en s'impliquant dans la chaîne de transport d'électrons. En effet les « fuites » d'électrons peuvent être « captées » par le DHA qui participe ainsi à réduire la production d'ERO. De plus, la réduction du DHA par la capture des électrons permet de créer des stocks d'acide ascorbique à même de capturer les ERO. De ce fait, le maintien d'un niveau suffisant d'acide ascorbique dans l'espace intermembranaire mitochondrial semble avoir un effet anti-apoptotique notable. Cette propriété à été mise en évidence lors d'études portant sur des phénomènes d'ischémie-reperfusion, au cours desquels le maintien du potentiel rédox par l'acide ascorbique a permis d'éviter le relargage cytoplasmique de cytochrome c dont l'implication dans la voie des caspases est bien connu. Notons également que dans certaines conditions (e.g., basses concentrations, présence de fer ou de cuivre) l'acide ascorbique devient pro-oxydant. Contrairement à de multiples organismes vivants, l'acide ascorbique n'est pas synthétisé par l'organisme humain du fait de l'absence de l'enzyme qui

catalyse la dernière étape de sa synthèse : la gulonolactone oxydase. L'acide ascorbique est de ce fait une vitamine car sa source est uniquement alimentaire. [73]

#### 4.1.2. La Vitamine E ou $\alpha$ -tocophérol

Le terme de vitamine E regroupe plusieurs molécules dont l' $\alpha$ -tocophérol, la forme la plus présente dans l'organisme. C'est un ANE apporté par l'alimentation. Contrairement à l'acide ascorbique c'est un ANE liposoluble. Il minimise les dommages lipidiques consécutifs aux attaques radicalaires des acides gras polyinsaturés situés dans les membranes cellulaires et dans les lipoprotéines plasmatiques. Sa fonction est de limiter la propagation de réactions en chaînes consécutives à la peroxydation lipidique (figure 1.4) par neutralisation des radicaux peroxydes. C'est l'antioxydant le plus important des membranes cellulaires. [63] Dans chaque LDL (low density lipoprotein) la présence de seulement 5 à 10 molécules d' $\alpha$ -tocophérol contraste par rapport à l'abondance d'acides gras oxydables. Cette notion souligne l'importance d'un système de recyclage efficace, nécessitant des stocks d'acide ascorbique, de GSH et de Trx.

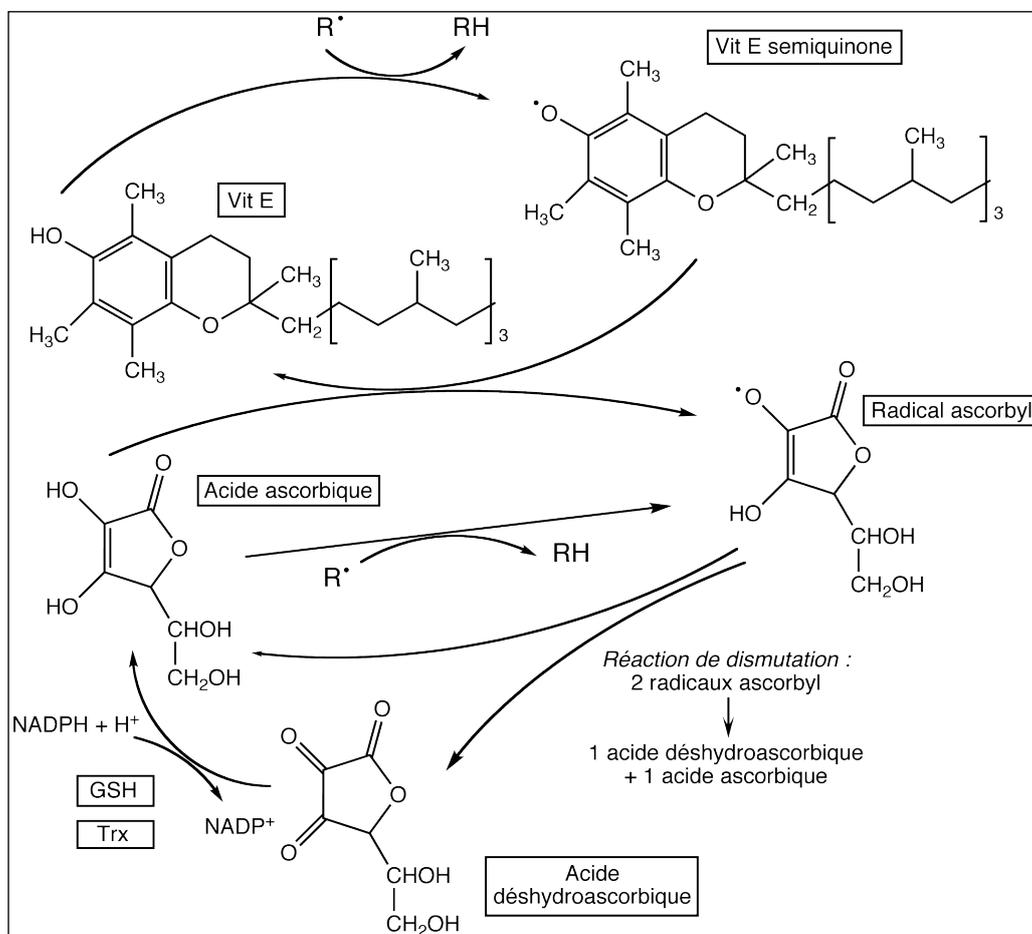


Figure 2.2 | Mode de régénération entre  $\alpha$ -tocophérol et acide ascorbique. [28, 62]

## 4.2. Polyphénols

Les antioxydants sont d'une importance vitale pour tous les organismes, et les plantes. De même, les animaux font appel à leurs antioxydants pour se défendre contre les agressions oxydatives. Bien souvent ces molécules sont à l'origine de couleurs particulières exhibées par leurs hôtes. Les plantes comestibles en contiennent généralement une grande quantité, et cette source d'alimentation représente une part fondamentale des apports quotidiens en antioxydants pour l'homme. D'ailleurs les recommandations issues de nombreux organismes de santé incitent à consommer régulièrement ces aliments dans l'objectif de couvrir les besoins journaliers. Les antioxydants les plus largement connus provenant des fruits et légumes appartiennent à la vaste famille des polyphénols. <sup>[44]</sup> Les polyphénols sont des molécules constituées d'au moins un noyau benzénique portant une fonction alcool, éther ou ester. <sup>[74]</sup> Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large des polyphénols avec plus de 5 000 représentants. Les fruits, le thé, le chocolat noir et le vin rouge sont des sources alimentaires communes contenant des flavonoïdes. <sup>[44]</sup> Ils peuvent capturer les ERO, inhiber les enzymes impliquées dans la génération du stress oxydatif, inhiber la production de radical hydroxyle par les réactions de Fenton en chélatant les métaux de transition, et même régénérer certains antioxydants tels que la vitamine E. Au regard de leur grande diversité et de leur polyvalence, la communauté scientifique leur porte une attention particulière. En effet, leurs propriétés antioxydantes leur procurent un intérêt thérapeutique potentiel dans diverses pathologies. Les maladies liées au vieillissement cellulaire, les maladies neurodégénératives ou cardiovasculaires, ou encore les cancers pourraient bien être des cibles privilégiées de ces thérapies. <sup>[75]</sup> Toutefois même si les études *in vitro* laissent percevoir les effets bénéfiques d'une supplémentation en polyphénols sur la capacité antioxydante du plasma, les études *in vivo* ne sont pas autant enthousiasmantes. En effet, même après une consommation importante de fruits à haute teneur en polyphénols, la capacité antioxydante du sang n'est pas significativement modifiée en raison de leur faible biodisponibilité et du métabolisme qu'ils subissent. <sup>[76]</sup> L'(-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG), la catéchine essentielle du thé vert est souvent décrite comme une substance préventive à l'égard du cancer. Des études très récentes de biodisponibilité montrent que les catéchines du thé vert sont très peu absorbées au niveau de l'intestin. C'est donc à des doses sub-micromolaires ou nano-molaires que ces substances sont retrouvées après consommation de thé vert. Selon certaines études, la biodisponibilité de l'EGCG est de seulement 0,1%. Ces concentrations sont loin d'être similaires à celles utilisées dans la majorité des études *in vitro* établissant les différentes propriétés des catéchines. Pour autant, les études cliniques montrent que la consommation en thé vert possède un effet préventif favorable contre différents cancer tels que le cancer du poumon et de la prostate. Le mécanisme d'action de l'EGCG ne semble pas être lié à la capture non spécifique de radicaux libres à ces faibles concentra-

tions mais plutôt à une action sur des cibles structurales telles que les NOX et différentes voies de signalisation cellulaire. [77]

VARIATIONS DU STATUT RÉDOX  
DES CELLULES TUMORALES.

ERO ET ÉTABLISSEMENT DES  
CARACTÉRISTIQUES DU CANCER.

Il a été montré de longue date que le stress oxydant est capable d'induire des modifications au niveau du patrimoine génétique d'une cellule, et qu'il peut participer ainsi aux différents processus d'initiation de la cancérogenèse. La proposition du rôle des ERO dans le maintien et/ou le développement d'une tumeur est quant à elle plus récente et fait appel à des mécanismes complexes non radicalaires. Une revue inédite de la littérature a même proposé le stress oxydatif comme médiateur de l'évolution des tumeurs primitives vers un stade métastatique, montrant alors l'omniprésence des ERO dans les différents stades de développement tumoral. [78] Les ERO et le stress oxydant jouent un rôle indiscutable au sein des tumeurs. La concentration des ERO au sein de la plupart des lignées cellulaires cancéreuses est d'ailleurs souvent augmentée par rapport aux cellules normales. L'étude de leur implication dans la physiopathologie tumorale permettra d'évaluer la pertinence d'une éventuelle supplémentation en antioxydants au travers des nombreux mécanismes décrits.

## 1. Le stress oxydant

### 1.1. Définition

Le stress oxydant résulte de la rupture de l'homéostasie rédox. À l'état physiologique, la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Toutefois un apport exogène des ERO, une surproduction endogène des ERO ou une défaillance des systèmes antioxydants, conduisent au déséquilibre de la balance rédox en faveur des pro-oxydants. Les cellules sont toutes capables de faire face à ce déséquilibre de manière ponctuelle en activant une réponse génique antioxydante. En ce qui concerne les cellules cancéreuses, le déséquilibre durable de la balance rédox est lié à la production permanente des ERO. Les deux sources principales de cette production sont la mitochondrie et les NOX. Les mécanismes de compensation mis en place par la cellule tumorale ne parviennent pas à rétablir un taux normal des ERO mais évitent un déséquilibre létal pour la cellule (figure 3.1). Une telle modification du potentiel rédox favorise la prolifération et la survie cellulaire. [12, 16, 42]

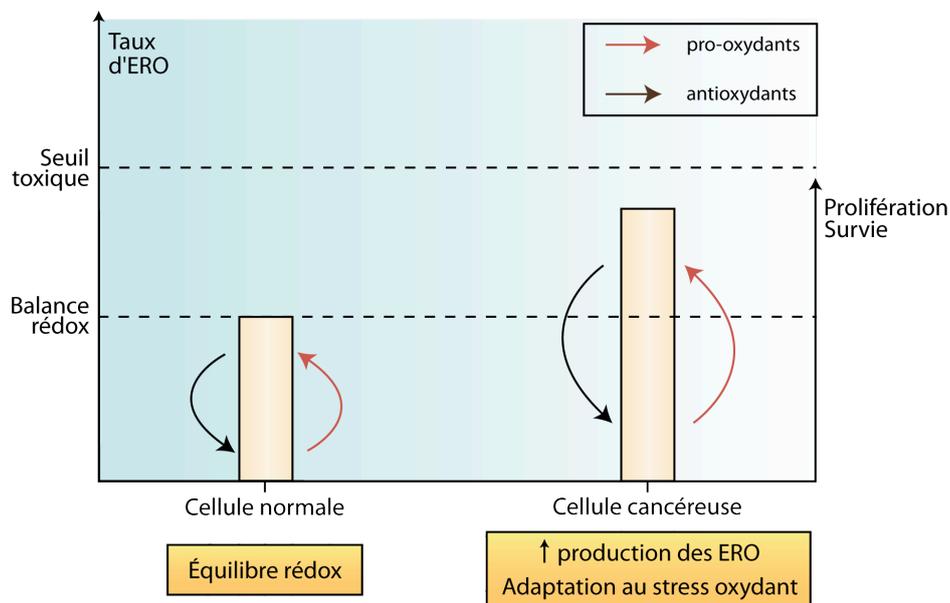


Figure 3.1 | Déséquilibre de l'homéostasie rédox des cellules cancéreuses.

## 1.2. La dualité des ERO

La connaissance des mécanismes moléculaires empruntés par les ERO dans la signalisation cellulaire a subi une expansion considérable au cours de ces dernières années, et a contribué à mieux appréhender leurs multiples fonctions. Il est par exemple certain aujourd'hui que l'expression du programme génétique des cellules peut varier en réponse aux modifications des taux d'ERO intracellulaires. [17, 28] Les fortes concentrations en ERO sont impliquées de façon prépondérante dans les dommages oxydatifs infligés aux biomolécules, pouvant mener la cellule vers l'apoptose ou la nécrose. Toutefois, pour des concentrations faibles ou modérées, les ERO possèdent un rôle important au sein de la signalisation cellulaire. [79] Cette dualité est étroitement liée aux variations de la concentration des ERO au sein de la cellule et à l'état des mécanismes de compensation visant à les éliminer. Ainsi les ERO sont capables d'entraîner soit une réponse cellulaire négative (arrêt de croissance ou mort cellulaire), soit une réponse cellulaire positive (prolifération cellulaire).

### 1.2.1. ERO et mort cellulaire

Les effets délétères des ERO apparaissent quand leur concentration cellulaire est élevée. Les antioxydants sont alors submergés et ne peuvent pas compenser le stress oxydatif. Les mécanismes radicalaires des ERO sont largement impliqués dans ce processus dégénératif. Dans de telles situations, la protéine p53 sensible aux dommages causés à l'ADN, est capable de déclencher la mort cellulaire programmée pour éviter la transformation oncogénique. Le gène codant pour la protéine p53 est par ailleurs qualifié de gène suppresseur de tumeurs et dénommé « gardien du génome » en raison de sa capacité à déclencher l'apoptose dans les situations critiques. [80]

L'induction d'un stress oxydatif est d'ailleurs un mécanisme partagé par les techniques thérapeutiques non chirurgicales du cancer. [81] En effet, la plupart des chimiothérapies et la radiothérapie génèrent des ERO par différents moyens afin d'exercer leur action anti-cancéreuse. Les ERO jouent alors le rôle déterminant de médiateurs de l'apoptose. [82] Par exemple, le traitement des carcinomes du colon par le 5-fluorouracil (5-FU) conduit à une up-régulation spécifique de la ferredoxine réductase, une enzyme mitochondriale, par l'intermédiaire de la protéine p53. Or plusieurs études ont montré que la ferredoxine réductase participe à la mort cellulaire programmée par la génération des ERO au sein de la mitochondrie. [80, 83, 84]

### 1.2.2. ERO et prolifération cellulaire

Le fruit des dix dernières années de recherche concernant l'implication des ERO dans les pathologies humaines a permis de dégager la perspective majeure suivante : un stress oxydatif modéré, pour lequel les concentrations en ERO augmentent légèrement sans dépasser les limites toxiques, potentialise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose. [81, 85] Ces activités s'exercent entre autre par la régulation de la phosphorylation des protéines et par l'activation de certains facteurs de transcription. Par exemple, en cas de stress oxydant modéré, les phosphatases subissent une oxydation de leurs résidus cystéine conduisant à une inactivation par modification conformationnelle. Cette restructuration protéique altère la fonction de déphosphorylation des phosphatases et laisse le champ libre aux voies de signalisation cellulaire dépendantes des kinases, à l'exemple de la PI3-kinase (PI3K) impliquée dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les différentes voies de signalisation impliquant des kinases participent à l'activation de facteurs de transcriptions permettant de modifier le statut rédox (AP-1, NF- $\kappa$ B, p53, HIF-1). De cette façon, le taux élevé des ERO caractérisant les cellules tumorales, est maintenu en dessous du seuil toxique capable d'engendrer l'apoptose. [28]

En raison de cette dualité d'action des ERO, l'approche thérapeutique peut être ambiguë car elle peut être pro-oxydante (i.e., chimiothérapie, radiothérapie) ou antioxydante. La supplémentation en antioxydants ne doit ni empiéter sur des thérapeutiques pro-oxydantes visant à éliminer les cellules, ni permettre aux cellules tumorales d'échapper à une surproduction des ERO.

## 1.3. Rôle des ERO dans la signalisation cellulaire

### 1.3.1. Mécanisme d'oxydation des cystéines « sensibles »

Dans la première partie, nous avons détaillé l'implication des ERO dans les mécanismes qui mènent aux dommages oxydatifs consécutifs aux attaques radicalaires. Ces mécanismes délétères envers les biomolécules et non spécifiques ont longtemps été considérés comme le mode d'action

principal des ERO. Cependant, ils ne permettent pas d'expliquer le rôle du stress oxydant dans la prolifération cellulaire tumorale. Les effets spécifiques des ERO se caractérisent en majeure partie par leur action d'oxydation des résidus cystéines appartenant aux chaînes peptidiques de protéines « sensibles » aux perturbations rédox. Généralement, les groupements thiols des cystéines libres ont un pKa situé entre 8 et 9. Toutefois, la position d'une cystéine au sein d'une chaîne polypeptidique peut modifier la valeur de ce pKa. Ainsi les protéines « sensibles » aux ERO présentent une valeur de pKa comprise entre 4 et 5 grâce à la présence d'acides aminés basiques adjacents (histidine, arginine, lysine). Au pH intracellulaire ( $\text{pH} \approx 7$ ), ces cystéines seront donc déprotonées et plus facilement oxydées en acide sulfénique par les ERO. Elles pourront également donner lieu à diverses réactions d'oxydation. L'activité enzymatique des protéines portant ces cystéines sensibles est alors perturbée via ces modifications post-traductionnelles entraînées par les ERO (figure 3.2). La sensibilité propre à certaines protéines cibles permet d'expliquer la spécificité d'action des ERO dans la signalisation cellulaire. [86-88]

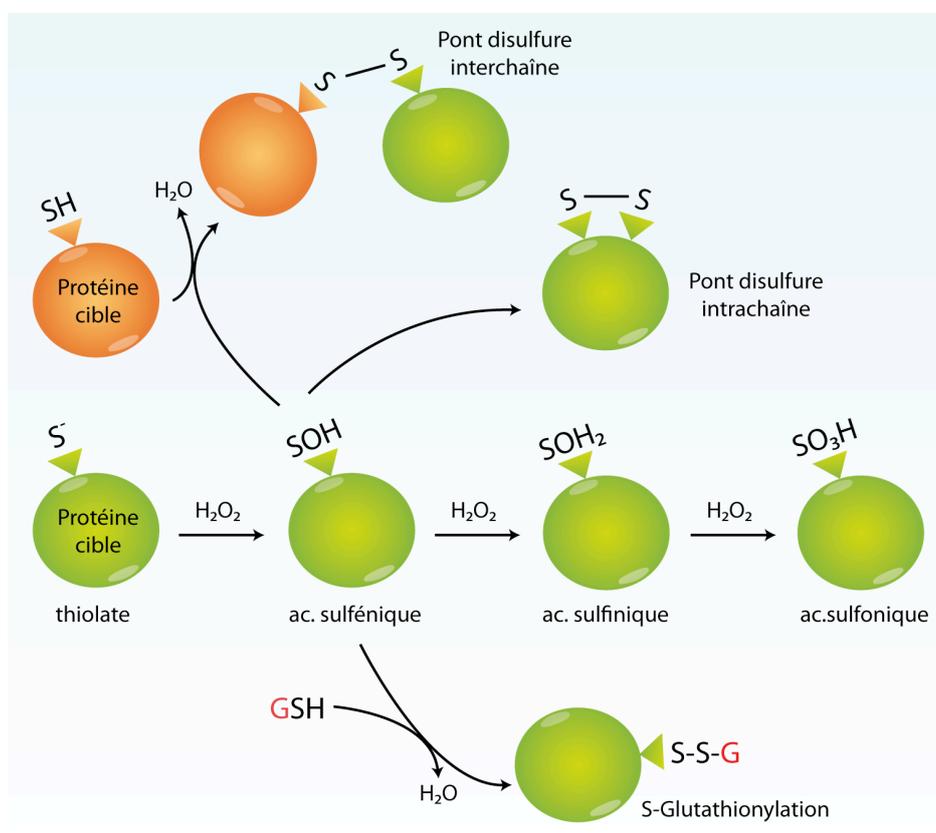


Figure 3.2 | Modifications post-traductionnelles des thiols protéiques sensibles sous l'action des ERO. [16, 86]

Ces mécanismes rédox jouent un rôle central dans les phénomènes de signalisation tumorale. Dans les cellules cancéreuses, les deux sources principales des ERO sont les NOX et les complexes de la phosphorylation oxydative mitochondriale. À partir de ces sites de production, les ERO diffu-

sent auprès des facteurs de transcription, des phosphatases, et du protéasome et perturbent leur activité par oxydation des résidus cystéines « sensibles ». La présence de différents sites de synthèse des ERO permet d'augmenter leur spécificité d'action car elles agissent ainsi sur les protéines cibles localisées dans un compartiment subcellulaire restreint.

### *1.3.2. Action des ERO sur les protéines tyrosine phosphatases*

L'implication des ERO dans la signalisation cellulaire est fortement corrélée à leur action d'inhibition de cibles privilégiées que sont les protéines tyrosine phosphatases (PTP).<sup>[78]</sup> L'activité physiologique de ces protéines cibles est de déphosphoryler de nombreux effecteurs de la signalisation cellulaire afin de les inactiver.<sup>[89]</sup> L'inhibition par les ERO de PTP telles que la PTEN (phosphatase and tensin homolog), la SHP-2 (SH2 domain phosphatase) ou la LMW-PTP (low molecular weight-PTP) modifie profondément la signalisation cellulaire. Par altération du fonctionnement de ces PTP, les ERO délestent la signalisation cellulaire des mécanismes de régulation et favorisent le maintien de l'activité des voies des kinases. À leur tour, ces kinases vont phosphoryler des effecteurs de la signalisation cellulaire de façon à les activer. Différentes voies de signalisation ayant recours à ces PTP seront étudiées plus loin.

### *1.3.3. Action des ERO sur les facteurs de transcription*

Les ERO peuvent perturber la liaison des facteurs de transcription à l'ADN ou en modifier leur activité. Il peuvent notamment réguler l'activité des facteurs AP-1, NF- $\kappa$ B, p53 et HIF-1 largement impliqués dans les modifications d'expression génique favorisant le développement tumoral. La régulation de ces facteurs par les ERO peut être exercée de façon directe ou indirecte, et constitue la réponse génique au stress oxydant.<sup>[89]</sup>

### *1.3.4. Inhibition des interactions protéine-protéine par les ERO*

Les interactions protéines-protéines peuvent être supprimées par l'action des ERO. Par exemple, le stress oxydant conduit à la dissociation de l'apoptosis stimulating kinase-1 (ASK-1) et de la Trx, responsable alors de l'activation de la protéine effectrice Jun. Le même schéma de dissociation entraîne la translocation nucléaire du facteur de transcription NRF-2 après inhibition de l'interaction avec la protéine Kelch-like ECH associating protein 1 (KEAP1).<sup>[78]</sup>

### *1.3.5. Stabilisation des protéines de la signalisation cellulaire par les ERO*

De nombreuses protéines engagées dans la signalisation cellulaire sont dégradées par le système du protéasome. Les ERO sont capables de restreindre la dénaturation de certaines protéines par leur action d'inhibition sur les enzymes d'ubiquitinylation et sur les sous-unités du protéasome. De cette façon les ERO permettent le maintien du signal par l'accentuation de la stabilité des protéines.<sup>[89]</sup>

Le paragraphe suivant qui aborde l'implication des ERO dans la mise en place des caractéristiques essentielles du cancer, fait systématiquement appel à ces mécanismes.

## 2. Implication des ERO dans l'établissement des caractéristiques essentielles du cancer

Afin d'envisager l'approche thérapeutique de manière pertinente, qu'elle soit pro-oxydante (chimiothérapie) ou antioxydante (supplémentation), il est nécessaire de pouvoir appréhender dans quelle mesure les ERO sont impliquées dans le développement tumoral.

### 2.1. Les caractéristiques du cancer

Les innombrables études et revues de la littérature reflètent l'intense recherche concernant la maladie néoplasique et toute sa complexité. Dans ces conditions, il est difficile si ce n'est impossible d'être exhaustif dans l'évaluation de l'implication des ERO au sein de l'ensemble des processus de cancérisation. De plus, cette exhaustivité n'apporterait pas forcément la pertinence espérée. Les différentes étapes caractéristiques du développement cancéreux décrites par Hanahan et Weinberg en 2000 et récemment ré-évaluées par ces mêmes auteurs, représentent une approche intéressante pour l'étude de la biologie tumorale. [90, 91] Ces caractéristiques sont constituées par l'accentuation des signaux de prolifération, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, l'immortalisation, l'invasion et les métastases, l'angiogenèse et l'échappement à l'apoptose. L'actualisation de ces connaissances a permis de dégager deux caractéristiques émergentes : la dérégulation métabolique et la tolérance à la réponse immune ainsi que deux caractéristiques inaugurales : l'instabilité génomique et la promotion tumorale par l'inflammation (figure 3.3). Le parcours de la littérature scientifique concernant les ERO montre leur forte implication dans ces différentes caractéristiques. Les exemples les plus appropriés sont développés dans la présente section.

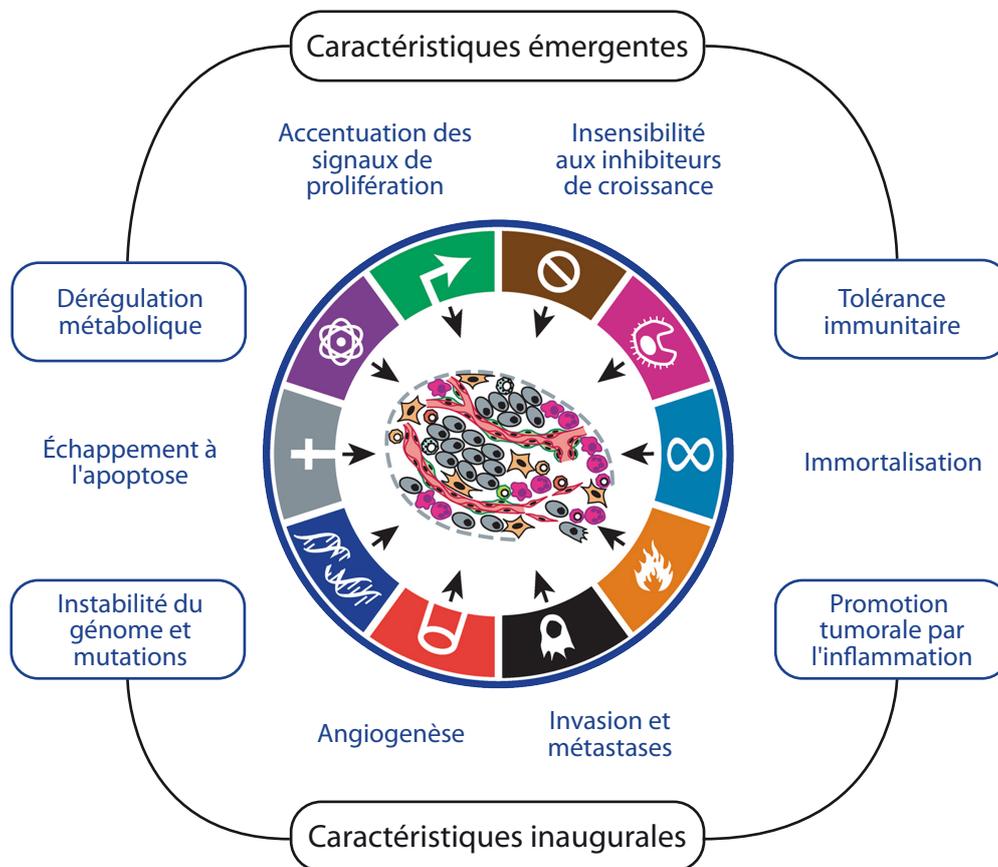


Figure 3.3 | Caractéristiques du cancer décrites par Hanahan et Weinberg en 2011. [91]

## 2.2. Instabilité et mutations du génome

L'étiologie des cancers est multifactorielle et étroitement liée aux tissus considérés. Certains éléments sont néanmoins constants dans l'initiation tumorale. Il en est ainsi de la fixation irréversible de mutations dans le génome. [92] L'acquisition des multiples caractéristiques du cancer, précédemment énumérées, est étroitement liée à une succession d'altérations du génome des cellules néoplasiques. La promotion tumorale multiséquentielle peut être envisagée comme une succession d'expansions clonales consécutives à certaines mutations génomiques favorables. L'évolution tumorale conduit à l'acquisition de plusieurs cellules souches cancéreuses ayant des mutations distinctes. De cette manière les cellules souches les plus résistantes aux facteurs environnementaux seraient sélectionnées. Cette approche « Darwinienne » permet d'expliquer entre autres les mécanismes de résistances aux agents anticancéreux. Les ERO contribuent largement à cette instabilité génomique. Elles jouent un rôle dans l'initiation, et entretiennent les phénomènes mutationnels au cours de l'expansion tumorale. [93] Comme nous l'avons vu dans la première partie les ERO et notamment le radical hydroxyle, peuvent causer des dommages aux pyrimidines et aux purines ayant pour conséquence une transformation génique potentiellement carcinogène. Afin d'acquies les mutations nécessaires pour orchestrer la tumorigenèse, les cellules cancéreuses doivent accroître leur sensibilité aux agents mutagènes et/ou réduire les systèmes de réparation de l'ADN. Les ERO inhibent certai-

nes enzymes de réparation de l'ADN favorisant ainsi la formation de mutations. Par ailleurs, plusieurs arguments laissent à penser que les ERO et ERN sont impliquées dans l'étape d'initiation, car des taux élevés de 8-OHdG (marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN) et de 4-hydroxy-2-nonénal (marqueur de la peroxydation lipidique) sont retrouvés à un stade précoce de la carcinogénèse, et montrent l'association entre initiation tumorale et stress oxydant. Au vu des considérations sur les différents sites de synthèse des ERO et de leur faible capacité à diffuser, il est intéressant de noter que les bases d'ADN touchées par les dommages oxydatifs des ERO lors des processus de cancérogenèse sont autant sinon plus d'origine mitochondriale que nucléaire. En effet l'ADN mitochondrial ne possède ni histones, ni système de réparation par excision. Ainsi, même si les mécanismes par lesquels les altérations de l'ADN mitochondrial interviennent dans les phénomènes de cancérogenèse ne sont pas suffisamment définis, il est certain que la mitochondrie possède un rôle clef dans l'initiation tumorale. [28]

Toutefois, l'instabilité du génome n'est pas uniquement liée aux phénomènes mutagènes mais peut également faire l'objet de mécanismes épigénétiques<sup>i</sup> transmissibles aux cellules lors de l'expansion clonale. La production mitochondriale d'ERO participe à ces mécanismes non délétères permettant la transformation maligne par l'activation d'oncogènes ou bien la répression des gènes suppresseurs de tumeurs. Certaines mutations de l'ADN nucléaire ou mitochondrial codant pour des éléments de la chaîne de transport d'électrons (ETC) entraînent une surproduction des ERO. Lorsque le transfert des électrons est partiellement inhibé, les électrons accumulés au sein de l'ETC vont être transférés au dioxygène et conduire à la production de radicaux superoxydes. Rapidement dissimulés en peroxyde d'hydrogène par la Mn SOD, la diffusion vers le noyau contribue à l'instabilité génétique. Dans le compartiment nucléaire, le peroxyde d'hydrogène est transformé en radical hydroxyle par interaction avec les métaux de transition via des réactions Fenton-like. Toutefois l'ADN n'est pas sans défense et les systèmes de réparation tels que la polyADP-ribose polymérase (PARP) sont alors activés en réponse au stress oxydant. Le fonctionnement de la PARP nécessite la transformation de NAD<sup>+</sup> en NADH. L'augmentation du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> consécutif à la chronicité des attaques radicalaires inhibe la SIRT, une histone désacétylase. La chromatine se relâche du fait de l'acétylation des protéines histones et permet une meilleure accessibilité du génome aux facteurs de transcription. C'est ainsi que peuvent être activés des proto-oncogènes régulant la différenciation et la réplication cellulaire.

---

<sup>i</sup> Pour mémoire, les mécanismes épigénétiques sont responsables d'une modification de l'expression génique sans modification des séquences nucléotidiques. Il s'agit notamment de la méthylation des cytosines et des protéines histones.

Les ERO endossent le rôle d'initiateur tumoral (mutations du génome) et de promoteur tumoral (mutations additionnelles, mécanismes épigénétiques). De nombreuses preuves s'accordent sur l'implication d'une augmentation chronique des ERO dans la transformation cellulaire vers un phénotype tumoral et leur participation à la progression cancéreuse par amplification de l'instabilité génomique. [70]

### 2.3. Promotion tumorale par l'inflammation

La présence de leucocytes au sein des tumeurs solides et le lien entre inflammation et cancer n'est pas une découverte récente. Elle fut établie par Rudolf Virchow au 19<sup>e</sup> siècle, mais ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que le rôle de l'inflammation au cours de la tumorigenèse a clairement été établi comme une caractéristique invariable et nécessaire aux tumeurs. [94] La part de cancers liés aux mutations somatiques et aux facteurs environnementaux est de 90% contre 10% de cancers liés aux mutations germinales. De nombreuses causes environnementales du cancer sont associées à une forme d'inflammation chronique. Plus de 20 % des cancers sont associés à des infections chroniques virales ou bactériennes (e.g., hépatite B et C, *helicobacter pylori*, papillomavirus), 30% sont liés à l'inhalation de tabac ou d'autres polluants (e.g., amiante, silice) et 35% sont liés aux facteurs alimentaires. [34, 95] Il faut néanmoins noter que toutes les maladies inflammatoires chroniques n'entraînent pas de cancers. L'initiation de la tumorigenèse lors d'hépatites chroniques ou de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par rapport à d'autres maladies chroniques telles que le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde s'explique par l'exposition aux facteurs environnementaux auxquels sont soumis le foie et l'intestin. [95] Les tumeurs sont composées de nombreuses cellules autres que les cellules cancéreuses. Des cellules de l'immunité innée et adaptative sont retrouvées dans le micro-environnement tumoral. L'infiltration par le système immunitaire du tissu tumoral est le reflet d'une activité anti-tumorale initiale. La balance entre l'activité anti-tumorale et la promotion tumorale par l'inflammation est le fait d'une expression variable de différents immuno-modulateurs et immuno-médiateurs ainsi que de l'abondance et de l'état d'activation des différents types cellulaires. Dans le meilleur des cas, les cellules immunitaires expriment des cytokines et chémokines en faveur de l'immunité anti-tumorale (e.g., IL12, TRAIL, IFN $\gamma$ ). Dans le cas contraire elles vont, toujours par l'expression de cytokines et chémokines (e.g., IL-6, IL-17, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ ), promouvoir le développement tumoral. [91, 95] Lors de l'initiation tumorale, le maintien d'un micro-environnement inflammatoire permet d'accroître la fréquence des mutations et de favoriser la prolifération des cellules mutantes. L'activité inflammatoire des cellules immunitaires est une source des ERO et des ERN capables d'induire une instabilité génomique. Les données actuelles ne permettent pas d'établir clairement si les ERO libérées par les neutrophiles et les macrophages lors d'une in-

inflammation importante sont capables d'atteindre les cellules épithéliales voisines et d'y engendrer directement des dommages oxydatifs mutagènes. Leur durée de vie limitée et les barrières moléculaires rencontrées (e.g., matrice extracellulaire, membrane cytoplasmique, membrane nucléaire) semblent plutôt privilégier un mécanisme d'action indirect. En effet, les cellules immunitaires peuvent, par l'action du TNF $\alpha$ , stimuler l'accumulation des ERO dans les cellules épithéliales et causer ainsi des dommages d'origine radicalaire. [95] En plus d'initier la tumorigenèse, l'inflammation est en mesure de promouvoir le développement tumoral par modification de l'expression génique. L'action des cytokines libérées à la suite d'une inflammation permet d'activer certains facteurs de transcription des cellules tumorales tels que le NF- $\kappa$ B et l'AP-1 afin d'induire des gènes capables de stimuler la prolifération et la survie cellulaire. D'ailleurs, la suractivation du NF- $\kappa$ B fréquemment rencontrée dans diverses lignées cancéreuses n'est généralement pas le fait d'une mutation, mais plutôt d'une signalisation cellulaire dictée par les cellules environnantes. Les ERO sont décrites comme des seconds messagers responsables de l'activation du NF- $\kappa$ B via le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 (figure 3.4). [28, 95]

Les ERO sont donc impliquées dans les deux caractéristiques inaugurales du cancer à savoir : (i) l'instabilité et les mutations du génome, (ii) la promotion tumorale par l'inflammation. Sous cet angle, la supplémentation en antioxydants paraît intéressante en termes de prévention car elle permet théoriquement d'interférer avec les mécanismes de l'initiation tumorale. La supplémentation postérieure à l'initiation tumorale permettrait quant à elle de réduire l'instabilité génomique responsable de la sélection de clones plus agressifs et parfois résistants aux chimiothérapies.

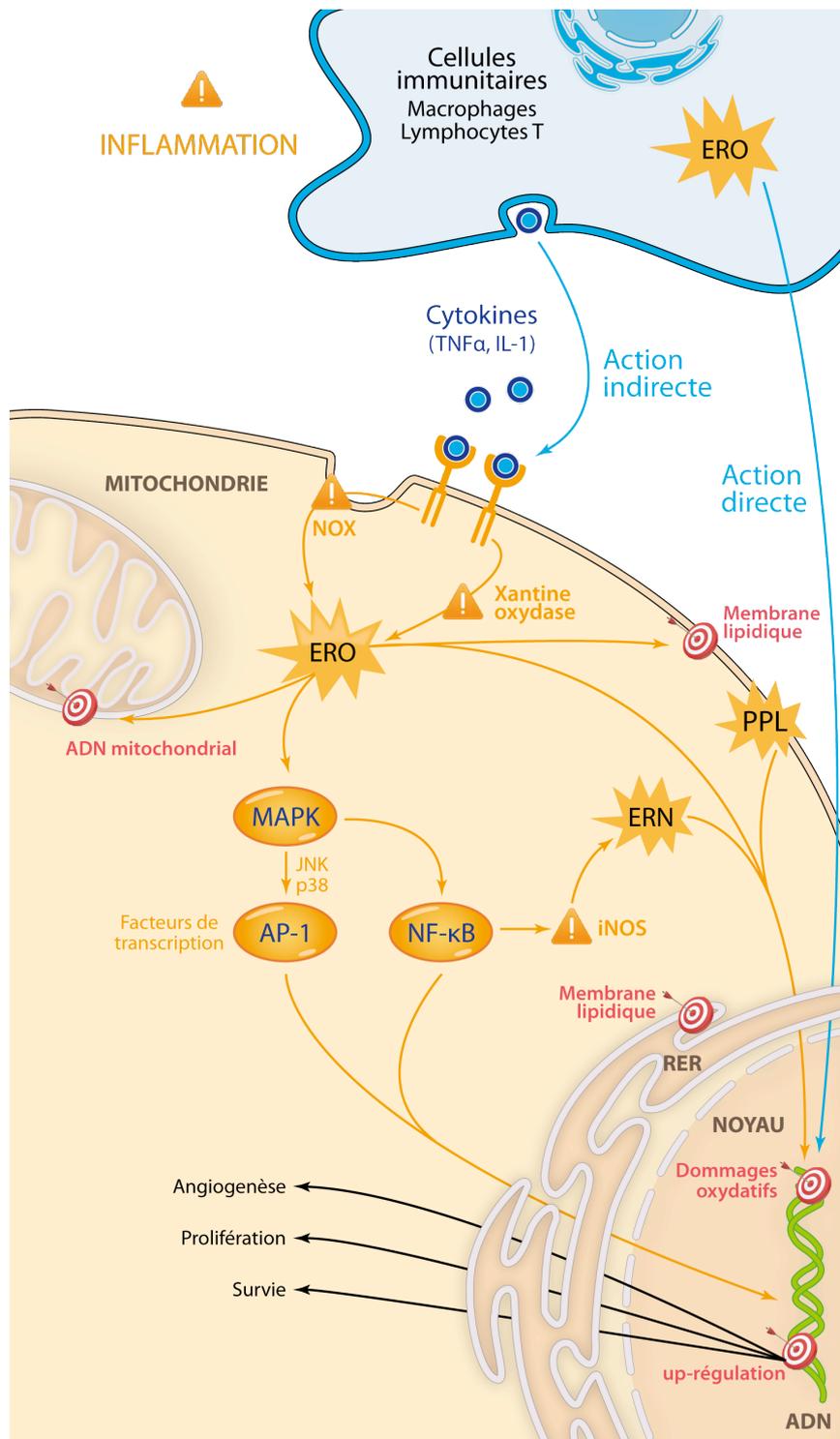


Figure 3.4 | Rôle des ERO dans la promotion tumorale par l'inflammation. [28, 95] | PPL : produits de peroxydation lipidique.

## 2.4. Accentuation des signaux de prolifération

Nous venons d'aborder les deux caractéristiques inaugurales du cancer impliquées dans l'étape d'initiation cancéreuse. L'étape de progression consécutive à la mise en place de ces caractéristiques correspond à l'expression phénotypique des modifications génotypiques par l'action des promoteurs tumoraux de la ou les cellules concernées puis à leur expansion clonale. La prolifération incontrôlée des tumeurs requiert une up-régulation de multiples voies de signalisation cellulaire. Il

s'agit d'une caractéristique fondamentale du cancer qui fait appel à une dérégulation de l'expression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs. Plusieurs voies de signalisation suractivées sont sensibles aux variations du potentiel rédox. De cette façon, les ERO peuvent potentialiser certaines d'entre elles. [91, 96]

#### 2.4.1. ERO et récepteurs aux facteurs de croissance

La croissance très rapide des cellules tumorales est attribuée en partie à l'activation anormale des récepteurs aux facteurs de croissance et des voies de signalisation favorisant la prolifération. Les ERO peuvent promouvoir le développement cancéreux et la prolifération cellulaire en affectant ces deux mécanismes. En conditions normales, l'activation d'un récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (RTK) est très brève en raison de l'action : (i) soit de protéines tyrosine phosphatases (PTP) qui sont des régulateurs négatifs des RTK, (ii) soit d'ubiquitines ligases initiant leur dégradation par ubiquitinylation<sup>i</sup>. Or en condition de stress oxydatif rencontré dans les cellules cancéreuses, ces deux systèmes de régulation sont dérégulés par les ERO qui oxydent les cystéines de leurs sites actifs et permettent ainsi de prolonger l'action médiée par les facteurs de croissance. [81] Le mécanisme par lequel les ERO favorisent la voie de signalisation du PI3K/AKT (*cf. Participation des ERO au shift métabolique p. 61*) est directement lié à ce phénomène. En plus d'inhiber le PTEN, un régulateur négatif de la voie signalétique PI3K/AKT, les ERO participent également à sur-activer les récepteurs aux facteurs de croissance accentuant ainsi la voie du PI3K. L'activation des RTK déclenche la synthèse des ERO après phosphorylation de la petite GTPase Rac responsable de l'activité des NOX.

#### 2.4.2. Les ERO et les MAP-Kinases

En plus de leur action sur les récepteurs à activité tyrosine kinase, les ERO peuvent activer des protéines kinases intracellulaires telles que les mitogen-activated protein kinases (MAPK). Le rôle de ces protéines est de relayer un signal extracellulaire jusqu'au matériel génétique afin d'y exercer un rôle de répression ou d'induction transcriptionnelle. De nombreuses études rapportent que ces sérine/thréonine kinases peuvent être régulées par des oxydants. [28] La famille des MAPK comporte trois représentants : l'extracellular signal-regulated kinase (ERK), la protéine p38 et la protéine c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK). Ces protéines sont activées par une cascade de phosphorylations et pourront à leur tour phosphoryler des substrats spécifiques. Chaque voie de signalisation empruntée par les MAPK requiert au moins trois kinases : une MAPK kinase kinase (MAP3K), une MAPK kinase (MAP2K) et la MAPK en question. Les voies de signalisation des MAPK peuvent être activées par différents stimuli tels que des récepteurs aux facteurs de croissance, des récepteurs

---

<sup>i</sup> Pour mémoire, l'ubiquitinylation d'une protéine l'engage dans la voie du protéasome pour y être détruite. (ubiquitine = « marqueur de protéine à éliminer »).

aux cytokines, des récepteurs aux hormones ainsi que d'autres tyrosine kinases et des ERO. Les cibles de cette signalétique sont variées et peuvent déclencher des activités cellulaires comme la différenciation, la prolifération, la survie et même la mort cellulaire. Au cours du développement tumoral, il n'est pas rare de constater une perturbation du contrôle des MAPK. La persistance d'une activation de p38 ou de JNK peut conduire la cellule vers la mort cellulaire programmée tandis que la suractivation des ERK joue un rôle clef dans la tumorigenèse en favorisant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion. La balance entre l'activation des ERK et des JNK est un facteur clef de la survie cellulaire car une diminution des ERK associée à une augmentation des JNK est requise pour l'induction de l'apoptose. Plusieurs dysfonctions dans la signalétique des MAPK ont été rapportées lors de cancers du sein, de la peau et du col de l'utérus. Les études expérimentales explorant l'up-régulation des MAPK par le peroxyde d'hydrogène montrent que chaque voie signalétique ayant recours aux MAPK réagit différemment en fonction de la spécificité du signal. Par exemple, la production endogène de peroxyde d'hydrogène lors d'un burst<sup>i</sup> oxydatif est en mesure d'activer l'ERK mais n'a aucun effet sur la p38. *A contrario*, le peroxyde d'hydrogène exogène peut activer la p38 mais pas l'ERK. [28, 97]

#### 2.4.3. ERO et modulation de la voie des ERK

La voie des ERK est le plus souvent associée à la prolifération cellulaire. [28] La cascade signalétique des ERK est généralement initiée par l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) après fixation du ligand (e.g., facteur de croissance). Le RTK va à son tour activer une protéine GTPase appelée Ras. [97] Le gain de fonction accordé par la mutation du gène codant pour Ras a été la première altération génétique identifiée dans les cancers humains il y a plus de 30 ans ouvrant ainsi la voie à la découverte des oncogènes. [98] Les phosphorylations successives suivant l'activation de Ras touchent la protéine Raf (MAP3K), MEK (MAP2K) puis l'ERK (MAPK). Dans les cancers ovariens primitifs, l'activation constitutive des ERK1 et ERK2 est associée à une haute tumorigénicité et une résistance à la chimiothérapie. En conséquence, la voie des ERK constitue une cible privilégiée pour une intervention thérapeutique. La MAPK phosphatase 3 (MKP3), une protéine tyrosine phosphatase, a récemment été décrite comme un régulateur négatif des ERK1 et ERK2. Plusieurs mécanismes sont susceptibles de potentialiser la voie des ERK par inhibition de la MKP3. Au cours de cancers pancréatiques la sous-expression de MKP3 est consécutive à une hyperméthylation de la séquence promotrice. Concernant le cancer ovarien, une équipe de recherche de Hong Kong a montré récemment pour la première fois la corrélation entre perte d'activité de la MKP3 et accumulation intracellulaire de peroxyde d'hydrogène. Cette même équipe a montré que la restauration de l'activité de la MKP3 permet de sensibiliser à nouveau les cellules tumorales à

---

<sup>i</sup> Littéralement : explosion oxydative.

l'apoptose induite par le cisplatine, une des molécules antitumorales la plus utilisée dans le traitement du cancer de l'ovaire. Cette donnée montre que l'utilisation d'antioxydants capables d'inhiber l'action des ERO sur la MKP3 présenterait un atout incontestable en association au cisplatine chez les patientes chimiorésistantes. [99]

Les ERO sont donc capables de potentialiser la voie de signalisation cellulaire des ERK, jouant ainsi un rôle dans de nombreuses étapes du développement tumoral (figure 3.5). L'induction de la voie des ERK permet l'échappement à l'apoptose par régulation du taux et de l'activité des protéines Bcl-2. Dans le même objectif, les ERK conduisent le facteur FoxO (*cf. échappement à l'apoptose p. 69*) vers une dégradation par le protéasome après phosphorylation. D'autre part, la phosphorylation par les ERK de nombreuses molécules telles que les kinases des chaînes légères de la myosine facilite la migration des cellules tumorales. Les ERK peuvent également induire l'expression de matrix métalloprotéinases (MMP), enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. En favorisant la voie des ERK, les ERO luttent contre la mort cellulaire programmée et participent à l'invasion tumorale et donc au passage d'un cancer in situ à un cancer infiltrant.

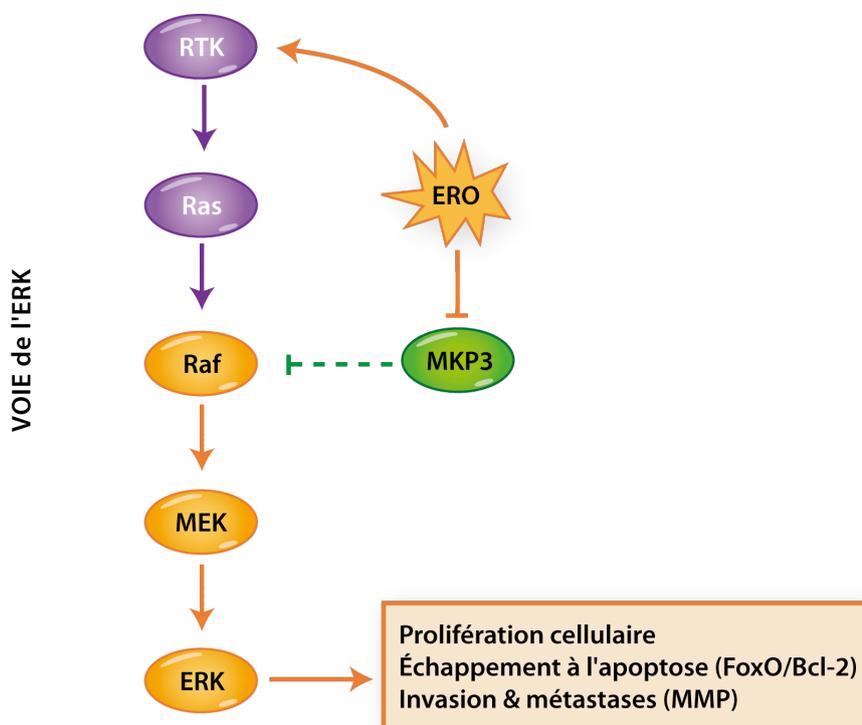


Figure 3.5 | Potentialisation de la voie des ERK par les ERO. [28, 97]

Notons toutefois que l'activation de la voie des ERK est relative à de nombreuses étiologies dont l'une d'entre elles implique les ERO. En effet, si l'on considère le cancer du colon, dans 50% des cas, une mutation de la protéine Ras est retrouvée. D'autre part, les mutations touchant la protéine Raf sont présentes dans 66% des mélanomes malins. Des thérapeutiques ciblées récentes sont disponibles et montrent l'intérêt porté à cette voie de signalisation cellulaire dans la recherche anticancéreuse.

céreuse. Le sorafenib (NEXAVAR®) utilisé chez des patients présentant un carcinome rénal ou hépatocellulaire est un inhibiteur multikinase ciblant la protéine Raf. Le gefitinib (IRRESSA®) et l'erlotinib (TARCEVA®) sont tous deux des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR. [97]

## 2.5. Dérégulation métabolique

### 2.5.1. Importance du métabolisme tumoral

Les 25 dernières années ont vu naître une révolution dans la recherche fondamentale contre le cancer par l'avènement de l'étude des oncogènes. Les techniques de séquençage à haut débit ont permis de dévoiler de manière inattendue, une multitude et une hétérogénéité de mutations génétiques conduisant les cellules vers un phénotype malin. En effet, des centaines de mutations, translocations, amplifications et délétions contribuent au développement du cancer, et ces transformations géniques varient au sein même de tumeurs histopathologiquement identiques. Les mutations majeures affectent un peu plus d'une douzaine de voies de signalisation cellulaire fondamentales et responsables de la tumorigenèse. Au regard de ces données, la stratégie thérapeutique consistant à cibler certains acteurs de la signalisation, ne semble pas pouvoir répondre de manière exhaustive aux besoins relatifs à la grande diversité de phénotypes tumoraux. L'attention se porte à nouveau sur le métabolisme des cellules cancéreuses qui constitue un point commun à plusieurs voies clefs de la signalisation tumorale. [85] En effet, pour assurer leur croissance et leur survie, toutes les cellules cancéreuses bouleversent leur métabolisme basal. Cette modification métabolique, liée à de multiples mécanismes extrinsèques et intrinsèques, procure aux cellules en division trois besoins essentiels : (i) une génération rapide d'ATP afin de maintenir un statut énergétique élevé, (ii) un accroissement de la synthèse des biomolécules (augmentation des besoins), (iii) et une étroite régulation du statut oxydant. Les modifications métaboliques conduisant à la réalisation de ces trois besoins essentiels sont intimement liées et font appel aux ERO.

### 2.5.2. L'effet Warburg

La notion de métabolisme tumoral spécifique n'est pas récente. En effet, les expériences menées par Otto Warburg *et al.* en 1927 ont montré que les cellules tumorales catabolisent le glucose par glycolyse et restreignent la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Ce phénomène est désormais baptisé « effet Warburg » et correspond également au « shift métabolique ». [91, 100] Pour mémoire, la dernière étape de la glycolyse cytoplasmique catalyse la production du pyruvate. À l'issue de cette étape le pyruvate peut soit entrer dans la mitochondrie via la pyruvate transférase pour intégrer le cycle de Krebs et alimenter la OXPHOS, soit emprunter la voie des lactates. Cette particularité

engendre une surconsommation de glucose par les cellules tumorales, car la « glycolyse aérobie<sup>i</sup> » produisant 2 ATP/glucose est loin d'avoir des performances équivalentes à la OXPHOS produisant 34 ATP/glucose. Ce phénomène fait d'ailleurs l'objet d'une application courante en démarche diagnostique. Il s'agit du PET-Scan (ou TEP : tomographie par émission de positrons) dont le fonctionnement repose sur la surconsommation en 2-(<sup>18</sup>F)-fluoro-2-désoxy-D-glucose par les cellules cancéreuses. La théorie consensuelle à ce sujet montre que, par évitement de la OXPHOS, les chaînes de carbone sont incomplètement consommées et permettent ainsi, d'alimenter la production de biomolécules nécessaires à la multiplication cellulaire (ribose, alanine, citrate). De plus, l'importante sécrétion d'acide lactique consécutive à ces perturbations diminue le pH extracellulaire de 7,4 à 6 dans les tumeurs faiblement perfusées. Cette baisse de pH sert la volonté sournoise de colonisation des cellules tumorales en induisant la mort des cellules normales, l'angiogenèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. [85, 101]

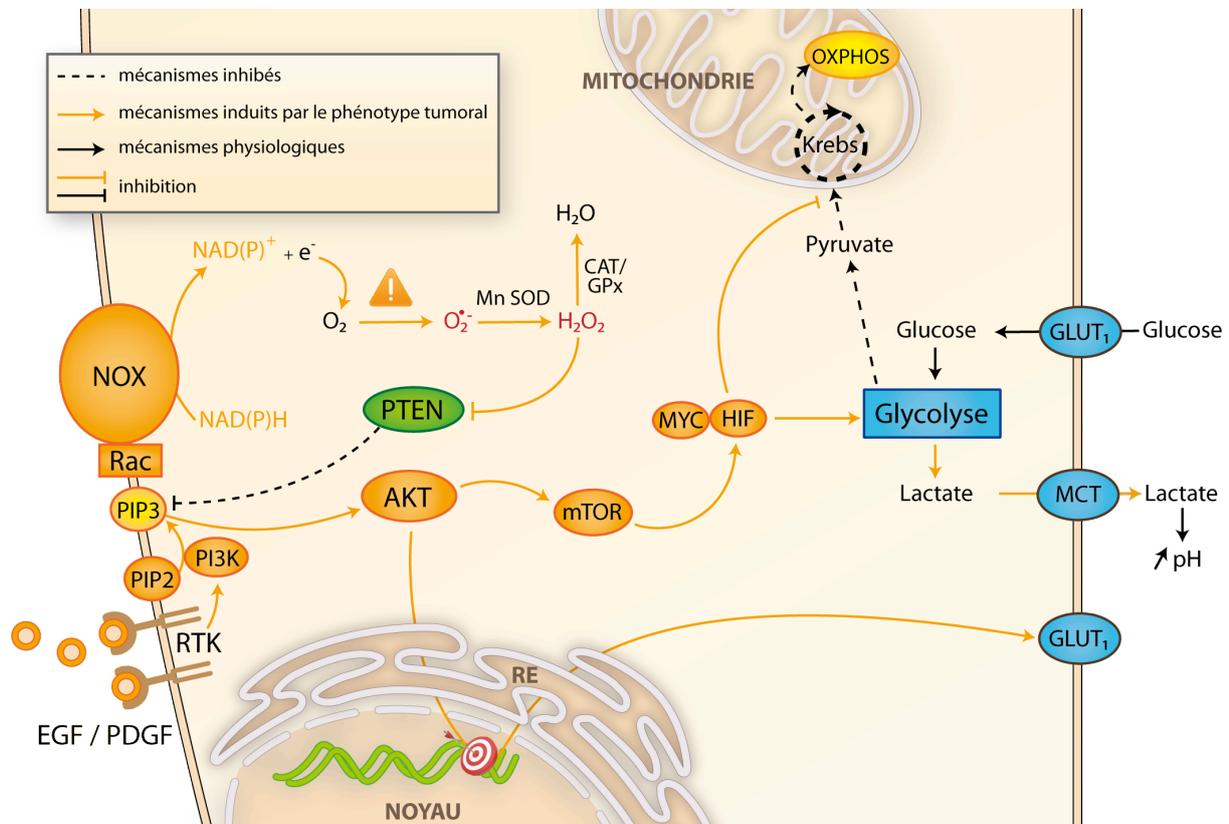
### 2.5.3. Participation des ERO au shift métabolique

Les cellules tumorales surexpriment les facteurs de croissance tels que le platelet derived growth factor (PDGF) et l'epidermal growth factor (EGF). Or la liaison des facteurs de croissance à leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) active la voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Cette voie est connue pour ses capacités à transmettre des signaux de survie et de croissance, mais elle participe également au profond changement du métabolisme glucidique par le biais de la sérine/thréonine kinase AKT, effecteur principal du PI3K. Après activation des récepteurs, une GTPase Rac déclenche la production de radicaux superoxydes par le complexe NADPH oxydase. Le peroxyde d'hydrogène issu de la réduction du radical superoxyde, oxyde deux cystéines du site catalytique (Cys124 & Cys71) appartenant à la PTEN (une protéine tyrosine phosphatase). [101] La formation du pont disulfure qui en résulte, dénature la protéine et empêche son action anti-tumorale. [102-104] Car, en conditions normales, la PTEN inhibe la réaction de phosphorylation de l'AKT impliquée dans l'augmentation de l'expression génique des transporteurs du glucose et la phosphorylation des enzymes clefs de la glycolyse (i.e., hexokinase, phosphofructokinase). Le stress cellulaire engendré par production d'ERO favorise donc les modifications du métabolisme glucidique. D'ailleurs la suractivation de l'AKT est probablement le facteur prépondérant lié à l'augmentation de la glycolyse des cellules tumorales. [101] Dans un second temps, l'AKT va rendre fonctionnel l'hypoxia inductible factor 1 (HIF1) à la suite de la désinhibition de la mTOR. Il s'agit du facteur cible de cette voie de signalisation qui favorise la glycolyse. Une fois activé l'HIF1 col-

---

<sup>i</sup> Le terme de « glycolyse aérobie » désigne ici la glycolyse cytoplasmique dont le produit final est le pyruvate. Cette expression peut prêter à confusion étant donné que le métabolisme du glucose auquel il fait référence, initié par des cellules cancéreuses, n'utilise pas le potentiel des conditions aérobies en évitant le cycle de Krebs et la OXPHOS. Toutefois il s'agit du terme employé par la communauté scientifique à propos de l'effet Warburg.

labore avec un autre facteur de transcription, le MYC afin d'amplifier la transcription des transporteurs du glucose et des enzymes de la glycolyse. De plus l'HIF1 empêche l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs ce qui inhibe la OXPHOS (figure 3.6). [85] Ici, les ERO permettent indirectement l'activation de l'HIF1 en activant la voie PI3K/AKT à la suite d'une production de peroxyde d'hydrogène issu d'une NOX. Mais les ERO sont également capables de stabiliser l'HIF1 par production mitochondriale de peroxyde d'hydrogène, permettant entre autres de favoriser le shift métabolique. [102]



Fi-

gure 3.6 | Participation des ERO aux modifications du métabolisme glucidique de la cellule tumorale. [85, 102, 105] PDGF : platlet derived growth factor | EGF : l'epidermal growth factor | RTK : récepteur tyrosine kinase | PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase | PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate | PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate | PTEN : PIP3 phosphatase | HIF : hypoxia inductible factor | CAT : catalase | RE : réticulum endoplasmique | GPx : glutathion peroxydase.

À l'origine, le facteur de transcription HIF1 a été décrit comme un hétérodimère ayant un rôle clef dans la réponse tumorale à l'hypoxie. En effet, la prolifération cellulaire conduit la tumeur à de nouvelles adaptations au cours de sa croissance afin de grossir toujours plus. Au delà d'une certaine taille, certaines cellules tumorales ne sont plus correctement alimentées en oxygène et en nutriments. L'hypoxie cellulaire est une phase critique à laquelle toutes les tumeurs sont confrontées, faisant alors de ce phénomène un objet d'étude intéressant au même titre que le métabolisme tumoral. Contre toute attente, des données récentes montrent qu'en réponse à l'hypoxie, la mitochondrie augmente la production en ERO. L'étude de mécanismes empruntés par les ERO dans la signalisa-

tion en conditions d'hypoxie fait l'objet d'une attention croissante dans la recherche anti-tumorale. Quand on s'intéresse simultanément à l'hypoxie cellulaire et au cancer, le leitmotiv est incarné par le facteur inductible de l'hypoxie ou HIF1. En effet, ce facteur de transcription a longtemps été considéré comme le détecteur principal de l'hypoxie cellulaire. Pour survivre dans un environnement hypoxique, les tumeurs doivent être dotées d'éléments réactifs coordonnant une réponse adaptative. Le HIF1 est capable de réguler la transcription de plus de 70 gènes codant pour des protéines telles que le vascular endothelial growth factor (VEGF) ou l'érythropoïétine, afin de favoriser la survie dans des conditions de basses pressions en oxygène. Ce facteur de transcription est synthétisé constitutivement mais sa faible demi-vie limite son action. Il est effectivement rapidement hydroxylé en présence de dioxygène par des prolyl 4-hydroxylases fer-dépendantes (PHD 1, 2 et 3) localisées dans le noyau et le cytoplasme. Après hydroxylation de deux prolines appartenant au domaine sensible à l'oxygène, l'HIF1 $\alpha$  est ubiquitinylé pour être dégradé par la voie du protéasome. Toutefois l'inhibition de son hydroxylation par la PHD n'est effective que pour des taux très bas en oxygène, avec une réponse maximale pour des taux de 0,5% en oxygène. Des études récentes ont suggéré que différentes ERO étaient capables de stabiliser l' HIF1 $\alpha$  par inhibition de la PHD bien avant d'atteindre l'anoxie complète. Quand les taux d'oxygène chutent, la mitochondrie est capable de déclencher un burst oxydatif en conséquence du rôle prépondérant de l'oxygène dans la OXPHOS. Les ERO sont produites à partir du complexe III (i.e., ubiquinol + cytochrome c1) de la chaîne de transport d'électrons. En effet le transfert d'électrons au sein du complexe (de l'ubiquinol vers le cytochrome c1) est différé, permettant ainsi aux électrons de réagir avec l'oxygène pour former des radicaux superoxydes. La Mn SOD, présente dans les mitochondries, convertit les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. La résultante se traduit par un approvisionnement du cytosol en peroxyde d'hydrogène capable d'inhiber la PHD, de permettre l'accumulation de d'HIF1 $\alpha$ , sa dimérisation avec l'HIF1 $\beta$  et sa translocation dans le noyau. L'HIF-1 pourra initier ensuite la modulation de l'expression de nombreux gènes permettant entre autres, la survie en milieu hypoxique et le shift métabolique. [102, 106] Par exemple, l'HIF1 up-régule la synthèse de facteurs de croissance comme le VEGF permettant ainsi d'initier l'angiogenèse afin de donner une réponse concrète à l'hypoxie. Mais plus intéressant encore, ces données montrent que les ERO sont capables de stabiliser l'HIF1 dans des conditions aérobies, déclenchant ainsi une expression génique nécessaire aux modifications métaboliques.

Les ERO sont donc capables d'induire et de stabiliser l'HIF1 de différentes manières : par la voie du PI3K/AKT et par surproduction mitochondriale de peroxyde d'hydrogène. [85, 102, 107] Cette action sur l'HIF1, implique les ERO dans de nombreuses facettes de la tumorigénèse telles que le shift métabolique, la résistance à l'hypoxie mais également l'angiogenèse et l'évolution métastatique dont on mesurera l'importance au cours de ce chapitre. De cette manière les ERO participent aux profondes modifications du métabolisme glucidique nécessaires au développement tumoral.

#### *2.5.4. Les conséquences de l'effet Warburg*

Les cellules tumorales comme toutes les autres cellules ont besoin de bases moléculaires pour synthétiser leurs biomolécules, sous peine de voir leur prolifération freinée. L'étude approfondie des mécanismes du métabolisme glucidique des cellules tumorales a montré que dans certaines conditions, la glycolyse aérobie pouvait être ralentie. La Pyruvate kinase est l'enzyme limitante de la glycolyse qui catalyse la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate. L'expression de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2), exprimée dans de nombreuses tumeurs du sein, constitue un atout car elle permet de ralentir la glycolyse. L'oncogène MYC est capable de surexprimer l'isoforme M2 en modulant l'épissage de l'isoforme M1. Ce phénomène permet aux intermédiaires de la glycolyse de participer à d'autres voies métaboliques telles que la voie des hexosamines, la synthèse d'uridine diphosphate, la synthèse de glycérol et la voie des pentoses phosphates. Ces voies parallèles permettent de remplir les deux dernières exigences métaboliques nécessaires à la croissance tumorale à savoir : (i) fournir les précurseurs utiles à la synthèse des biomolécules (ii) et fournir des molécules capables de rééquilibrer le potentiel rédox (e.g., NADPH).

Parmi ces métabolismes secondaires à l'effet Warburg, il en est un particulièrement intéressant qui permet d'expliquer le maintien d'un taux anormalement élevé des ERO par les cellules cancéreuses sans leur être préjudiciable, il s'agit de la voie des pentoses phosphates. Une fois dans le milieu intracellulaire, le glucose subit une phosphorylation. Le glucose 6-phosphate obtenu est le substrat commun de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. Le « choix » de l'une ou l'autre des deux voies dépend des besoins ponctuels soit en énergie (ATP), soit en précurseurs de biomolécules. Certains types de cancers expriment une isoenzyme spécifique de la pyruvate kinase (PKM2) orientant préférentiellement le glucose 6-phosphate vers la voie des pentoses phosphates. Cette particularité confère aux cellules un avantage tumorigène démontré. En effet, la voie des pentoses phosphates permet de convertir le glucose en substrat pour la biosynthèse des nucléotides (i.e., ribose) et pour le contrôle rédox (i.e., NADPH). Le NADPH possède un rôle en tant que cofacteur de nombreuses réactions indispensables à la synthèse de biomolécules. Mais c'est avant tout un précieux antioxydant capable de capturer les ERO produites lors de la prolifération cellulaire. Le

NADPH permet en particulier de régénérer les stocks de glutathion et de thioredoxine. La double implication du NADPH, aussi bien dans la réponse antioxydante que dans la synthèse des biomolécules, en fait une cible thérapeutique très intéressante. Une stratégie thérapeutique consistant à inhiber la voie des pentoses phosphates permettrait d'éviter la surproduction de NADPH. D'ailleurs des études précliniques ont démontré l'effet anti-tumoral du 6-amino-nicotinamide par inhibition de la G6PD (glucose 6-phosphate déshydrogénase), une enzyme indispensable à l'initiation de la voie des pentoses phosphates. Cet effet a été constaté pour des lignées cellulaires de leucémies, de glioblastomes et de cancers du poumon.

### *2.5.5. Adaptation des cellules tumorales au stress oxydant*

Les ERO sont maintenues à un taux élevé au sein des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines du fait d'une altération des voies métaboliques et de certains mécanismes de régulation ainsi que de l'activation d'oncogènes. [26, 79, 85] En utilisant les ERO dans les voies de signalisation, les cellules tumorales doivent mettre en place des systèmes de compensation pour faire face aux dommages oxydatifs et pour échapper aux mécanismes d'apoptose (figure 3.1 ; figure 3.8). Les systèmes antioxydants sont donc renforcés afin de restreindre l'action des ERO à leur participation active dans la cancérogenèse (oxydation des cystéines) et de prévenir d'éventuels dommages cellulaires irréversibles (peroxydation lipidique). De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, la génération de NADPH permet le maintien de l'activité antioxydante de la GSH et de la Trx. D'ailleurs, les cellules tumorales qui perdent la fonction du gène suppresseur de tumeur RB (retinoblastoma) responsable de la réponse antioxydante, ne peuvent pas faire face à la surproduction des ERO et sont donc condamnées à l'apoptose. [85] L'augmentation des ERO intracellulaires est alors responsable d'une sélection au sein des différentes cellules souches tumorales. Cela permet l'émergence des lignées capables de déployer des mécanismes de compensation face au stress oxydatif. [79] La surexpression de certains systèmes antioxydants tels que le système thioredoxine sont indispensables car ils permettent, après translocation dans le noyau, de maintenir un environnement réducteur à proximité de l'ADN afin de permettre la fixation des facteurs de transcription sur le matériel génétique et l'expression génique.

Le facteur p53 joue d'ailleurs un rôle ambigu concernant la régulation du stress cellulaire. Il est capable d'une part de répondre au stress oxydatif en déclenchant l'apoptose et d'autre part de réguler le stress oxydant par des mécanismes de défense. La glutaminase 2 (GS2), à l'origine d'une synthèse de novo de GSH, est up-régulée par le p53. Le NRF2 est un facteur de croissance majeur de la réponse antioxydante capable, après translocation dans le noyau, d'activer l'antioxydant response element (ARE) permettant l'up-régulation de plusieurs antioxydants. Pour de faibles concentrations en ERO, le facteur NRF2 est ubiquitinylé par le kelch-like ECH associating protein 1 (KEAP1) en

vue de sa dégradation par la voie du protéasome. En revanche, lors d'un stress oxydant, le p53 stimule l'expression de la protéine p21 capable de prévenir l'interaction entre le KEAP1 et le NRF2. [85] De plus, l'oxydation par les ERO des cystéines sensibles du KEAP1 inhibe son activité de répression sur le NRF2 (figure 3.7). [78] La perte de fonctionnalité du gène p53 dans certains cancers revêt un intérêt clinique car la dérégulation rédox peut être exploitée comme une « brèche oxydative » afin de potentialiser les effets oxydatifs d'une chimiothérapie. De cette manière, les cellules malignes peuvent être éliminées plus sélectivement. [85] Une théorie récurrente permet de mieux appréhender le rôle paradoxal du p53 en réponse à la signalisation rédox. En cas de faibles dommages oxydatifs subis par l'ADN, le p53 module l'activité des ERO par promotion des antioxydants. A *contrario*, si les dommages génomiques sont trop importants, le p53 initie la mort cellulaire par apoptose. [80] D'autre part, une étude très récente a montré que l'oncogène K-Ras régule l'activité de transcription du NRF2 par l'intermédiaire de la voie des MAPK à un stade précoce du développement tumoral (MEK-ERK-JUN). [108, 109]

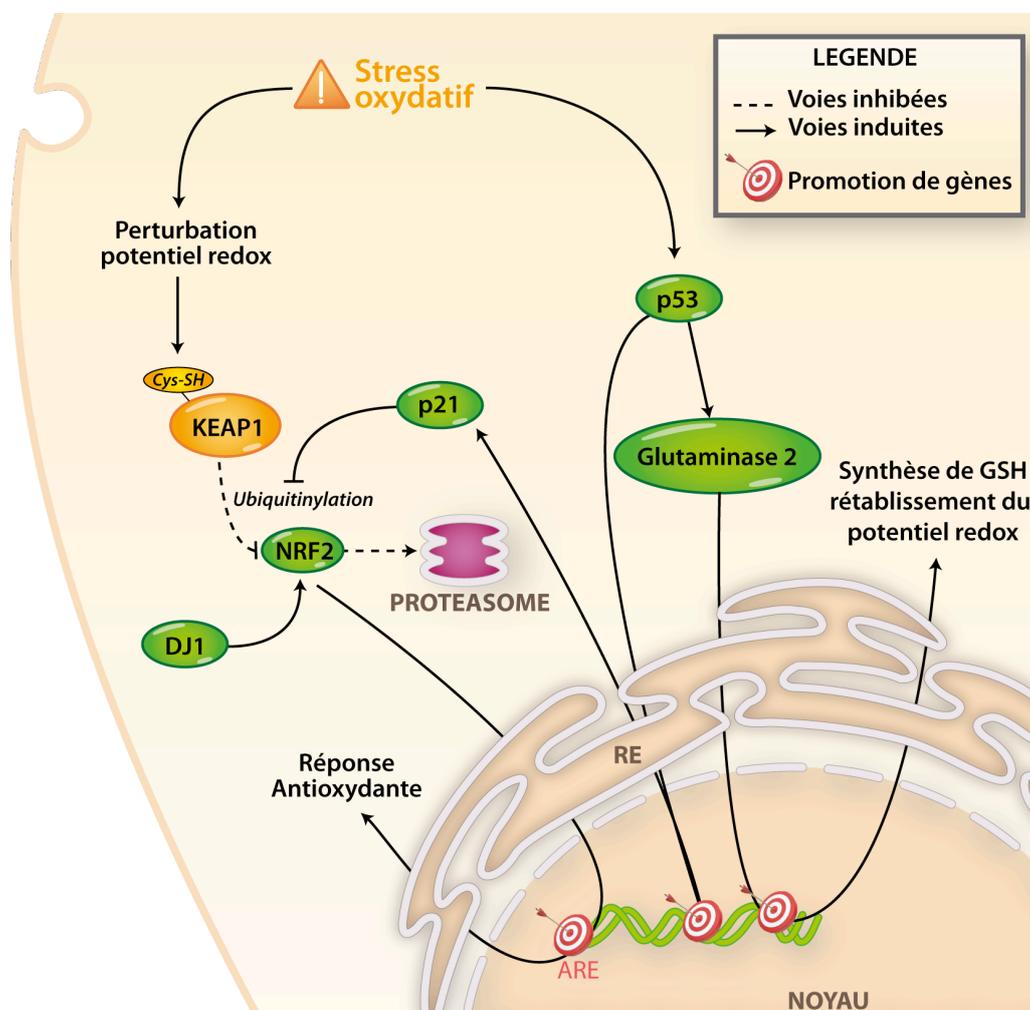


Figure 3.7 | Réponse du facteur de transcription p53 au stress oxydant et rôle du DJ1 dans le maintien d'une réponse antioxydante. [78, 85]

La protéine DJ1, similaire à p21, peut réguler l'activité de NRF2 par stabilisation. Dans des conditions normales, le DJ1 peut stimuler l'activité de l'AKT en régulant la fonction inhibitrice du PTEN à l'instar du peroxyde d'hydrogène. Bien que ce mécanisme pourrait être tenu comme responsable de la tumorigénicité du DJ1, la surexpression de cette protéine permet aux cellules tumorales de répondre à un surcroît des ERO et leur donne un avantage certain contre l'apoptose. Chez des patients présentant différents types de cancers tels que le cancer du poumon, le cancer ovarien et le cancer de l'oesophage, une surexpression de DJ1 est facteur de mauvais pronostic. [85]

Le facteur de transcription MYC étudié plus haut pour ses facultés à promouvoir le shift métabolique et à participer à la régulation rédox en favorisant la voie des pentoses phosphates est responsable de phénomènes additionnels capables de réguler le stress cellulaire. En fournissant le substrat initial, le MYC favorise la glutaminolyse par deux moyens : (i) l'induction de l'expression des transporteurs de la glutamine, (ii) et l'augmentation des taux de glutaminase 1 (première enzyme de la voie concernée). Or la glutaminolyse a pour produit final le glutamate qui par action de la glutathione cystéine ligase (GCL), conduit à la formation de GSH, l'antioxydant intracellulaire le plus abondant. Notons aussi l'importance dans le métabolisme tumoral de la conversion du glutamate en  $\alpha$ -cétoglutarate alors introduit dans le cycle de Krebs. Cette réaction anaplérotique permet de ne pas laisser le cycle de Krebs « hors service » après le shift métabolique, tant il est un indispensable support à de nombreuses réaction de biosynthèse.

L'adaptation des cellules tumorales au stress oxydant est donc synonyme d'échappement à l'apoptose et de perpétuation des ERO. En l'absence de la mise en place de mécanismes de contrôle rédox qui constituent un des trois besoins essentiels aux cellules en division, l'étape d'initiation tumorale ne pourrait pas être suivie d'une prolifération cellulaire. En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire en ERO au delà d'un certain seuil, devient toxique pour la cellule tumorale et entraîne sa mort par apoptose (figure3.8).

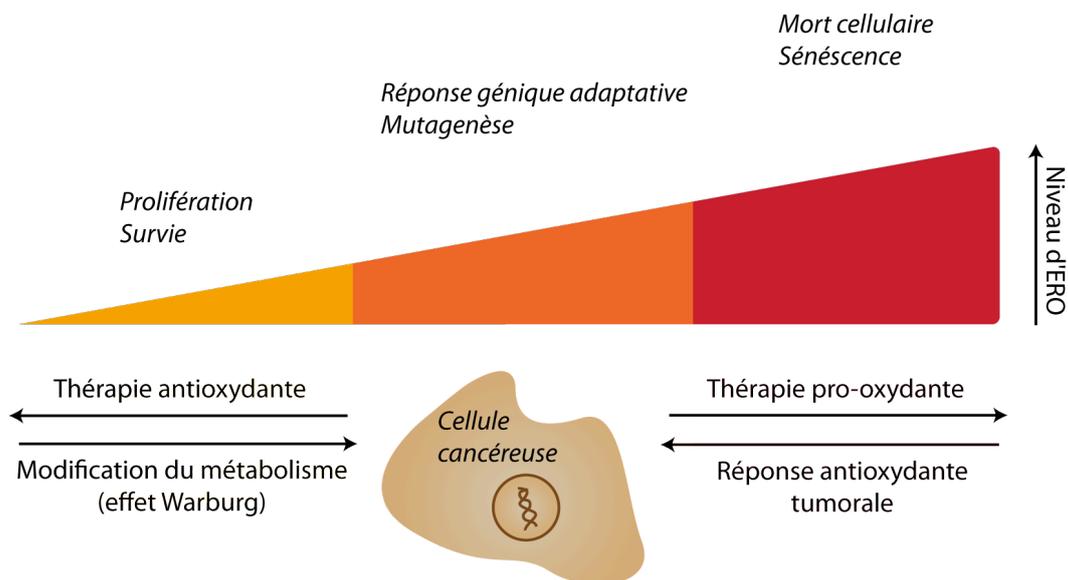


Figure 3.8 | Relation entre niveau des ERO et développement tumoral. [85] | Les modifications métaboliques tumorales induisent une augmentation du taux des ERO. Lorsque le taux des ERO devient trop important, la cellule doit développer une réponse antioxydante pour échapper à l'effet délétère des espèces oxydantes. Une réponse génique adaptative voir des mutations additionnelles sont nécessaires au maintien d'un taux des ERO moyen et sont parfois responsables des mécanismes de résistance à l'encontre des thérapies pro-oxydantes.

### 2.5.6. Effet Warburg et équation de Nernst

Arrêtons nous quelques instants sur l'impact du shift métabolique sur le statut rédox cellulaire. Le statut rédox est un terme largement employé, et dont nous avons eu recours pour faire référence aux radicaux libres et au stress oxydant. En réalité, ce terme « statut rédox » est mal défini et parfois utilisé de manière non appropriée. Historiquement le statut rédox définit le ratio entre l'espèce oxydé et l'espèce réduite d'un couple rédox. Mais l'environnement cellulaire ne se résume pas à un couple rédox particulier, il comprend de nombreux couples dont le potentiel rédox varie. En 2001, Schafer *et al.* ont proposé une définition de l'environnement rédox tout à fait intéressante. Selon ces auteurs, le potentiel rédox intracellulaire est défini par la somme des potentiels de réduction des différents couples rédox intracellulaires pondérée par la concentration de l'espèce réductrice correspondante :

$$\text{Environnement redox} = \sum_{i=1}^{n(\text{couple})} E_i [\text{Espèce réduite}]_i$$

$E_i$  est le potentiel de demi cellule du couple rédox (donné par l'équation de Nernst) et  $[\text{Espèce réduite}]_i$  est la concentration de l'espèce réduite du couple rédox  $i$ . Il est inenvisageable et non pertinent de mesurer l'ensemble des potentiels de tous les couples présents dans le milieu cellulaire. La restriction aux couples à la fois les plus importants quantitativement et les plus réducteurs, c'est à dire le glutathion (GSSH/2GSH), la thiorédoxine (TrxSS/Trx(SH)<sub>2</sub>) et le nicotinamide dinucléotide (NADP<sup>+</sup>/NADPH) et suffisante pour estimer le potentiel rédox cellulaire. Généralement le seul

couple GSSH/2GSH suffit même à en donner une bonne estimation. À 25°C et pH 7,  $\{E_i(\text{GSSH}/2\text{GSH}) = -240 \text{ mV} ; [\text{GSH}] = 5 \text{ mM}\}$  et  $\{E_i(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) = -370 \text{ mV} ; [\text{NADPH}] = 0,1 \text{ mM}\}$ , l'environnement rédox est fortement influencé par le glutathion à cause de sa forte concentration intracellulaire :

Environnement rédox =

$$(5 \text{ mM} \times -240 \text{ mV}) + (0.1 \text{ mM} \times -370 \text{ mV})$$

$$[(-1200) + (-40)] \text{ mV mM} = -1240 \text{ mV mM}$$

Du fait de la forte concentration du GSH devant le NADPH, le potentiel rédox de la cellule est correctement apprécié par le potentiel de demi-cellule du glutathion. Diverses études montrent que la destinée de la cellule est fortement influencée par le potentiel rédox cellulaire. Ainsi, les changements du potentiel de demi-cellule du couple GSSH/2GSH correspondent à différents états cellulaires : prolifération  $E_{hc} = -240 \text{ mV}$ , différenciation  $E_{hc} = -200 \text{ mV}$ , apoptose  $E_{hc} = -170 \text{ mV}$ . En réponse à une surproduction des ERO les cellules tumorales doivent donc produire du glutathion et du NADPH en favorisant la glutaminolyse et la voie des pentoses phosphates afin de conserver un statut rédox leur permettant de poursuivre leur prolifération. L'oncogène MYC est donc fortement impliqué dans le maintien du potentiel rédox. De plus, selon les termes de l'équation de Nernst, le pH influe fortement sur le potentiel de demi-cellule, ainsi la diminution de pH entraînée par la surproduction de lactates a pour conséquence une augmentation du potentiel rédox. La mise en relation du métabolisme tumoral et du maintien du potentiel rédox cellulaire est une notion récente qui reste à explorer dans les années à venir. <sup>[110]</sup>

## 2.6. Échappement à l'apoptose

Les protéines Forkhead-box Class O (FoxO) sont des facteurs de transcription garants de l'équilibre critique entre prolifération cellulaire et mort cellulaire. Les FoxO sont capables de favoriser l'expression : (i) de gènes causant l'arrêt du cycle cellulaire (p21, p27), (ii) de gènes engagés dans la résistance au stress oxydant (Mn SOD, CAT, GADD45), (iii) et de gènes responsables de l'apoptose (FasL, BIM). La perte de fonction de ces protéines semble jouer un rôle fondamental dans la tumorigenèse, car elle entraîne la survie cellulaire et permet d'outrepasser les fonctions cellulaires normales qui restreignent la progression du cycle cellulaire. Les gènes FoxO appartiennent donc à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs. Leur rôle crucial est lié à la découverte de phénomènes de translocations associés à certains cancers au sein desquels les FoxO sont réprimés. Toutefois, des études récentes montrent que la perte de fonction des FoxO peut intervenir dans d'autres types de cancers. En effet, la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur PTEN régule négativement

les FoxO par la voie de signalisation PI3K/AKT. L'AKT phosphoryle les facteurs FoxO et facilite leur translocation du noyau vers le cytoplasme par fixation de la protéine 14-3-3. Ainsi les FoxO sont séquestrés dans le cytoplasme où ils ne peuvent pas réguler la transcription génique. Comme nous l'avons exposé plus haut, les ERO sont incriminés dans la perte de fonction de la PTEN et favorisent par ce biais la survie cellulaire (figure 3.9). L'activation des FoxO est responsable de l'apoptose après activation de différents effecteurs comme le TRAIL, le FasL et le BIM. D'ailleurs dans les cancers du sein sensibles au paclitaxel, l'up-régulation de la FoxO3a participe à la réponse au traitement car l'augmentation de l'expression de BIM conduit les cellules à la mort. La suractivation de la voie PI3K/AKT, caractérise de nombreux cancers et représente véritablement une cible thérapeutique très intéressante. Des études récentes axent leur recherches sur l'inactivation du PI3K initiateur de la cascade signalétique. Plusieurs agents, dont certains issus de l'alimentation, permettent d'annuler l'effet de la voie PI3K/AKT sur les facteurs FoxO. Ainsi, la curcumine, un polyphénol alimentaire, est capable de déclencher l'apoptose dépendante des caspases par activation du FoxO sur des cultures cellulaires de leucémie lymphoblastique. L'(-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG), le polyphénol le plus important du thé, empêche l'activation de l'AKT de manière EGFR-dépendante sur des cultures cellulaires de cancer du col de l'utérus. La phosphorylation du FoxO est ainsi réduite et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. <sup>[111, 112]</sup> Notons toutefois que les inhibiteurs de tyrosine kinase déjà sur le marché permettent également d'inhiber cette voie.

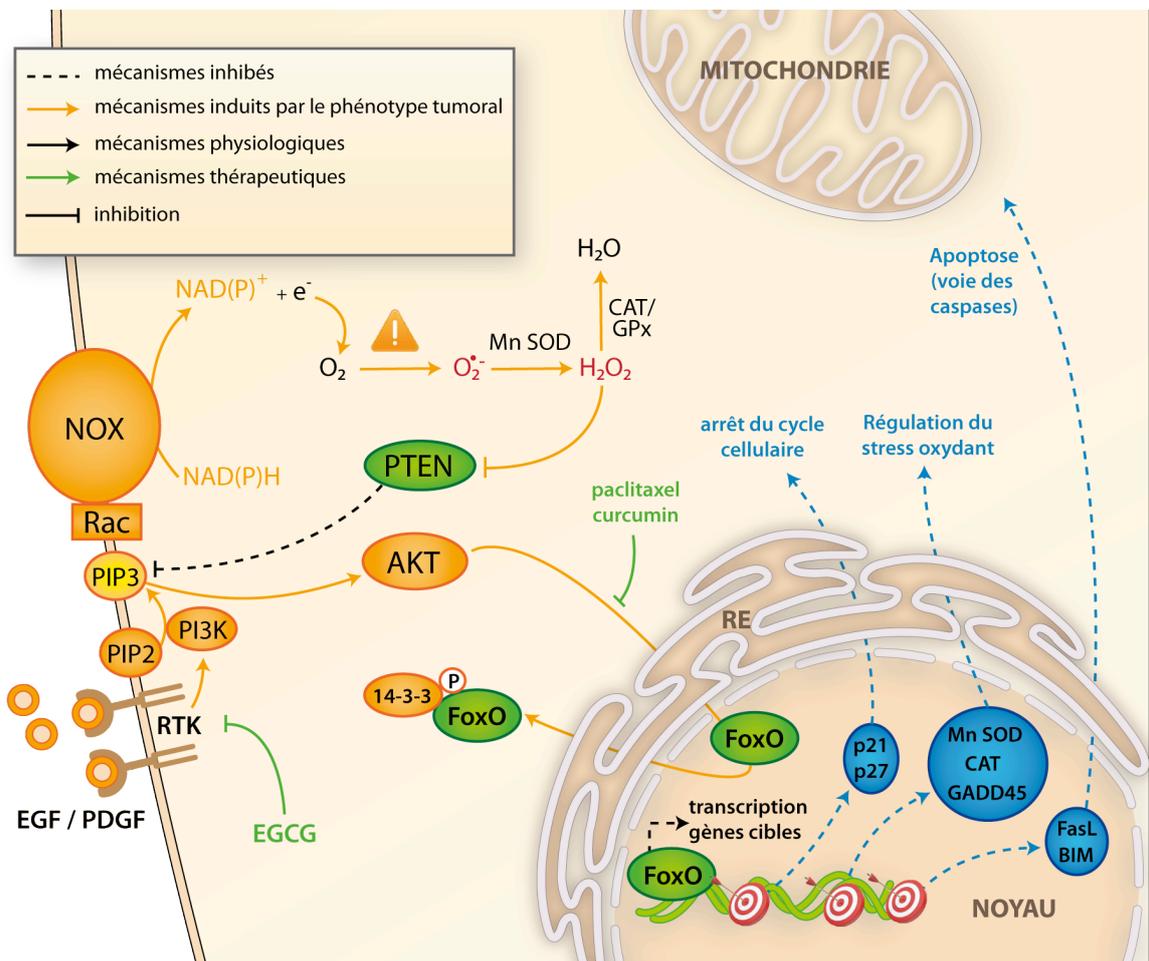


Figure 3.9 | Inhibition du facteur de transcription FoxO par la voie PI3K/ATK. [111, 112]

## 2.7. Angiogenèse

L'angiogenèse est une étape incontournable pour les tumeurs solides. Elle leur permet de croître, de se procurer les éléments nécessaires à leur intense métabolisme et d'évoluer vers un stade métastatique. L'apparition d'un phénotype tumoral angiogénique est qualifié de « switch angiogénique » et marque la cassure avec le précédent phénotype tumoral « dormant ». Ce processus fait donc l'objet d'une intense recherche en thérapeutique antitumorale. Les ERO et notamment le peroxyde d'hydrogène est largement suspecté de participer à l'angiogenèse tant pour ses propriétés oxydantes que pour son rôle de médiateur dans la signalisation cellulaire.

La phase de progression des tumeurs est caractérisée par une induction de facteurs pro-angiogéniques tels que le vascular endothelial growth factor (VEGF), leur récepteurs (VEGFR) et les matrix métalloprotéinases (MMP) au sein des cellules endothéliales (CE). Le VEGF est l'un des plus importants facteurs de croissance de l'angiogenèse, il stimule la perméabilité, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il peut également de mobiliser des cellules progénitrices endothéliales à partir de la moelle osseuse. De nombreux stimuli tels que l'hypoxie, les facteurs de croissance, l'action des cytokines ou le stress oxydatif sont capables d'accroître l'expression de VEGF

au niveau des cellules tumorales. L'association de ces stimuli à la suractivation des voies de signalisation (ERK, PI3K) est la source de la surproduction tumorale en VEGF. Or comme nous l'avons vu, ces voies signalétiques sont potentialisées par l'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène sur les PTP. En cas d'hypoxie, la production de VEGF est accentuée par l'intermédiaire de l'HIF1 dont la présence est liée à une surproduction mitochondriale de peroxyde d'hydrogène. Les ERO donnent donc aux CE des fonctions de prolifération, de migration et de réorganisation du cytosquelette. Les phénomènes d'ischémie-reperfusion et l'adhésion de leucocytes activés causent une surproduction d'ERO au sein des CE responsables de la formation de capillaires. La leptine, une adipocytokine circulante, permet l'up-régulation du VEGF et donc la stimulation de la prolifération des CE par l'intermédiaire d'un accroissement des ERO. Ce sont également les ERO qui stimulent l'angiogenèse myocardique et le développement de collatérales lors de courtes périodes d'ischémie-reperfusion. Tous ces éléments soulignent l'omniprésence des ERO dans les phénomènes d'angiogenèse. Dans les CE les ERO sont principalement produites par les NOX. Différentes isoformes de ces enzymes sont impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse. Par exemple, la NOX1 membranaire permet aux CE de migrer et de proliférer tandis que la NOX4 nucléaire fournit une production basale de radicaux superoxydes conduisant une modification de l'expression génique au service de la croissance et la différenciation cellulaire. Les NOX produisent des radicaux superoxydes qui peuvent être dismutés en peroxyde d'hydrogène soit spontanément, soit par les SOD. Diverses expérimentations ont montré que les SOD favorisent l'angiogenèse, et que par conséquent, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important dans l'angiogenèse.

Il existe deux types de récepteurs au VEGF : le VEGFR1 et le VEGFR2. L'effet mitogène et chimiotactique du VEGF dans les CE est principalement lié au VEGFR2 qui est activé par autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine cytoplasmiques. Différentes voies de signalisation peuvent ensuite être activées, telles que la voie des MAPK et de l'AKT essentielles pour la migration et la prolifération des CE. La stimulation engendrée par le VEGF augmente la production d'ERO via une NOX dépendante de la protéine GTPase Rac. Plusieurs équipes de recherche ont montré que les ERO sont impliqués dans l'autophosphorylation du VEGFR2. La signalisation médiée par le VEGFR2 varie dans le temps et dans l'espace cellulaire en fonction de la répartition des NOX, créant ainsi des « compartiments » à l'échelle subcellulaire au sein desquels la production d'ERO permet de conduire certains événements signalétiques. En plus de l'autophosphorylation des VEGFR2, les ERO agissent en inhibant des protéines tyrosine phosphatase (PTP) comme la SHP-1, la SHP-2 et la PTEN qui régulent négativement l'activité des VEGFR2. Les facteurs de transcription touchés par les voies de signalisation cellulaire déclenchées par le VEGF sont pour les plus

connus, l'HIF-1, le Ref-1, le p53 et le NK-κB jouant chacun leur rôle dans la mise en place de l'angiogénèse.

La forte implication des ERO dans l'angiogénèse rend légitime la mise en place de thérapeutique à visée antioxydante ou anti-NOX. D'ailleurs de nombreuses études sur des modèles animaux montrent les propriétés anti-angiogénique de certains polyphénols comme l'EGCG. [113]

## 2.8. Invasion et métastases

Le stade métastatique représente le stade évolutif le plus dévastateur du cancer. Il amène dans son sillage les différentes causes de décès liées à la maladie. En effet, la défaillance des organes colonisés, les syndromes paranéoplasiques et les graves effets indésirables systémiques de la chimiothérapie sont à l'origine de nombreux décès. Malgré les progrès significatifs dans le domaine du dépistage précoce, un nombre important de cancers sont détectés au stade métastatique. Les ERO et ERN jouent encore, à cette étape déterminante du développement tumoral, un rôle prépondérant dans les séquences événementielles qui permettent aux cellules de coloniser des sites secondaires à partir d'une tumeur primitive. Certains auteurs ont récemment souligné l'importance des ERO comme cible thérapeutique dans la prévention des métastases tumorales. [78]

### 2.8.1. Transition épithéliale-mésenchymateuse

L'évolution métastatique est multiséquentielle. La première étape est l'*invasion* au cours de laquelle les cellules vont pénétrer dans la matrice extracellulaire (MEC) en se détachant des cellules voisines. Ensuite, elles vont atteindre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et y pénétrer : c'est l'*intravasation*. Les cellules tumorales circulantes ne vont pas toutes survivre dans le sang, mais quelques unes vont pouvoir pénétrer l'endothélium des capillaires par *extravasation*, puis enfin coloniser un organe distant par formation de *micrométastases*. La dernière étape, la colonisation est caractérisée par la croissance des micrométastases. [91] Nous allons focaliser notre attention sur la première étape qui voit naître une transformation cellulaire désignée par le terme de « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM). Cette « métamorphose » permet le franchissement de la membrane basale par les cellules tumorales faisant saillie dans le tissu conjonctif. Afin d'y parvenir, les cellules tumorales doivent perdre leur polarité cellulaire et se détacher des cellules adjacentes, accroître leurs interactions avec la MEC, et migrer de la MEC vers les vaisseaux sanguins ou les vaisseaux lymphatiques. [78] Les ERO sont étroitement impliquées dans la TEM par potentialisation de certaines voies de signalisation cellulaire ou par induction de facteurs de croissance. *In vitro*, un traitement répété par de faibles doses de peroxyde d'hydrogène favorise la TEM. [114]

Lors de la TEM les cellules cancéreuses sont amenées à diminuer l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire (cadhérines E) et à augmenter l'expression des molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire (intégrines). Les premières recherches dans le domaine de l'invasion tumorale ont clairement montré l'implication des altérations de l'adhésion intercellulaire. L'altération la plus probante étant celle des cadhérines E, une molécule clef de l'adhésion intercellulaire. D'ailleurs, le dysfonctionnement de l'expression des gènes codants pour les cadhérines E sont retrouvés dans des carcinomes agressifs. Or, les ERO peuvent supprimer l'expression des cadhérines E par potentialisation du facteur de transcription Snail. Les intégrines sont des protéines transmembranaires assurant non seulement des fonctions d'adhésion mais également un rôle important de signalisation cellulaire par suite d'une succession alternée de rupture et d'établissement de contacts focaux avec la MEC. <sup>[115]</sup> La signalisation déclenchée par les intégrines agit de concert avec la signalisation provenant de l'activation des RTK pour favoriser l'invasion. Les RTK sont activés par des cytokines telles que transforming growth factor (TGF), et l'hépatocyte growth factor (HGF) provenant de l'environnement tumoral. Différentes cascades de signalisation intracellulaires faisant appel aux ERO peuvent relayer les signaux émis par les intégrines et les RTK : la focal adhesion kinase (FAK), la Src et les MAPK. <sup>[116]</sup>

Plusieurs études confirment que les ERO potentialisent l'activation des cascades intracellulaires (e.g., MAPK) en coordonnant les signaux produits les récepteurs membranaires (e.g., intégrines, RTK). La phosphorylation de la FAK par les intégrines et les RTK permet la formation du complexe la FAK/Src capable d'initier les cascades des MAPK. L'action de médiateur/coordonnateur des ERO est liée à l'inactivation de PTP, régulateurs négatifs du complexe FAK/Src et des MAPK. <sup>[116]</sup> La coordination des signaux extracellulaires et l'inhibition des PTP permettent l'activation prolongée de la voie des MAPK (à la différence de l'activation consécutive à la fixation de ligands mitogènes qui agissent de manière transitoire et brève) responsable d'une réponse génique tardive associée à une production de protéines (e.g., matrix métalloprotéinases) participant à l'invasion tumorale ainsi qu'à la formation de lamellipodes<sup>i</sup>.

La capacité métastatique des cellules tumorales s'acquiert aussi par reprogrammation génétique. La récurrence de certains profils génétiques dans les tumeurs métastatiques suggère l'implication de facteurs de transcription clefs, qui une fois activés, sont capables d'orchestrer une réponse transcriptionnelle nécessaire à la croissance métastatique. De plus en plus d'études indiquent l'HIF1 comme un de ces facteurs clef. En participant activement au shift métabolique, l'HIF1 permet l'acidification de l'environnement tumoral par surproduction de lactates. La résistance des cellules tumorales à

---

<sup>i</sup> Les lamellipodes sont des protusions cytoplasmiques couplées à la polymérisation de filament d'actine permettant la migration des cellules.

cette acidification leur procure un avantage sélectif par rapport aux cellules voisines. De plus, le faible pH favorise la dégradation de la MEC par les MMP et la surexpression de VEGF. Or, les ERO permettent de différentes façons la stabilisation de l'HIF1, par la voie PI3K/AKT et par la production de peroxyde d'hydrogène mitochondrial. [78]

Les différentes action des ERO décrites montrent leur rôle déterminant dans l'évolution métastatique et valorisent l'emploi d'antioxydants dans la thérapeutique anti-métastatique. Certains auteurs suggèrent en effet que des antioxydants tels que le lycopène et l'EGCG pourraient être pourvus de ces propriétés anti-métastatiques.

## 2.9. Conclusion

À ce stade de l'exposé, il ne réside plus de doute quant à l'implication des ERO dans la tumorigenèse. Les exemples développés en regard des caractéristiques essentielles émises par Hanahan & Weinberg, impliquent les ERO dans les deux caractéristiques inaugurales et dans cinq autres caractéristiques du cancer. La figure 3.10 résume les différentes voies signalétiques auxquelles les ERO participent lors de la mise en place des caractéristiques du cancer. Les ERO sont donc omniprésentes dans le développement tumoral et le recours théorique aux antioxydants semble être pertinent tout en étant contradictoire avec un traitements non chirurgicaux. Dans la partie suivante, nous aborderons la question de l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie par l'analyse des essais cliniques disponibles à ce sujet dans la littérature scientifique. Nous examinerons également le potentiel thérapeutique de certains antioxydants sur les voies de signalisation cellulaire précédemment décrites.

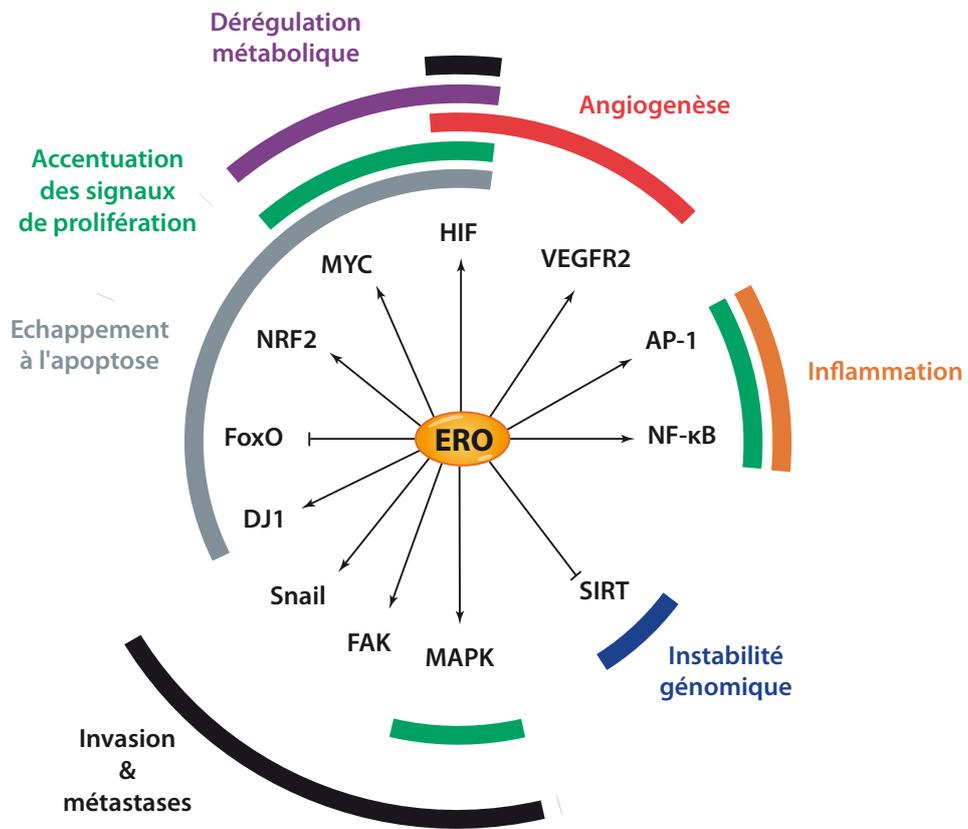


Figure 3.10 | Participation des ERO dans la mise en place des caractéristiques du cancer.

ANALYSE DES ÉTUDES PUBLIÉES  
ET PERSPECTIVES D'UNE  
SUPPLÉMENTATION EN ANTIOXYDANTS

## 1. État des lieux de la supplémentation en antioxydants

Aux USA, les patients dont le diagnostic de cancer a été établi ont fréquemment recours à une supplémentation en antioxydants au cours de leur chimiothérapie. Cependant, très peu d'études pertinentes sont disponibles pour justifier cette supplémentation en terme d'innocuité et d'efficacité. [7] La littérature scientifique suggère que 24 à 84% des patients au cours ou à la suite d'une chimiothérapie ont utilisé des suppléments en antioxydants, le plus souvent à des doses supérieures aux valeurs nutritionnelles recommandées. [6,7] L'étendue de ces pourcentages montre la difficulté à établir des données exactes en raison du faible nombre d'études ciblées sur ce sujet. Le plus souvent, les études s'intéressent à l'ensemble des thérapies alternatives et complémentaires auxquelles les patients ont recours pendant la chimiothérapie. Or, ces études globales ne permettent généralement pas de dissocier une supplémentation en antioxydants d'une supplémentation en vitamines et/ou minéraux et/ou plantes. Ces données montrent néanmoins clairement l'implication des patients dans leur maladie et leur volonté de s'y impliquer activement. Toutefois, ils occultent souvent le recours à une supplémentation à leur oncologue. [117]

En France, une étude prospective récente incluant 79 patients hospitalisés à l'hôpital Cochin s'est intéressée à la supplémentation en antioxydants chez des patients recevant une chimiothérapie. Cette étude rapporte que 24% des patients se supplémentent en antioxydants. Il s'agit d'ailleurs de la thérapie alternative et complémentaire la plus fréquemment rencontrée chez ces patients. Les antioxydants choisis en priorité par les patients sont à base de sélénium (24%), de thé vert (24%) et de vitamines ACE (9%). Cette étude a également révélé qu'une majorité de patients n'informe pas leur clinicien de cette supplémentation. Malheureusement, aucune étude n'explore les raisons qui poussent les patients à l'auto-supplémentation. Cet engouement doit pourtant trouver ses fondements dans une source commune étant donné les fréquences élevées retrouvées autour de trois principaux suppléments parmi l'immense famille des antioxydants. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la dernière décennie a connu la publication du best-seller vendu à plus de 400 000 exemplaires, *Anticancer* de David Servan-Schreiber qui a trouvé écho auprès de nombreux médias malgré les vives réactions de certains détracteurs. Plus récemment, la publication du livre *Le vrai régime anticancer* par le Pr. David Khayat a relancé le débat de l'intérêt d'une alimentation adaptée dans la prévention contre le cancer (la légitimité de son ouvrage étant appuyée par son étiquette de chef de service de cancérologie à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et d'ancien président de l'Institut National du Cancer). Ces livres, même s'ils se contredisent par moments, se retrouvent sur le fond et ont pour vocation première d'édicter des règles de prévention primaire à l'encontre du cancer. Toutefois, la distinction claire entre prévention primaire et prévention secondaire y est parfois très difficile à retrouver et peut être source de confusion chez les patients. Quand on relève la part auto-

biographique de l'ouvrage de David Servan-Schreiber, l'ambiguïté est partiellement levée sur la nécessité d'une alimentation riche en antioxydants polyphénoliques, en sélénium et en thé vert au cours d'un cancer. L'auteur recommande ainsi de consommer jusqu'à 6 tasses de thé vert par jour. *Le vrai régime anticancer*, fait également l'apologie des antioxydants polyphénoliques tels que l'EGCG du thé vert, le curcuma et le resvératrol comme étant des « *nutriments anticancer* ». Face à de telles recommandations et en raison de la complexité de l'implication des processus pro-oxydants dans la biologie tumorale et dans le traitement des tumeurs, il est légitime de s'interroger sur l'intérêt réel d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie.

## 2. Un sujet non consensuel

L'état actuel des connaissances ne permet pas de réunir les praticiens autour d'un consensus sur le sujet de la supplémentation en antioxydants. L'absence de données pertinentes reflète la complexité à réaliser des essais cliniques tenant compte des multiples paramètres faisant de chaque patient un cas particulier. Il serait très fastidieux voir impossible de réaliser des essais cliniques pour chaque régime de chimiothérapie, chaque localisation tumorale et chaque antioxydant car la combinaison des trois paramètres donne lieu à de multiples possibilités. Face à la forte consommation en antioxydants chez les patients en cours de chimiothérapie, on ne peut se permettre d'attendre la mise en place de tels essais cliniques multiples pour émettre des recommandations. Afin d'identifier les éventuels intérêts d'une supplémentation en antioxydants lors d'une chimiothérapie, il faut donc isoler les caractéristiques communes à la majorité des patients traités qui pourraient justifier une telle pratique.

## 3. Arguments en défaveur d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie

Au cours de la dernière décennie, la littérature scientifique au sujet de la supplémentation en antioxydants a été empreinte d'une grande prudence en l'absence d'essais cliniques correctement menés. En octobre 2005, un article de Gabriella M. D'Andrea publié dans *CA-A Cancer Journal for Clinicians*<sup>i</sup> a fortement influencé l'ensemble de la communauté scientifique sensibilisée au sujet de la supplémentation en antioxydants. D'ailleurs, la quasi totalité des publications postérieures citent dans leur 20 premières références bibliographiques cet article qui affiche clairement une opposition quant au recours en antioxydants chez les patients cancéreux.<sup>[1]</sup> Cet avis a le mérite de s'attacher au principe « *primum non nocere*<sup>ii</sup> ». La réduction de l'efficacité des chimiothérapies par interaction

---

<sup>i</sup> Journal scientifique incontournable dans le domaine de la cancérologie, avec le plus fort impact factor toutes catégories confondues édité par l'American Cancer Society. N.B: IF 2006 = 63,342 / IF 2010 = 94,262.

<sup>ii</sup> « d'abord, ne pas nuire ».

entre le mécanisme d'action des agents cytotoxiques et les antioxydants est la crainte majeure avancée pour justifier une telle position défavorable. [118]

### 3.1. Les antioxydants : antagonistes des chimiothérapies ?

Le mécanisme d'action commun à de nombreux anticancéreux à l'encontre des cellules tumorales s'appuie sur une génération d'ERO toxiques pour les cellules tumorales. La liste non exhaustive des molécules qui utilisent ce mécanisme sont les agents alkylants (e.g., melphalan, cyclophosphamide), les sels de platines (e.g., carboplatine, oxaliplatine), les anthracyclines (e.g., doxorubicine, épirubicine), les épipodophylotoxines (e.g., étoposide), et les camptothécines (e.g., irinotécan, topotécan). D'autres molécules telles que les taxanes (e.g., paclitaxel, docetaxel), les vinca-alcaloïdes (e.g., vincristine, vinblastine), les antimétabolites (e.g., méthotrexate, 5-fluorouracile, cytarabine) génèrent également des ERO même si ce n'est pas leur mécanisme d'action principal. [6] De nombreux patients cancéreux reçoivent généralement un de ces produits incontournables lors des cures de chimiothérapie. La génération des ERO par ces cytotoxiques répond au critère de sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales. En effet, les cellules cancéreuses présentent un taux élevé d'ERO nécessitant le déploiement d'un ensemble de mesures pour faire face au stress oxydant. À ce titre, elles sont dépendantes de mécanismes de compensation sans lesquels elles ne pourraient survivre. De plus, elles sont sensibles à l'apport exogène en ERO, car leur concentration intracellulaire en ERO est proche du seuil toxique à la différence des cellules normales (figure 4.1). L'induction préférentielle de la mort des cellules tumorales par apport exogène des ERO repose sur le principe de déséquilibre de la balance rédox menant le stress oxydant cellulaire au-delà du seuil toxique responsable du déclenchement de l'apoptose. [79, 119]

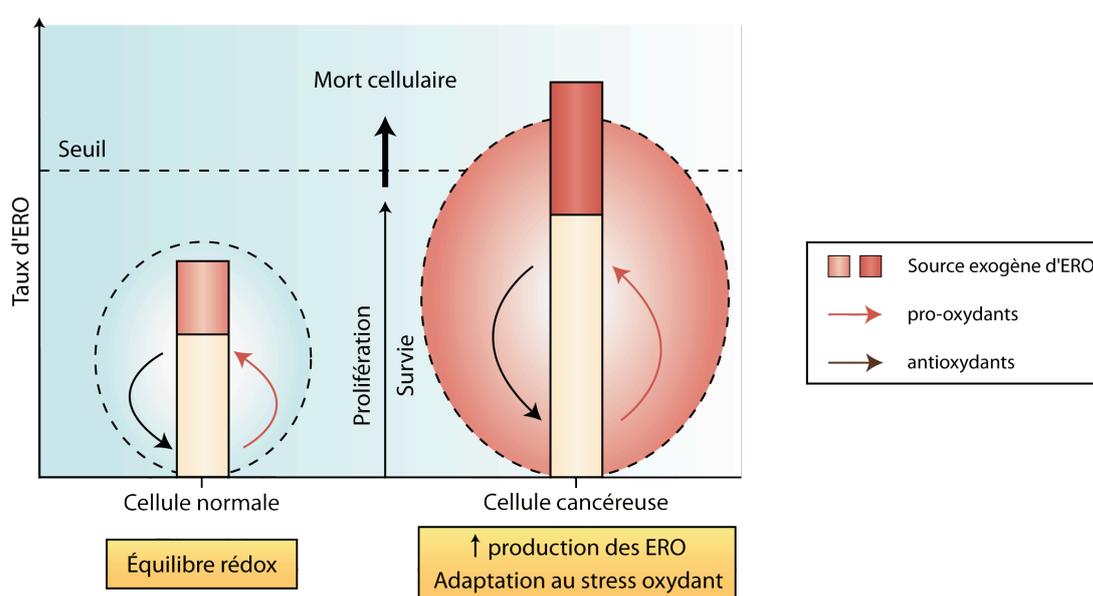


Figure 4.1 | Sélectivité de l'action délétère des ERO exogènes sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. [79]

### 3.2. Intérêt naissant du ciblage des systèmes tampons : un contrepied à la supplémentation en antioxydants

Certaines cellules cancéreuses, et notamment à un stade de cancer avancé, possèdent de nombreuses défenses contre le stress oxydant endogène mais également exogène, leur permettant de développer des résistances envers les anticancéreux. [79] Le phénomène de sélection des cellules souches tumorales abordé dans la partie III joue certainement un rôle prépondérant dans ces mécanismes de résistance. En favorisant le développement des phénotypes tumoraux ayant un fort pouvoir de réponse génique face aux ERO exogènes, les tumeurs deviennent difficiles à traiter avec des agents conventionnels. Une étude clinique récente réalisée sur des patientes atteintes de cancer du sein a permis de vérifier ces mécanismes en déterminant les profils génétiques impliqués dans la résistance aux traitements par profilage sur microarray. Toutes les patientes étaient traitées par le docetaxel (Taxotere®), une des molécules les plus utilisées dans le traitement du cancer du sein. Les non répondeurs au traitement ont été associés à une up-régulation des gènes responsables du contrôle redox par le biais des systèmes glutathion et thiorédoxine. À plusieurs reprises une surexpression du système thiorédoxine - thiorédoxine réductase (Trx - TrxR) a été retrouvée dans de nombreuses tumeurs primitives comme celles du cancer du sein, du cancer de la thyroïde, du cancer de la prostate, et du cancer du foie. De plus, la surexpression de Trx est corrélée à une croissance tumorale agressive avec un pronostic sombre. Des études *in vitro* montrent une diminution de la croissance et de la prolifération cellulaire associée à une meilleure sensibilité aux traitements des cellules dont la Trx réductase a été inhibée. [96] Le développement de thérapeutiques permettant de cibler ces systèmes tampons semblerait donc opportun, de façon à lutter contre les tumeurs chimiorésistantes tout en conservant une stratégie pro-oxydante. La déplétion en antioxydants constitue une alternative à l'apport des ERO exogènes afin de créer un déséquilibre redox pouvant conduire la cellule cancéreuse à franchir le seuil toxique de concentration en ERO. Certaines études montrent que le ciblage des mécanismes s'appuyant sur les thiols (GSH, Trx), pourrait être intéressant dans la prise en charge des tumeurs résistantes aux ERO. [93] C'est le cas d'une étude pré-clinique prometteuse montrant le potentiel cytotoxique d'une molécule naturelle issue du raifort<sup>i</sup>, le  $\beta$ -phenylethyl isothiocyanate (PEITC), sur des cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC) résistantes à la fludarabine. L'objectif de ce traitement est de potentialiser jusqu'au seuil toxique la surproduction endogène des ERO des cellules lymphoïdes par déstabilisation des systèmes antioxydants. [120] L'intérêt futur de ce type de molécules réside en une action synergique capable d'outrepasser les mécanismes de résistance avec des agents cytotoxiques conventionnels générant des ERO. En outre, leurs actions combinées permettraient théoriquement de réduire l'apport exogène des ERO néces-

---

<sup>i</sup> Plante vivace de la famille des Brassicacées.

saires pour faire basculer la balance rédox des cellules cancéreuses vers un seuil toxique tout en conservant la même efficacité. La réduction de l'apport de la chimiothérapie conventionnelle permettrait également de réduire les nombreux effets indésirables qui l'accompagne. [88,93]

Selon ces données, les antioxydants enzymatiques apparaissent de plus en plus comme une cible potentiellement intéressante dans le développement de thérapies antitumorales « *anti-antioxydantes* ».

### 3.3. Mise en garde des études de prévention contre le cancer

La découverte récente de la non innocuité des antioxydants en prévention du cancer freine les cliniciens pour recourir à une supplémentation au cours d'une chimiothérapie, et non sans raison. En effet, après de nombreux espoirs fondés sur des études *in vitro*, plusieurs études épidémiologiques ont montré le manque d'efficacité d'une supplémentation en ce qui concerne les populations suffisamment pourvues en antioxydants via leur alimentation (SU.VI.MAX) et la toxicité potentielle d'une supplémentation dans certains sous-groupes de population (ATBC/CARET). Entre 1985 et 1993, l'étude finlandaise ATBC visant à établir l'incidence d'une supplémentation en alpha-tocophérol (50 mg/jour) et en bêta-carotène (20 mg/jour) sur l'incidence des cancers (du poumon en particulier), a dû être arrêtée prématurément. 29 133 hommes fumeurs âgés de 50 à 69 ans ont été enrôlés dans cette étude bien menée (randomisée, en double aveugle et contrôlée contre placebo). Une augmentation significative de l'incidence des cancers du poumon et de la mortalité en général a été démontrée dans le bras supplémenté en bêta-carotène. Ces données vont dans le sens de l'étude CARET menée au États-Unis sur 18 314 adultes, ayant également établi une augmentation de l'incidence des cancers du poumon chez des patients à risque (exposition à l'amiante ou au tabac) supplémentés en bêta-carotène. Les antioxydants n'apparaissent désormais plus comme des molécules dépourvues de toxicité. Cette non innocuité renforce les arguments en défaveur d'une supplémentation systématique en antioxydants pendant une chimiothérapie. D'ailleurs, la publication des données des études CARET et ATBC a poussé le comité éthique d'un essai clinique Québécois à stopper la supplémentation en bêta-carotène chez des patients sous chimiothérapie. L'étude partiellement interrompue devait permettre d'interpréter l'intérêt d'une supplémentation en vitamine E et en bêta-carotène chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou au cours d'une radiothérapie. Les données recueillies ont toutefois permis d'établir une nette réduction des effets indésirables de la radiothérapie lors d'une supplémentation, au détriment de l'efficacité thérapeutique des radiations. [121-125]

Dans cette section, nous nous attacherons uniquement à l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants chez les patients sous chimiothérapie et ne recevant pas de radiothérapie. Toutefois, l'étude de l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants chez les patients sous radiothérapie devrait faire l'objet d'une attention particulière au regard des données épidémiologiques montrant le recours fréquent aux antioxydants chez les patients cancéreux en règle générale. En effet, la radiothérapie utilise les espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau pour détruire les cellules cancéreuses. Les arguments en défaveur d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une radiothérapie se basent donc sur les mêmes craintes d'antagonisme d'action entre traitement et supplémentation.

#### 4. Arguments en faveur d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie

En 2000, la National Academy of Science a défini le terme « antioxydant » de la façon suivante : « substance provenant de l'alimentation et diminuant significativement les effets néfastes des ERO et/ou des ERN sur les fonctions physiologiques normales de l'homme ». <sup>[126]</sup> Le regroupement des innombrables représentants des antioxydants sous un même nom est peu informative quant à leur activité. En effet, s'ils portent le même nom, leur mode d'action n'est pas forcément un dénominateur commun ; même s'il est fréquent de restreindre leur activité à une action antiradicalaire. La définition des antioxydants par la National Academy of Science ne correspond pas à la vision restrictive et largement éprouvée qu'il en est faite. Cette restriction ne laissant que peu de place aux substances dont l'action sur les effets néfastes causés par les ERO/ERN se répercute par d'autres mécanismes que la capture des espèces radicalaires. La partie III de cet exposé ne laisse pourtant aucun doute quant à l'existence de nombreuses cibles potentielles pour contrer les effets favorables des ERO et ERN sur le développement tumoral (notamment au travers des différentes voies signalétiques). L'étendue de la famille des antioxydants et notamment la famille des polyphénols est à l'image des multiples actions physiologiques qu'ils peuvent initier : induction de l'apoptose, régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et modulation du système immunitaire (action sur l'inflammation). Il serait dommage de rejeter en bloc le recours à un tel arsenal thérapeutique potentiel en raison d'un antagonisme d'action avec les chimiothérapies génératrices d'ERO qui ne se justifie éventuellement qu'avec les antiradicalaires. Remarquons également que l'argumentaire porté par Gabriella M. D'Andrea ne s'appuie pas sur des essais cliniques pertinents mais plutôt sur des études *in vitro* inadaptées à la complexité de l'implication des ERO et ERN dans le développement tumoral. Même si la vigilance est de mise en vertu du principe exposé plus haut : « *primum non nocere* », des conclusions hâtives pourraient nous priver de perspectives réjouissantes offertes par différents antioxydants. L'existence sur le marché d'antioxydants de synthèse destinés à

réduire les effets indésirables de certaines chimiothérapies conforte l'intérêt d'une supplémentation. En effet, le dexrazoxane (Cardioxane®) largement utilisé et administré une demi-heure avant une chimiothérapie à base d'anthracyclines, contribue à réduire le stress oxydatif myocardique qui conduit généralement les patients vers l'insuffisance cardiaque à défaut de prévention.

#### 4.1. Supplémentation visant à diminuer les effets indésirables des chimiothérapies

La plupart des patients ayant recours à une supplémentation en antioxydants espèrent réduire les effets indésirables liés à la chimiothérapie, potentialiser les effets de la chimiothérapie, renforcer leur système immunitaire, ou bien tout simplement conserver une forme physique ou intellectuelle. [7, 125, 127, 128] Il s'agit également pour eux d'un moyen de s'impliquer dans leurs traitements. [3] Les effets indésirables nombreux et fréquents sont souvent difficiles à vivre pour les patients. Pour être pertinents, les adjuvants thérapeutiques capables d'atténuer ces effets indésirables, doivent réduire la toxicité des chimiothérapies sans en altérer l'efficacité et sans provoquer de désordres supplémentaires pour le patient. Selon deux méta-analyses récentes de 2007 et 2008 parues dans *Cancer Treatment Reviews* [129] et *International Journal of Cancer*, [6, 130] l'utilisation de certains antioxydants permettrait de réduire la toxicité de la chimiothérapie sans en affecter l'efficacité. Ces données prometteuses redonnent un élan quant à l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants. Le potentiel clinique majeur dégagé par ces études est de permettre aux patients supplémentés de recevoir des doses de chimiothérapie plus importantes et d'éviter l'arrêt prématuré des cures consécutif aux graves effets indésirables des cytotoxiques.

##### 4.1.1. Supplémentation en glutathion

Le glutathion fait partie des molécules antioxydantes ayant un fort potentiel lors d'une supplémentation au cours d'une chimiothérapie. Son utilisation, plus courante outre-atlantique, n'a pas été décelée lors de l'étude prospective menée récemment à l'hôpital Cochin. Toutefois, l'intérêt suscité par les données issues de certains essais cliniques mérite d'être exposé. L'action bénéfique d'une supplémentation en glutathion a été démontrée lors d'une méta-analyse regroupant 6 essais cliniques incluant des patients aux localisations tumorales différentes (ovaires, tête et cou, cancer gastrique, cancer colorectal) et tous traités par des sels de platines. Or comme nous l'avons déjà vu, les sels de platines agissent largement par la génération des ERO. L'usage de cet antioxydant qui peut à première vue paraître inapproprié en raison d'un éventuel antagonisme d'action, s'est en fait avéré bénéfique. Les sels de platine font l'objet d'une étroite surveillance en raison de la toxicité dose-dépendante (neuropathie, ototoxicité, myélosuppression). Lors des cures à base de cisplatine, la neurotoxicité est accrue au-delà de doses cumulées supérieures à 600 mg/m<sup>2</sup>. Parmi les

6 essais cliniques répertoriés par la méta-analyse, l'étude la plus prometteuse (score Jadad<sup>i</sup> à 5, 151 patients) montre que 58% des patients recevant le glutathion ont été en mesure de recevoir la totalité des 6 cures de chimiothérapie contre 39% dans le bras placebo (p = 0,04). 26 patients appartenant au bras témoin ont déclaré une néphrotoxicité aiguë conduisant à l'arrêt du traitement (p = 0,012) contre seulement 11 dans le bras supplémenté. La dose de glutathion utilisée était de 3000 mg/m<sup>2</sup> administrée 15 minutes avant le début de la chimiothérapie. L'analyse de l'ensemble des données des essais n'a pas montré de différence significative sur la réponse globale au traitement entre les différents groupes. Cela suggère que la supplémentation n'interfère pas avec l'action pharmacologique de la chimiothérapie. Toutefois, si l'on considère uniquement les deux études possédant un score Jadad de 5, la réponse globale est plus élevée dans le bras supplémenté. Une méta-analyse Cochrane recoupant les mêmes essais cliniques a conclu également à une protection significative contre la neurotoxicité induite par les sels de platines lors d'une supplémentation en glutathion. [129, 131, 132]

#### 4.1.2. Supplémentation en sélénium

La supplémentation en sélénium est fréquemment utilisée par les patients cancéreux. [2, 133] Le sélénium est un oligo-élément constitutif de la sélénocystéine, un acide aminé indispensable pour assurer le bon fonctionnement des Glutathion peroxydases (GPx) et des thiorédoxine réductases (TrxR) décrites dans la partie II. Cet acide aminé nécessite pour sa synthèse un apport alimentaire suffisant en sélénium. [55] De cette façon, le sélénium participe à la réponse antioxydante et à la régulation rédox. Certains essais cliniques ont montré qu'une majorité de patients atteints de cancers de la tête et du cou présente une déplétion importante en sélénium plasmatique associée à une diminution de l'activité des GPx. [134] D'autres auteurs rapportent également une déplétion en sélénium chez des patients atteints de cancers gastriques, de cancers du sein et du cancer colorectal. [135] L'apport exogène en sélénium nécessaire pour rétablir un taux plasmatique normal chez ce type de patients ne peut être pourvu par un simple régime alimentaire en raison de multiples facteurs. En effet, lors des chimiothérapies, les nausées et les vomissements fréquemment rencontrés participent aux phénomènes de malnutrition. De plus, les dommages des muqueuses intestinales causés par la chimiothérapie et la radiothérapie créent un déficit au niveau de l'absorption en micronutriments. [135] La supplémentation semble être la seule stratégie disponible afin de rétablir le déficit en sélénium. Notons qu'un tel déficit est préjudiciable pour l'activité de l'ensemble des protéines à sélénocystéine telles que la GPx et la TrxR mais également d'autres protéines parmi les 25 sélénoprotéines du protéome humain. [55] Par exemple, la 2-iodothyronine déiodinase, l'enzyme qui

---

<sup>i</sup> Le score Jadad permet d'évaluer la qualité d'un essai clinique. L'échelle de mesure s'établit de 0 à 5. Un score de 5 correspond à un essai clinique de qualité maximale et sous-entend entre-autres, une randomisation et un double aveugle.

catalyse la conversion de la tétra-iodothyronine (T4) en tri-iodothyronine (T3) est sensible à la déplétion en sélénium. D'ailleurs une étude cas-témoins a montré que les taux plasmatiques de T3 sont significativement plus bas chez les femmes traitées un cancer du sein en post-ménopause par rapport aux témoins sains appariés. <sup>[136]</sup> Lors de plusieurs essais cliniques répertoriés par une méta-analyse Cochrane, visant à déterminer l'intérêt d'une supplémentation en sélénium au cours d'une chimiothérapie mais également lors d'une radiothérapie, l'usage du sélénium n'a pas montré d'augmentation des effets indésirables pour des doses de 200 µg/j à 300 µg/j et même jusqu'à 1 000 µg/j. De plus, aucune modification de l'efficacité de la chimiothérapie ou de la radiothérapie n'a été rapportée. Toutefois, quelques rares cas d'intoxications mortelles au sélénium ont été rapportés lors de surdosage (doses de 200 mg en administration parentérale ou de 10 mg par voie orale). <sup>[133]</sup> La supplémentation en sélénium présente donc un bon profil de tolérance et ne perturbe pas la chimiothérapie. La littérature scientifique ne rapporte qu'une seule étude clinique pertinente au sujet d'une supplémentation en sélénium (200 µg/jour) durant une chimiothérapie. L'étude menée par Sieja K. *et al.*, (randomisée, en double aveugle) a inclus 62 patientes atteintes de cancer de l'ovaire réparties uniformément et en nombre égal dans un groupe supplémenté en sélénium et un groupe témoin. <sup>[137]</sup> Le pronostic de ce cancer est le plus souvent sombre en raison d'un diagnostic généralement tardif. Le traitement repose en premier lieu sur la chirurgie dont l'objectif est la résection complète des lésions cancéreuses. La chimiothérapie est alors indiquée à titre adjuvant, et fait appel en général à plusieurs anticancéreux tels que le cyclophosphamide associé au cisplatine ou au carboplatine. <sup>[138]</sup> De nombreux effets indésirables accompagnent cette intervention thérapeutique. L'essai clinique de Sieja K. *et al.*, a permis d'établir l'impact de la supplémentation en sélénium sur la gravité des effets indésirables de la chimiothérapie. Les deux groupes ont été suivi lors de l'initiation de la chimiothérapie, et durant les trois mois consécutifs. La chimiothérapie était administrée tous les 21 jours (cisplatine : 100 mg/m<sup>2</sup> ; cyclophosphamide : 600 mg/m<sup>2</sup>). Après chaque cycle de chimiothérapie les patients faisaient l'objet d'une évaluation visant à quantifier l'intensité des effets indésirables par cotation sur une échelle de 0 à 4. La valeur 0 permettant de coter l'absence d'effet indésirable, et les valeurs de 1 à 4 correspondant étroitement aux critères d'évaluation des effets indésirables selon l'échelle de l'OMS (tableau 4.1).

Tableau 4.1 | Échelle d'évaluation des effets indésirables (OMS).

Grade 1	signes cliniques mineurs
Grade 2	signes cliniques modérés
Grade 3	signes cliniques sévères (nécessitant généralement une adaptation de dose)
Grade 4	signes cliniques majeurs menaçant le pronostic vital (hospitalisation généralement)

Les résultats de l'évaluation ont montré une réduction significative de nombreux effets indésirables chez les patientes supplémentés. Les résultats les plus probants sont rapportés dans le tableau 4.2 ci-dessous.

Tableau 4.2 | Comparaison des niveaux de gravité des effets indésirables entre le groupe Se et le groupe placebo après trois semaines de chimiothérapie (échelle de 0 à 4).  
(seuls les cas les plus probants avec des différences significatives sont rapportés)

Effet indésirable	Groupe Se (n=31) moyenne ± écart-type	Groupe placebo (n=31) moyenne ± écart-type
Nausées	0,97 ± 0,70	2,03 ± 0,84
Vomissements	0,97 ± 0,87	2,16 ± 1,24
Fatigue	0,97 ± 0,79	2,35 ± 0,99
Perte d'appétit	0,84 ± 0,73	2,26 ± 0,99

Les données établissent clairement l'intérêt d'une supplémentation en sélénium pour ce genre de chimiothérapie en raison de l'amélioration des effets indésirables. Toutefois, la prudence ne permet pas d'extrapoler ces données à l'ensemble des chimiothérapies. La mise en pratique de ces données doit être fondée sur des essais cliniques concluants. Les mécanismes à l'origine de la diminution de la gravité des effets indésirables ne sont pas clairement établis. Toutefois, il a été montré lors de ces traitements, que la chélation du sélénium par les sels de platine entraîne une diminution de leur concentration dans le sérum après chaque cycle de chimiothérapie, et porte atteinte à l'activité des GPx. [137]

Il est tout à fait envisageable de poser l'hypothèse selon laquelle la déplétion en sélénium modifie la réponse antioxydante des cellules normales face au surcroît des ERO engendrées par la chimiothérapie. Le déficit en réponse antioxydante pour les cellules normales pourrait les conduire à un seuil toxique en ERO. Ainsi, la destruction des cellules normales de plus en plus sensibles aux ERO au fur et à mesure de la déplétion consécutive à l'addition des cycles de chimiothérapie, participerait à l'exacerbation des effets secondaires de la chimiothérapie.

La stratégie visant à prévenir les effets secondaires de la génération des ERO sur les cellules saines par l'administration de substances antioxydantes n'est pas totalement saugrenue. Pour rester dans le domaine des anticancéreux et en quittant celui des antioxydants, une comparaison est envisageable avec le méthotrexate. En effet, il est courant d'utiliser de l'acide folique (Speciafoldine®), de l'acide folinique (Lerderfoldine®), ou du lévofolate de calcium (Elvorine®) dans le « sauvetage folinique » visant à prévenir les effets secondaires chez des patients traités par des antagonistes de l'acide folique, tels que le méthotrexate. Ainsi, poison et antidote peuvent faire partie d'une même

stratégie thérapeutique à condition d'en définir les règles pour éviter un antagonisme contreproductif.

#### 4.2. Supplémentation à visée curative

En raison du rôle critique que jouent les ERO dans les différents stades de la cancérogenèse abordés dans la partie III, le traitement de certains cancers par supplémentation en antioxydants est une approche thérapeutique intéressante et envisageable. La stratégie curative emprunte plutôt des mécanismes antioxydants non antiradicalaires et cible soit la production des ERO soit les voies signalétiques activées par les ERO. L'augmentation des taux d'ERO dans les cellules malignes résulte en grande partie : (i) de l'accentuation des signaux de prolifération responsables de l'activation des NADPH oxydases (NOX) (ii) et de la dysfonction mitochondriale consécutive aux perturbations métaboliques et/ou à l'hypoxie. Ces deux sources principales constituent donc des cibles thérapeutiques très intéressantes qui permettent de prendre le problème des ERO en amont, avant même qu'elles n'aient le temps de causer des dommages oxydatifs. L'accroissement modéré des ERO contribuant à la mise en place des nombreuses caractéristiques des cellules cancéreuses est ainsi enrayé. À côté de ces deux cibles potentielles, la plupart des voies signalétiques promues par les ERO constituent une multitude d'autres cibles anti-cancéreuses très intéressantes. Nous allons développer quelques exemples permettant d'appréhender l'intérêt croissant des antioxydants non antiradicalaires envers ces cibles thérapeutiques.

##### 4.2.1. Ciblage des NOX

Des études récentes permettent en effet d'envisager l'action des antioxydants non antiradicalaires sous un angle novateur. Les inhibiteurs de NOX ont ainsi récemment été proposés pour lutter contre le stress oxydant impliqué dans la genèse de pathologies cardiovasculaires. L'approche thérapeutique ciblée de l'inhibition des systèmes enzymatiques à l'origine de la production des ERO semble bien supérieure pour combattre le stress oxydant que l'action non spécifique de certains antioxydants. En 2010, la 2-acétylphénothiazine a été isolée par des techniques de criblage à haut débit et décrite comme inhibiteur sélectif des NOX1. Or, les NOX1, impliquées dans des interactions entre les cellules cancéreuses et la matrice extracellulaire, constituent une cible pharmacologique de choix à l'encontre du processus métastatique.

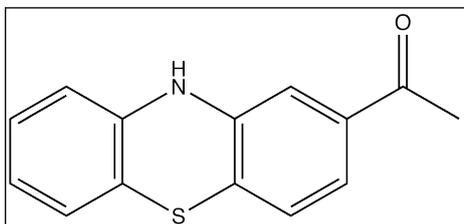


Figure 4.2 | 2-acétylphénothiazine ou ML171 : inhibiteur sélectif des NOX1 aux concentrations nanomolaires. <sup>[139]</sup>

L'arrivée de tels antioxydants spécifiques dans l'arsenal thérapeutique actuellement disponible contre le cancer pourrait bien constituer un atout non négligeable. Ces molécules pourraient venir alimenter les protocoles de polychimiothérapie et donc présenter un intérêt en association avec des agents plus conventionnels. Le ciblage des mécanismes métastatiques constitue une innovation en raison du vide thérapeutique dans ce domaine et de la forte implication du stade métastatique dans la mortalité des patients cancéreux. [139, 140]

#### 4.2.2. *Thé vert et inhibition des voies signalétiques*

Le thé vert, *Camelia sinensis*, est une des boissons les plus consommées au monde et fait régulièrement l'objet d'une attention particulière en vertu des bénéfices pour la santé qui lui sont attribués. Cette boisson comporte plusieurs polyphénols, plus précisément des flavonols couramment appelés catéchines du thé. Les différentes catéchines sont l'(-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG : 50%), l'(-)-épicatechine-3-gallate (ECG : 15%), l'(-)-épigallocatechine (EGC : 15%) et l'(-)-épicatéchine (EC : 8%). [141, 142] Si aucune étude clinique pertinente n'est disponible en ce qui concerne le bénéfice d'une supplémentation en catéchines du thé pendant une chimiothérapie, de nombreux éléments laissent à penser que ces molécules présentent un fort potentiel.

##### ♦ *Des études in vitro prometteuses*

Comme nous l'avons vu dans la partie II, les concentrations plasmatiques sub-micromolaires ou nanomolaires en catéchines résultant de l'absorption de thé chez l'homme ne semblent pas exercer leur action antioxydante principale par des mécanismes antiradicalaires. Des cibles biologiques plus spécifiques s'avèrent être impliquées dans leur rôle antioxydant. *In vitro* les propriétés antitumorales des catéchines et notamment celles de l'EGCG, sont d'ailleurs indiscutablement établies. Ces catéchines peuvent inhiber la prolifération cellulaire, induire l'apoptose de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, inhiber l'angiogénèse et permettre à nouveau l'expression de gènes passés sous silence lors du développement tumoral. [143] Les études *in vitro* ont permis d'identifier l'EGCG comme étant un inhibiteur de l'accumulation du facteur de transcription HIF1 en conditions d'hypoxie, grâce à son action de répression sur la voie PI3K/AKT décrite dans la partie III (figure 3.9). [142] D'autres auteurs ont montré que l'EGCG pouvait inhiber l'epidermal growth factor receptor (EGFR), un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) dont l'activation est indispensable pour la prolifération des cellules cancéreuses du col de l'utérus. Cette action sur l'EGFR engendre une inhibition consécutive de la voie des ERK ainsi qu'une inhibition de la voie de l'AKT. La réduction de la phosphorylation des effecteurs de ces voies de signalisation modifie profondément la signalisation cellulaire. Ces changements sont associés à un accroissement du taux de la protéine p53 et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Le maintien de l'inhibition des voies de l'ERK et de l'AKT

par l'EGCG entraîne à terme l'apoptose. Il est également intéressant de noter la sélectivité d'action de l'EGCG sur les protéines kinases. En effet, les MAPK telles que la protéine JNK et la protéine p38 ne sont pas inhibées par l'EGCG, or elles sont capables de conduire les phénomènes d'apoptose et de différenciation cellulaire préjudiciables aux cellules tumorales. <sup>[144]</sup> En regard de ces propriétés extrêmement prometteuses et en raison du faible coût de production des extraits de catéchines du thé vert, les produits nutraceutiques fleurissent et mettent tous en exergue les données obtenues *in vitro* comme des vertus bien établies chez l'homme. Une étude soutenue par le National Cancer Institute s'est intéressée à l'action de l'un de ces produits nutraceutiques sur des lignées cancéreuses. Il s'agit du polyphénol E<sup>®</sup>, composé des extraits des 4 catéchines principales du thé vert. Ce produit a clairement montré des propriétés d'inhibition de l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance EGFR et HER2 (epidermal growth factor receptor 2) fortement impliqués dans le développement tumoral des cellules cancéreuses du colon. L'inhibition par les catéchines du thé vert des effecteurs de signalisation cellulaire, tels que les ERK et l'AKT, a été confirmé par cette étude. Les facteurs de transcription AP-1, NF-κB sont également inhibés par l'action des catéchines. Les auteurs de cette étude concluent à l'intérêt éventuel d'une supplémentation en polyphénol E<sup>®</sup> associé à divers agents anticancéreux afin de potentialiser l'action de la chimiothérapie. <sup>[145]</sup> En plus de son action spécifique sur certaines protéines de signalisation cellulaire, l'EGCG a montré une action favorable sur les mécanismes épigénétiques responsables de la non expression de certains gènes répresseurs de tumeurs à la suite de l'hyperméthylation de leurs séquences promotrices. En effet, l'EGCG peut inhiber la 5-cytosine ADN méthyltransférase, une enzyme permettant la transmission des caractères épigénétiques d'une cellule mère à une cellule fille par report sur les séquences d'ADN néoformées des séquences hyperméthylées. Cette propriété très intéressante permet donc la réactivation des gènes réprimés lors du développement tumoral. <sup>[146]</sup> Ces éléments n'ont toutefois pas encore trouvé à l'heure actuelle d'applications thérapeutiques concrètes. Les concentrations en catéchines utilisées pour les études *in vitro* sont en général très supérieures aux concentrations plasmatiques maximales en EGCG retrouvées chez l'homme et varient d'un facteur 10 à 100 en fonction des protocoles. Les catéchines du thé vert constituent une référence moléculaire au fort potentiel et permettent d'orienter la recherche vers de nouvelles cibles thérapeutiques.

#### ♦ *Thé vert et interactions avec les chimiothérapies*

La publication des résultats prometteurs concernant l'activité antitumorale des catéchines du thé vert pousse de nombreux patients à s'auto-supplémenter dans l'espoir d'augmenter leurs chances de rémission. <sup>[147]</sup> Toutefois, même si les essais *in vitro* paraissent prometteurs, mieux vaut se fier à des essais cliniques bien menés. Les exemples suivants vont venir argumenter ce point fondamental.

***Thé vert et 5-FU.*** D'éventuelles interactions pharmacocinétiques n'ont pas été écartées lors d'une supplémentation en thé vert associée à une chimiothérapie. Une étude *in vivo* très récente sur des modèles murins, met en garde les cliniciens quant à l'utilisation du 5-FU chez des patients consommant plusieurs tasses de thé vert par jour. Les études pharmacocinétiques ont révélé une interaction médicamenteuse conduisant à une augmentation de 151% de la concentration plasmatique maximale en 5-FU et une augmentation de 425% de l'AUC (Aire sous la courbe) de la concentration plasmatique en 5-FU. Les études pharmacodynamiques n'ont, quant à elles, pas conclu à un effet cytotoxique additif lors de l'administration concomitante de 5-FU et d'EGCG pour des doses modérées (inférieures à 6 tasses de thé par jour). Ces données montrent qu'il est indispensable d'éviter la consommation de thé vert chez les patients traités par 5-FU ou du moins de réaliser des dosages plasmatiques en 5-FU chez ces patients. En effet, les modifications d'ordre pharmacodynamiques sont susceptibles d'accroître la toxicité médullaire du 5-FU. [141]

***Thé vert et bortezomib.*** Le bortezomib (Velcade®) est un inhibiteur du protéasome indiqué en monothérapie dans le traitement du myélome multiple. En désactivant le protéasome, le bortezomib (BZM) déclenche l'apoptose à la suite d'un stress cellulaire provoqué par l'accumulation dans le cytoplasme de protéines défectueuses. Des études récentes réalisées sur des cultures cellulaires cancéreuses de myélome multiple ont montré contre toute attente que l'EGCG était en mesure d'abolir complètement la mort cellulaire consécutive au traitement par le BZM. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des modèles murins. L'EGCG réagit directement avec le BZM et empêche son action d'inhibition du protéasome. Ces données devraient conduire à contre-indiquer l'utilisation du thé vert pendant une telle chimiothérapie car un antagonisme total peut être obtenu pour des concentrations avoisinant 1µM d'extrait total du thé vert. Or, ces concentrations peuvent être atteintes chez l'homme, après ingestion de gélules contenant des extraits de catéchines du thé vert (polyphénon E®). Les auteurs de cette étude insistent sur l'importance et la pertinence de leur découverte quant à la vigilance clinique qu'elle doit entraîner. [147]

Ces deux cas d'interactions ne sont pas forcements négatifs, ils montrent d'une certaine manière la puissance pharmacologique des catéchines du thé vert même pour de faibles concentrations plasmatiques. De plus l'interaction avec le 5-FU pourrait faire l'objet d'une étude approfondie afin de réaliser une association synergique. Toutefois ces exemples mettent cliniciens et patients en garde contre le recours à une supplémentation non encadrée par des données cliniques préliminaires. L'utilisation hasardeuse ou spéculative de suppléments peut conduire à un échec thérapeutique susceptible d'engager le pronostic vital des patients.

### 4.2.3. Les polyphénols : une grande famille au fort potentiel

Nous avons déjà évoqué l'intérêt des différents mécanismes anticancéreux que peuvent emprunter les polyphénols du thé vert. Toutefois, l'étendue de la famille des polyphénols laisse à penser que de nombreuses propriétés antitumorales restent encore à découvrir parmi leurs représentants. Plusieurs polyphénols ont déjà montré leur action sur l'inhibition de voies signalétiques favorisées par les ERO. La curcumine (figure 4.3) et le resvératrol sont des antioxydants polyphénoliques alimentaires qui ont été décrits comme des inhibiteurs de la voie du NF- $\kappa$ B. Le rôle critique que joue l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B dans la tumorigenèse et dans la résistance aux traitements actuels du cancer, procure un intérêt certain aux éventuels inhibiteurs de cette voie de signalisation. Le resvératrol et la curcumine sont également qualifiés d'antioxydants anti-inflammatoires car ils inhibent le NF- $\kappa$ B en raison de leur action régulatrice sur les cytokines telles que le TNF $\alpha$  ou l'IL-6. Ces cytokines exercent un effet pro-tumorigène par l'intermédiaire des ERO qu'elles utilisent comme seconds messagers (figure 3.4). [75, 95]

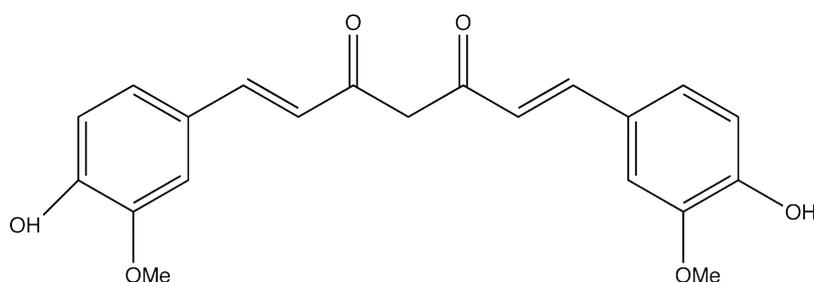


Figure 4.3 | Curcumine [(1E, 6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione]. [75]

Plusieurs flavonoïdes issus du domaine végétal tels que la lutéoline, la génistéine et la quercétine ont prouvé leur effet suppresseur de la croissance tumorale par des mécanismes les impliquant dans l'inhibition des voies signalétiques empruntés par l'AKT, les MAPK et par leur action de régulation négative envers le VEGF. Le resvératrol, un polyphénol de la famille des stilbénoloïdes, et la génistéine possèdent également un rôle d'inhibition de l'invasion métastatique par leur implication dans la répression des matrix métalloprotéinases indispensables pour assurer la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). [148]

Les nombreuses données issues de la recherche fondamentale montrent que la stratégie visant à contrebalancer les effets des ERO/ERN par une action sur les voies de signalisation cellulaire semble promise à un bel essor. L'action de ces composés d'origine végétale permet, entre autres, d'espérer un développement futur de molécules ayant une action ciblée sur les différents stades du développement tumoral qui n'ont, à l'heure actuelle, que peu de solutions thérapeutiques (i.e., TEM).

# CONCLUSION

---

Les ERO et les ERN sont omniprésentes dans l'établissement des principales caractéristiques du cancer. La connaissance des mécanismes empruntés par ces espèces pro-oxydantes dans la biologie tumorale constitue une base de travail permettant d'envisager différentes approches thérapeutiques novatrices faisant appel aux antioxydants. En effet, de nombreux composés antioxydants issus du monde végétal comme les polyphénols, sont pourvus de propriétés anticancéreuses élaborées permettant d'entraver les effets néfastes des ERO. Certaines de ces molécules pourraient même agir en synergie avec les anticancéreux conventionnels. Il faut donc espérer que les données foisonnantes de la recherche fondamentale concernant le stress oxydant, la biologie tumorale et les antioxydants convergent dans un futur proche. La juxtaposition de ces éléments permettra d'alimenter la recherche translationnelle à même d'assoir l'intérêt thérapeutique des antioxydants. À l'heure actuelle, l'absence d'études cliniques permettant d'établir l'innocuité de ces molécules antioxydantes au cours d'une chimiothérapie, devrait conduire le patient et le clinicien à la plus grande vigilance.

La supplémentation en antioxydants pratiquée chez les patients recevant une chimiothérapie, vise le plus souvent à contrecarrer les effets néfastes des dommages oxydatifs engendrés par cette dernière. Certaines études montrent que cette stratégie peut s'avérer concluante et permet, dans certains cas, de réduire les nombreux effets secondaires des chimiothérapies (e.g., sélénium, glutathion). Toutefois, cette supplémentation semble mal encadrée par les praticiens qui ne sont généralement pas informés de cette pratique par leur patients. Or, il peut arriver qu'une telle supplémentation porte préjudice à l'efficacité de la chimiothérapie et modifie les taux de réponse aux traitements anticancéreux. En raison de ces possibilités d'interactions non négligeables, la supplémentation en antioxydants doit reposer sur des bases solides de connaissances issues d'essais cliniques randomisés en double aveugle et ayant montré un rapport bénéfice/risque favorable. De telles données sont relativement rares et quand elles sont disponibles, elles ne permettent pas une généralisation à l'ensemble des patients. Face à la forte consommation en antioxydants des patients sous chimiothérapie, des études supplémentaires seront les bienvenues. En raison du phénomène d'auto-supplémentation en antioxydants, les patients sous chimiothérapie peuvent être amenés à se procurer des suppléments auprès de leur pharmacien d'officine. Une attitude de mise en garde face à une telle demande devrait être adoptée. Par ailleurs, une vigilance particulière pourrait être établie envers les patients sous chimiothérapie orale à domicile.

Il est intéressant de constater que l'étude des ERO et des ERN ne s'arrête pas à la seule pathologie tumorale. En effet, diverses maladies telles que le psoriasis, <sup>[149]</sup> les maladies rhumatismales, <sup>[20]</sup>

certaines maladies neurologiques comme la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'alzheimer et la maladie de parkinson, [70, 75, 97] semblent impliquer les ERO et ERN dans leur physiopathologie. Les thérapies antioxydantes apparaissent toutes indiquées dans ce type de pathologies. D'ailleurs la prise en charge des patients à risque de DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge) fait actuellement l'objet d'une supplémentation en antioxydants visant à inhiber les processus de néovascularisation similaires à l'angiogenèse tumorale.

# Liste des figures

---

Figure 1.1   Formation de radical superoxyde par l'action de la xanthine oxydase sur la xanthine.	p. 18
Figure 1.2   Dommages oxydatifs de l'ADN : exemple de différentes cibles pour le radical hydroxyle sur la désoxy-thymidine.	p. 19
Figure 1.3   Formation du 8-oxo-dG après oxydation de la désoxyguanosine par le radical hydroxyle.	p. 20
Figure 1.4   Clivage des chaînes peptidiques par carbonylation.	p. 21
Figure 1.5   Mode réactionnel de la peroxydation lipidique.	p. 23
Figure 1.6   Production de monoxyde d'azote par les NO-synthases à partir de L-arginine.	p. 25
Figure 1.7   Réactivité des espèces de l'oxygène et de l'azote.	p. 28
Figure 2.1   Structure moléculaire du glutathion sous forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG).	p. 38
Figure 2.2   Mode de régénération entre alpha-tocophérol et acide ascorbique.	p. 42
Figure 3.1   Déséquilibre de l'homéostasie rédox des cellules cancéreuses.	p. 47
Figure 3.2   Modifications post-traductionnelles des thiols protéiques sensibles sous l'action des ERO.	p. 49
Figure 3.3   Caractéristiques du cancer décrites par Hanahan et Weinberg en 2011.	p. 52
Figure 3.4   Rôle des ERO dans la promotion tumorale par l'inflammation.	p. 56
Figure 3.5   Potentialisation de la voie des ERK par les ERO.	p. 59
Figure 3.6   Participation des ERO aux modifications du métabolisme glucidique de la cellule tumorale.	p. 62
Figure 3.7   Réponse du facteur de transcription p53 au stress oxydatif et rôle du DJ1 dans le maintien d'une réponse antioxydante.	p. 66
Figure 3.8   Relation entre niveau d'ERO et développement tumoral.	p. 68
Figure 3.9   Inhibition du facteur de transcription FoxO par la voie PI3K/ATK.	p. 71
Figure 3.10   Participation des ERO dans la mise en place des caractéristiques du cancer.	p. 76
Figure 4.1   Sélectivité de l'action délétère des ERO exogènes sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales.	p. 80
Figure 4.2   2-acétylphénothiazine ou ML171 : inhibiteur sélectif des NOX1 aux concentrations nanomolaires.	p. 88
Figure 4.3   Curcumine [(1E, 6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione]	p. 92

# Liste des réactions

---

Réaction 1.1   Réaction de dismutation du radical superoxyde catalysée par la SOD.	p. 15
Réaction 1.2   Réaction biradicalaire formant du peroxydinitrite.	p. 16
Réaction 1.3   Le dioxygène : accepteur d'électrons lors de la respiration cellulaire.	p. 16
Réaction 1.4   Synthèse du radical superoxyde dans la mitochondrie.	p. 17
Réaction 1.5   Synthèse du radical superoxyde par les NOX.	p. 17
Réaction 1.6   Réaction de Fenton.	p. 23
Réaction 1.7   Synthèse des radicaux peroxydes.	p. 24
Réaction 1.8   Synthèse des hydroperoxydes.	p. 24
Réaction 1.9   Synthèse des radicaux alkoxydes.	p. 25
Réaction 1.10   Synthèse du peroxydinitrite.	p. 26
Réaction 2.1   Réaction catalysée par les glutathion peroxydases.	p. 34
Réaction 2.2   Décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase.	p. 36

# Liste des tableaux

---

Tableau 1.1   Rôle des NOX dans la signalisation cellulaire des fibroblastes.	p. 17
Tableau 4.1   Échelle d'évaluation des effets indésirables (OMS).	p. 86
Tableau 4.2   Comparaison des niveaux gravité des effets indésirables entre le groupe Se et le groupe placebo après trois semaines de chimiothérapie (échelle de 0 à 4).	p. 87

# BIBLIOGRAPHIE

---

- [1] Gabriella M. D'andrea M. Use of Antioxidants During Chemotherapy and Radiotherapy Should Be Avoided. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2005, vol. 55, n° 5, p. 319-321.
- [2] Thomas-Schoemann A, Alexandre J, Mongaret C, [et al.]. Use of antioxidant and other complementary medicine by patients treated by antitumor chemotherapy : a prospective study. *Bulletin du Cancer*, 2011, vol. 98, n° 6, p. 645-653.
- [3] Pérol D, Toutenu P, Lefranc A, [et al.]. L'éducation thérapeutique en cancérologie : vers une reconnaissance des compétences du patient. *Bulletin du Cancer*, 2007, vol. 94, n° 3, p. 267-274.
- [4] Eisenberg D, Davis R, Ettner S, [et al.]. Trends in Alternative Medicine Use in the United States, 1990-1997. *JAMA*, 1998, vol. 280, n° 18, p. 1569-1575.
- [5] Vandecreek L, Rogers E, Lester J. Use of alternative therapies among breast cancer outpatients compared with the general population. *Altern Ther Health Med*, 1999, vol. 5, n° 1, p. 71-76.
- [6] Block K, Koch A, Mead M, [et al.]. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity : A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 2008, vol. 123, n° 6, p. 1227-1239.
- [7] Ladas E J, Jacobson J S, D. Kennedy D, [et al.]. Antioxidants and Cancer Therapy : A Systematic Review. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, vol. 22, n° 3, p. 517-528.
- [8] Cameron E, Pauling L. The orthomolecular treatment of cancer I. The role of ascorbic acid in host resistance. *Chemico-Biological Interactions*, 1974, vol. 9, n° 4, p. 273-283.
- [9] Khayat D. *Le Vrai Régime anticancer*. Paris : Odile Jacob, 2010. 321 p.
- [10] Servan-Schreiber D. *Anticancer*. Paris : Robert Laffont, 2007. 409 p. (Collection "Réponses").
- [11] Thomas F, Holly J M P, Persad R, [et al.]. Green Tea Extract (Epigallocatechin-3-Gallate) Reduces Efficacy of Radiotherapy on Prostate Cancer Cells. *Urology*, 2011. [Epub ahead of print]
- [12] Goudable J, Favier A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique & Métabolisme*, 1997, vol. 11, n° 2, p. 115-120.

- [13] Edeas M, Attaf D, Mailfert a S, [et al.]. Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*, 2010, vol. 58, n° 3, p. 220-225.
- [14] Haddad J J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling*, 2002, vol. 14, n° 11, p. 879-897.
- [15] Halliwell B. Mechanisms innvolved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*, 1996, vol. 44, n° 1, p. 6-13.
- [16] Migdal M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine science*, 2011, vol. 27, n° 4, p. 405-412.
- [17] Baeuerle P A, Rupec R A, Pahl H L. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathologie Biologie*, 1996, vol. 44, n° 1, p. 29-35.
- [18] Casteilla L, Duval C, Fernandez Y, [et al.]. Quel avenir pour la mitochondrie ? *Hépatho-Gastro*, 2003, vol. 10, n° 1, p. 65-74.
- [19] Alho H, Leinonen J, Lester P. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *In Methods in Enzymology*. Academic Press, 1999, p. 3-15.
- [20] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, [et al.]. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 2007, vol. 74, n° 7, p. 636-643.
- [21] Szatrowski T, Nathan C. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Research*, 1991, vol. 51, n° 3, p. 794-798.
- [22] Mccord J M, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein. *J. Biol. Chem*, 1969, vol. 244, n° 22, p. 6049-6055.
- [23] Gardès-Albert M. Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2006, vol. 64, n° 6, p. 365-372.
- [24] Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, [et al.]. Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante. *Nutrition Clinique & Métabolisme*, 2002, vol. 16, n° 4, p. 233-239.
- [25] Houée-Levin C, Sicard-Roselli C, Bergès J. *Chimie et biochimie radicalaires*. Paris : Belin, 2005. 160 p. (Collection échelles).
- [26] Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2009, vol. 1790, n° 11, p. 1555-1568.

- [27] Beaudoux J-L, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, [et al.]. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote - Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2006, vol. 64, n° 6, p. 373-381.
- [28] Valko M, Rhodes C J, Moncol J, [et al.]. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, vol. 160, n° 1, p. 1-40.
- [29] Therond P. Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, DNA) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2006, vol. 64, n° 6, p. 383-389.
- [30] Levine R L, Moskowitz J, Stadtman E R. Oxidation of Methionine in Proteins : Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life*, 2000, vol. 50, n° 4-5, p. 301-307.
- [31] Bucher J R, Tien M, Aust S D. The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983, vol. 111, n° 3, p. 777-784.
- [32] Gutteridge J M C. Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 1984, vol. 172, n° 2, p. 245-249.
- [33] Steghens J-P, Combarous F, Arkouche W, [et al.]. Influence de l'hémodialyse sur les concentrations de malonedialdéhyde total et libre, mesurées par une nouvelle technique HPLC spécifique. *Néphrologie & Thérapeutique*, 2005, vol. 1, n° 2, p. 121-125.
- [34] Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer : role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's archives of surgery*, 2006, vol. 391, n° 5, p. 499-510.
- [35] Nair U, Bartsch H, Nair J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, vol. 43, n° 8, p. 1109-1120.
- [36] Young I S, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 2001, vol. 54, n° p. 176-186.
- [37] Hirst D, Robson T. Nitric oxide in cancer therapeutics : interaction with cytotoxic chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, vol. 16, n° 4, p. 411-420.
- [38] Hirst D, Robson T. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis : implications for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, vol. 16, n° 1, p. 45-55.

- [39] Ahmad R, Rasheed Z, Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite : implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2009, vol. 31, n° 3, p. 388-396.
- [40] Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2006, vol. 64, n° 6, p. 390-396.
- [41] Weijl N I, Cleton F J, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews*, 1997, vol. 23, n° 4, p. 209-240.
- [42] Mikkelsen R B, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 2003, vol. 22, n° 37, p. 5734-5754.
- [43] Nathan C, Ding A. SnapShot : Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell*, 2010, vol. 140, n° 6, p. 952-954.
- [44] Dugo L, Negis Y, Azzi A (February 2011). Antioxidants. In: Encyclopedia of Life Science (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- [45] Miao L, St. Clair D K. Regulation of superoxide dismutase genes : Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, vol. 47, n° 4, p. 344-356.
- [46] Holley a K, Dhar S K, St. Clair D K. Manganese superoxide dismutase vs. p53: Regulation of mitochondrial ROS. *Mitochondrion*, 2010, vol. 10, n° 6, p. 649-661.
- [47] Gurney M, Cutting F, Zhai P, [et al.]. Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathologie Biologie*, 1996, vol. 44, n° 1, p. 51-56.
- [48] Puscas I, Baican M, Coltău M, [et al.]. Erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with digest cancer : adjuvant diagnosis test. *Cancer Letters*, 1999, vol. 143, n° 1, p. 95-98.
- [49] Oberley L. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD over-expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2005, vol. 59, n° 4, p. 143-148.
- [50] Zhang Y, Zhao W, Zhang H J, [et al.]. Overexpression of Copper Zinc Superoxide Dismutase Suppresses Human Glioma Cell Growth. *Cancer Research*, 2002, vol. 62, n° 4, p. 1191-1204.
- [51] Millikin D, Meese E, Vogelstein B, [et al.]. Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 1991, vol. 51, n° 20, p. 5449-53.

- [52] Kinnula V L, Crapo J D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 36, n° 6, p. 718-744.
- [53] Ambrosone C B, Freudenheim J L, Thompson P A, [et al.]. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, n° 3, p. 602-606.
- [54] Davis C A, Hearn a S, Fletcher B, [et al.]. Potent anti-tumor effects of an active site mutant of human manganese-superoxide dismutase. Evolutionary conservation of product inhibition. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, n° 13, p. 12769-76.
- [55] Kryukov G V, Castellano S, Novoselov S V, [et al.]. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. *Science*, 2003, vol. 300, n° 5624, p. 1439-1443.
- [56] Chu F-F, Esworthy R S, Doroshow J H. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 36, n° 12, p. 1481-1495.
- [57] Darby Weydert C J, Smith B B, Xu L, [et al.]. Inhibition of oral cancer cell growth by adenovirus MnSOD plus BCNU treatment. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, vol. 34, n° 3, p. 316-329.
- [58] Liu J, Hinkhouse M M, Sun W, [et al.]. Redox regulation of pancreatic cancer cell growth : role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Hum Gene Ther*, 2004, vol. 15, n° 3, p. 239-50.
- [59] Koliopanos A, Avgerinos C, Paraskeva C, [et al.]. Molecular aspects of carcinogenesis in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, vol. 7, n° 4, p. 345-56.
- [60] Alexandrova a Y, Kopnin P B, Vasiliev J M, [et al.]. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp Cell Res*, 2006, vol. 312, n° 11, p. 2066-73.
- [61] Goyal M M, Basak A. Human catalase : looking for complete identity. *Protein & Cell*, 2010, vol. 1, n° 10, p. 888-897.
- [62] Nordberg J, Arner E S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, vol. 31, n° 11, p. 1287-312.
- [63] Fridovich I (March 2009). Oxidative Stress. In: Encyclopedia of Life Science (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

- [64] Gorman A, McGowan A, Cotter T G. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett*, 1997, vol. 404, n° 1, p. 27-33.
- [65] Sancho P, Troyano A, Fernandez C, [et al.]. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol Pharmacol*, 2003, vol. 63, n° 3, p. 581-9.
- [66] Wirth D, Christians E S, Drion P V, [et al.]. The heat shock proteins (Hsps). II. Hsp70: biomarker and actor of cellular stress. *Ann Med Vet*, 2003, vol. 147, n° 2, p. 127-144.
- [67] Cressey D. Proteins chaperone drugs into development [en ligne]. London : Nature Publishing Group, 2011. Disponible sur < [www.nature.com](http://www.nature.com) > (consulté le 3 aout 2011).
- [68] Ma W W, Adjei a A. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 2009, vol. 59, n° 2, p. 111-37.
- [69] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, vol. 48, n° 6, p. 749-62.
- [70] Wallace D C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 2005, vol. 39, n° p. 359-407.
- [71] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011, vol. 283, n° 2-3, p. 65-87.
- [72] Steegmann-Olmedillas J L. The role of iron in tumour cell proliferation. *Clin Transl Oncol*, vol. 13, n° 2, p. 71-6.
- [73] Mandl J, Szarka A, Banhegyi G. Vitamin C : update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 2009, vol. 157, n° 7, p. 1097-110.
- [74] Di Meo F, TROUILLAS P (dir.). *Les polyphénols naturels et la chimie théorique ou comment prédire et comprendre par le calcul le comportement des antioxydants présents dans notre assiette*. 124 p. Thèse de doctorat : Pharmacie. Université de Limoges : Faculté de Pharmacie, 2009.
- [75] Obrenovich M E, Li Y, Parvathaneni K, [et al.]. Antioxidants in health, disease and aging. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, vol. 10, n° 2, p. 192-207.
- [76] Lotito S B, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 36, n° 2, p. 201-211.

- [77] Chow H H S, Hakim I A. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacological Research*, 2011, vol. 64, n° 2, p. 105-112.
- [78] Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis : cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010, vol. 29, n° 2, p. 351-378.
- [79] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 2009, vol. 8, n° 7, p. 579-91.
- [80] Wolyniec K H, Sue; Haupt, Ygal (December 2009). P53 and Cell Death. In: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- [81] Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS. To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy*, 2008, vol. 7, n° 12, p. 1875-1884.
- [82] Ozben T. Oxidative Stress an Apoptosis : Impact on Cancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, vol. 96, n° 9, p. 2181-2196.
- [83] Hwang P M, Bunz F, Yu J, [et al.]. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med*, 2001, vol. 7, n° 10, p. 1111-7.
- [84] Liu G, Chen X. The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 2002, vol. 21, n° 47, p. 7195-204.
- [85] Cairns R A, Harris I S, Mak T W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, vol. 11, n° 2, p. 85-95.
- [86] Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*, 2011, vol. 194, n° 1, p. 7-15.
- [87] Tew K D, Manevich Y, Grek C, [et al.]. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, vol. 51, n° 2, p. 299-313.
- [88] Brown K K, Hampton M B. Biological targets of isothiocyanates. *Biochim Biophys Acta*, 2011, vol. 1810, n° 9, p. 888-94.
- [89] Alonso A, Sasin J, Bottini N, [et al.]. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 2004, vol. 117, n° 6, p. 699-711.
- [90] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, vol. 100, n° 1, p. 57-70.

- [91] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, n° 5, p. 646-74.
- [92] Galaris D, Skiada V, Barbouti A. Redox signaling and cancer: the role of "labile" iron. *Cancer Lett*, 2008, vol. 266, n° 1, p. 21-9.
- [93] Schumacker P T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 2006, vol. 10, n° 3, p. 175-6.
- [94] Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010, vol. 140, n° 6, p. 883-99.
- [95] Aggarwal B B, Vijayalekshmi R V, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*, 2009, vol. 15, n° 2, p. 425-30.
- [96] Pennington J D, Wang T J C, Nguyen P, [et al.]. Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 2005, vol. 8, n° 5, p. 322-330.
- [97] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2010, vol. 1802, n° 4, p. 396-405.
- [98] Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, vol. 2, n° 3, p. 344-58.
- [99] Chan D W, Liu V W, Tsao G S, [et al.]. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008, vol. 29, n° 9, p. 1742-50.
- [100] Warburg O W F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*, 1927, vol. 8, n° 6, p. 519-530.
- [101] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling : navigating downstream. *Cell*, 2007, vol. 129, n° 7, p. 1261-74.
- [102] Fruehauf J P, Meyskens F L, Jr. Reactive oxygen species : a breath of life or death ? *Clin Cancer Res*, 2007, vol. 13, n° 3, p. 789-94.
- [103] Clerkin J S, Naughton R, Quiney C, [et al.]. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2008, vol. 266, n° 1, p. 30-6.
- [104] Salmena L, Carracedo A, Pandolfi P P. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell*, 2008, vol. 133, n° 3, p. 403-14.

- [105] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007, vol. 129, n° 7, p. 1261-74.
- [106] Jiang B H, Semenza G L, Bauer C, [et al.]. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol*, 1996, vol. 271, n° 4 Pt 1, p. C1172-80.
- [107] Finley L W, Carracedo A, Lee J, [et al.]. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*, 2010, vol. 19, n° 3, p. 416-28.
- [108] Perera R M, Bardeesy N. Cancer: when antioxidants are bad. *Nature*, 2011, vol. 475, n° 7354, p. 43-4.
- [109] Denicola G M, Karreth F A, Humpton T J, [et al.]. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 2011, vol. 475, n° 7354, p. 106-9.
- [110] Schafer F Q, Buettner G R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, vol. 30, n° 11, p. 1191-1212.
- [111] Accili D, Arden K C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 2004, vol. 117, n° 4, p. 421-6.
- [112] Reagan-Shaw S, Ahmad N. The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, vol. 224, n° 3, p. 360-8.
- [113] Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis : NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 2008, vol. 266, n° 1, p. 37-52.
- [114] Wu W S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, vol. 25, n° 4, p. 695-705.
- [115] Lacave R, Larsen C-J, Robert J. *Cancérologie fondamentale*. Paris : John Libbey Eurotext, 2005. 437 p.
- [116] Wu W S, Wu J R, Hu C T. Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, vol. 27, n° 2, p. 303-14.

- [117] Velicer C M, Ulric C M. Vitamin and Mineral Supplement Use Among US Adults After Cancer Diagnosis : A Systematic Review. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, n° 4, p. 665-673.
- [118] Brian L, Kara K, Elena L, [et al.]. Should Supplemental Antioxidant Administration Be Avoided During Chemotherapy and Radiation Therapy ? *J Natl Cancer Inst*, 2008, vol. 100, n° 11, p. 773-783.
- [119] Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 2004, vol. 7, n° 2, p. 97-110.
- [120] Trachootham D, Zhang H, Zhang W, [et al.]. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood*, 2008, vol. 112, n° 5, p. 1912-22.
- [121] Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti R G, [et al.]. Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, vol. 28, n° 6, p. 689-703.
- [122] Goodman M, Bostick R M, Kucuk O, [et al.]. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents : Past, present, and future. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. [Epub ahead of print]
- [123] Jones D. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, vol. 295, n° 4, p. 849-868.
- [124] Omenn G S, Goodman G E, Thornquist M D, [et al.]. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1996, vol. 334, n° 18, p. 1150-5.
- [125] Bairati I, Meyer F, Gelinas M, [et al.]. Randomized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients. *J Clin Oncol*, 2005, vol. 23, n° 24, p. 5805-13.
- [126] Seifried H E, McDonald S S, Anderson D E, [et al.]. The Antioxidant Conundrum in Cancer. *Cancer Research*, 2003, vol. 63, n° 15, p. 4295-4298.
- [127] Burstein H, Gelber S, Guadagnoli E, [et al.]. Use of Alternative Medicine by Women with Early-Stage Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 1999, vol. 340, n° 22, p. 1733-1739.

- [128] Helpman L, Ferguson S E, Mackean M, [et al.]. Complementary and alternative medicine use among women receiving chemotherapy for ovarian cancer in 2 patient populations. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, vol. 21, n° 3, p. 587-93.
- [129] Block K I, Koch a C, Mead M N, [et al.]. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev*, 2007, vol. 33, n° 5, p. 407-18.
- [130] Block K, Koch A, Mead M, [et al.]. Re: Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer Inst*, 2009, vol. 101, n° 2, p. 124-5.
- [131] Smyth J F, Bowman A, Perren T, [et al.]. Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: results of a double-blind, randomised trial. *Ann Oncol*, 1997, vol. 8, n° 6, p. 569-73.
- [132] Albers J W, Chaudhry V, Cavaletti G, [et al.]. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011.
- [133] Dennert G, Horneber M. Selenium for alleviating the side effects of chemotherapy, radiotherapy and surgery in cancer patient. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006.
- [134] Buntzel J, Glatzel M, Micke O, [et al.]. Status of essential trace elements in untreated carcinomas of the head and neck. *Laryngorhinootologie*, 2003, vol. 82, n° 8, p. 573-7.
- [135] Grober U. Antioxidants and Other Micronutrients in Complementary Oncology. *Breast Care (Basel)*, 2009, vol. 4, n° 1, p. 13-20.
- [136] Strain J J, Bokje E, Van't Veer P, [et al.]. Thyroid hormones and selenium status in breast cancer. *Nutr Cancer*, 1997, vol. 27, n° 1, p. 48-52.
- [137] Sieja K, Talerczyk M. Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy. *Gynecologic Oncology*, 2004, vol. 93, n° 2, p. 320-327.
- [138] Haute Autorité De Santé. *Cancer de l'ovaire*. HAS, 2010. 40 p. (Guide affection longue durée).
- [139] Drummond G R, Selemidis S, Griendling K K, [et al.]. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, vol. 10, n° 6, p. 453-71.

- [140] Gianni D, Taulet N, Zhang H, [et al.]. A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS Chem Biol*, 2010, vol. 5, n° 10, p. 981-93.
- [141] Qiao J, Gu C, Shang W, [et al.]. Effect of green tea on pharmacokinetics of 5-fluorouracil in rats and pharmacodynamics in human cell lines in vitro. *Food Chem Toxicol*, 2011, vol. 49, n° 6, p. 1410-5.
- [142] Zhang Q, Tang X, Lu Q, [et al.]. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 $\alpha$  protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*, 2006, vol. 5, n° 5, p. 1227-38.
- [143] Johnson I T. Green tea and cancer. *The Lancet Oncology*, 2010, vol. 11, n° 6, p. 519-520.
- [144] Sah J F, Balasubramanian S, Eckert R L, [et al.]. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, n° 13, p. 12755-62.
- [145] Shimizu M, Deguchi A, Lim J T, [et al.]. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2005, vol. 11, n° 7, p. 2735-46.
- [146] Fang M Z, Wang Y, Ai N, [et al.]. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*, 2003, vol. 63, n° 22, p. 7563-70.
- [147] Golden E B, Lam P Y, Kardosh A, [et al.]. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood*, 2009, vol. 113, n° 23, p. 5927-37.
- [148] Neergheen V S, Bahorun T, Taylor E W, [et al.]. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 2010, vol. 278, n° 2, p. 229-41.
- [149] Nelson S K, Bose S K, Grunwald G K, [et al.]. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo : a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, vol. 40, n° 2, p. 341-7.

# S e r m e n t      d e      G a l i e n

---

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

- d'honorer ceux qui m'ont instruit 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 couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



## R É S U M É

La consommation d'antioxydants chez les patients sous chimiothérapie est de plus en plus fréquente aux États-Unis comme en France. Toutefois, ce sujet fait débat au sein de la communauté scientifique en raison du risque d'interactions non écarté entre antioxydants et anticancéreux. L'émergence de molécules douées d'activités antioxydantes élaborées laisse néanmoins à penser qu'il serait dommage de se priver du potentiel de certains antioxydants dans la stratégie anticancéreuse.

L'identification des espèces responsables des dommages oxydatifs et de l'induction du stress oxydant ainsi que la description des antioxydants enzymatiques permet de prendre conscience de l'importance de la biochimie radicalaire au sein des cellules. Afin d'appréhender l'éventuel intérêt d'une supplémentation en antioxydants, les différents mécanismes pro-oxydants qui participent activement au développement des cellules tumorales ont été abordés. La mise en relation de ces différentes connaissances permet de dévoiler les éventuelles cibles thérapeutiques à même de faire l'objet d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie, et d'identifier les risques d'interactions entre antioxydants et anticancéreux.

---

## M O T S - C L E F S

Antioxydants - Chimiothérapie - Espèces réactives de l'oxygène - Biologie tumorale - Stress oxydant

---

Intitulé ou adresse de l'UFR ou du laboratoire :

UNIVERSITÉ DE LIMOGES, Faculté de Pharmacie  
2 rue du Docteur Marcland  
87 000 Limoges