

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID DE TLEMCCEN  
FACULTE DES SCIENCES



DEPARTEMENT DE CHIMIE  
LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE  
SUBSTANCES NATURELLES ET ANALYSES (COSNA)



# THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR EN SCIENCES

*Spécialité Chimie Bio-organique et Thérapeutique*

Par

**Mlle Lamia HAMDAN**

Sur le Thème

### **Resvératrol et dérivés ciblés : Extraction, Synthèse et Pharmacologie**

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

**Président**

Professeur Latifa NEGADI

Faculté des Sciences UAB Tlemcen

**Examineurs**

Professeur Bachir MOSTEFA KARA

Faculté des Sciences UAB Tlemcen

Professeur Bouchra MEDDAH

Faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat /Maroc

Docteur Habib BOUKERCHE

Université Claude Bernard Lyon1/France

**Invitée**

Professeur Soumia GHOMARI

Faculté de Médecine UAB Tlemcen

**Directeur de thèse**

Professeur Joseph Mulengi KAJIMA

Faculté des Sciences UAB Tlemcen

**Co-Directeur de thèse**

Docteur Zoheir ARRAR

Faculté des Sciences UAB Tlemcen

# REMERCIEMENTS

*Une thèse est un travail de longue haleine, enrichissant, parsemé de rencontres et de surprises, se terminant par une grande rétrospective du chemin accompli : la rédaction. Avant d'exposer mes travaux de recherches, il est nécessaire d'exprimer, avec plaisir, ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à les réaliser et/ou qui m'ont fait l'honneur de les juger.*

*Mes premiers remerciements vont tout naturellement au **Professeur Joseph Mulengi КАЖИМА**, mon Directeur de thèse, celui qui m'a permis d'approfondir un des vastes domaines de la Science. Je vous remercie vivement de m'avoir accompagné tout au long de ce parcours, de m'avoir guidé et enseigné les réflexes du bon chercheur. Vous m'avez appris à poser les bonnes questions et y répondre avec le maximum de rigueur. Je vous remercie aussi de m'avoir montré l'exemple dans la préparation et la rédaction de mes travaux. Vos qualités scientifiques et humaines, votre écoute, votre patience, votre optimisme et votre extraordinaire force de travail font de vous un exemple dont j'espère pouvoir longtemps en profiter.*

*J'adresse également mes remerciements au **Docteur Zoheir АРРАА**, mon co-Directeur de thèse, pour avoir su me guider avec attention pendant ces années de thèse. Votre précieux encadrement, vos encouragements, votre disponibilité, votre gentillesse et vos conseils avisés m'ont permis de fructifier ce travail de recherche. Je vous adresse, ici, toute ma reconnaissance.*

*Ma profonde gratitude va également au **Docteur Habib BOUKERCHE** pour sa collaboration inestimable. Merci de m'avoir permis de vivre une expérience enrichissante et pleine d'intérêt. Votre chaleureux accueil, votre précieux soutien, votre disponibilité, la confiance que vous m'avez accordée, et toutes les instructives orientations ont largement contribué à l'aboutissement de cette thèse.*

*Je tiens à remercier vivement les membres du jury:*

***Madame Latifa NEGADI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tlemcen, qui m'a fait le privilège d'en assurer la présidence.*

***Madame Bouchra MEDDAH**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat ;  
**Monsieur Bachir MOSTEFA KARA**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tlemcen ainsi que  
**Monsieur Habib BOUKERCHE**, Directeur d'équipe de recherche à l'INSERM, d'avoir eu l'amabilité, malgré leurs charges, de consacrer un temps précieux pour examiner cette thèse.*

Aussi, **Madame Soumia GHOMARI**, Professeur à la Faculté de Médecine de Tlemcen, en tant qu'invitée es-qualité, pour avoir aimablement accepté d'assister à ma soutenance.

Mes remerciements particuliers à Monsieur le Recteur de l'Université Abou Bekr Belkaid, **Professeur Nouredine GHOUALI**.

Mes remerciements, également, à tous les responsables de différents niveaux :

Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences, **Professeur Boufeldja TABTI** ;

Mesdames et Messieurs les membres du conseil scientifique de la Faculté des Sciences ; Qui ont conjugué leurs efforts pour aboutir, aujourd'hui, à cette cérémonie.

J'exprime ma gratitude à tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation tout au long de mon cursus universitaire, aussi bien au sein de l'université de Tlemcen qu'au niveau des institutions étrangères et plus particulièrement :

**Monsieur Kaouel MEGUENNI**, Professeur à la Faculté de Médecine de Tlemcen et

**Monsieur Quadiri TIMOUR**, Maître de Conférence et directeur du laboratoire de Pharmacologie Médicale de l'Université Claude Bernard Lyon 1 qui, de part leurs compétences scientifiques et leurs qualités humaines, m'ont fortement encouragé à effectuer une carrière dans la recherche médicale.

Ces remerciements seront incomplets si je ne cite pas :

-L'unité de Recherche sur les Pathologies de l'Hémostase-Cancer à la Faculté de Médecine René Laennec de Lyon, pour leur amabilité et la disponibilité dont ils ont fait preuve à l'égard de mon travail.

-Aux membres du laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie de Rabat pour l'intérêt dont ils ont fait preuve envers mon thème de recherche, les moyens qu'ils ont mis en œuvre pour me permettre de réaliser mes travaux sans oublier leur générosité.

Pour finir, j'exprime ma sincère gratitude envers tous ceux et celles qui m'ont accompagné de près ou de loin à la concrétisation de cette thèse.

# DEDICACES

*Me voilà donc au terme de cette thèse qui représente un chapitre important de ma vie, avec ses hauts et ses bas, ses rires et ses larmes, ses souffrances et ses satisfactions, ses rencontres et ses départs. Ce chemin, jamais linéaire, aux embranchements multiples et aux détours nombreux, est celui d'un apprentissage professionnel, mais surtout personnel. J'ai la chance d'avoir été accompagnée à chaque étape de ce périple et d'avoir avancé avec les personnes que j'aime.*

*Je dédie cette thèse à **Mes Très Chers PARENTS** qui tiennent une place immense dans mon cœur. **ПАПА, МАМА**; Vous resterez la plus importante école de ma vie, je ne cesse d'apprendre tous les jours avec vous. Vous avez toujours été là pour moi, et à aucun moment vous n'avez cessé de me couvrir d'amour et d'encouragements dans les différentes étapes de ma vie personnelle et professionnelle. Pour votre patience dans les moments difficiles et votre amour constant, Recevez cette thèse en guise de remerciement et témoignage de ma plus profonde gratitude.*

*À celle qui m'a toujours aidée, écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours ; celle qui a toujours été présente pour moi, ma très chère sœur **NAWEL***

*Je souhaite, également, dédier ce travail à la vie et ses nouveaux venus, mon petit ange et neveu **WASSIM**, dont sa naissance et ses sourires sont venus apporter innocence, sens et espoir à ces belles années de thèse.*

*À ma sœur **AMINA** et mon beau frère **NABIL** qui ont été mes plus fervents supporteurs.*

*Mes sentiments les plus sincères d'amitié s'adressent à mes amies **FOUZIA, KAMILA, WAFIA** et **WARDA** pour votre présence, votre soutien moral et tous les moments inoubliables que nous avons passés ensemble.*

***Dans cette épreuve où seuls le courage et la maîtrise des connaissances ne suffisent pas, la force qui donne l'impulsion ne peut provenir que du BON DIEU.***

***Comme toute production scientifique exécutée "pour la gloire". Ce modeste travail a été réalisé grâce à la volonté du BON DIEU.***

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>II</b>
<b>DEDICACES</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>VII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>3</b>
I. Cancer en tant que contexte de recherche.....	4
I.1. Définition et données épidémiologiques .....	4
I.2. Origine possible du cancer.....	5
I.3. Traitements anticancéreux actuels .....	10
II. Cancer du sein .....	13
II.1. Définition.....	13
II.2. Epidémiologie et facteurs de risque .....	13
II.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse mammaire.....	15
III. Stress oxydatif et implication dans le développement du cancer.....	16
III.1. Généralités .....	16
III.2. Implication des espèces oxygénées activées dans le développement du cancer.....	17
IV. Mécanismes physiologiques des antioxydants dans la prévention du cancer.....	19
IV.1. Les antioxydants .....	19
IV.2. Le resvératrol comme cible thérapeutique très prometteuse dans la prévention et le traitement du cancer .....	20
V. Les inhibiteurs des centrales énergétiques comme nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse .....	25
V.1. Généralités.....	25
V.2. Mécanismes anticancéreux du 3-BrPA .....	25
V.3. L'impact de l'acidification intracellulaire par le CHC dans l'inhibition de la production énergétique au sein de la cellule tumorale .....	27
<b>CHIMIE : SYNTHÈSE ORGANIQUE</b> .....	<b>28</b>
<b>ETUDE BIOCHIMIQUE</b> .....	<b>38</b>
I. Matériels et méthodes .....	39
I.1. Les lignées cellulaires, les réactifs et les milieux de culture .....	39
I.2. Culture cellulaire .....	40
I.3. Estimation de la viabilité cellulaire par exclusion du bleu trypan.....	41

I.4. Mesure de la viabilité cellulaire par le test de clonogénicité.....	41
I.5. Mesure de la prolifération cellulaire par le MTT assay.....	41
I.6. Etude de l'apoptose par cytométrie en flux .....	43
I.7. Analyse de l'expression des MCT1, Bax et Bcl-2 par western Blot .....	43
I.8. Tests de migration, d'invasion cellulaire et de tumorigénicité in vivo.....	46
I.9. Analyse statistique .....	47
<b>II. RESULTATS .....</b>	<b>47</b>
II.1. Effets du resvératrol et du 3-BrPA sur la prolifération du cancer du sein par le MTT assay ...	47
II.2. Mécanismes impliqués dans l'inhibition <i>in-vitro</i> du cancer du sein par l'ACCA .....	48
II.2.1. Effet de l'ACCA sur la viabilité des cellules cancéreuses du sein et sur la formation des colonies .....	48
II.2.2. Effet de l'ACCA sur la prolifération des lignées cellulaires HBL100, MDA-MB231, MCF-7 et T47D .....	52
II.2.3. Effet de l'ACCA sur l'induction de l'apoptose.....	55
II.2.4. Effet de l'ACCA sur l'expression des MCT1, Bax et Bcl-2 .....	57
II.2.5. Effet de l'ACCA sur la migration, l'invasion et la croissance tumorales des cellules cancéreuses humaines mammaires in vivo .....	60
II.3. Effets des dérivés 1 et 2 sur la prolifération des lignées MDA-MB 231 et MCF-7.....	62
II.4. Effets de nos composés sur la prolifération cellulaire en association avec le traitement anti-cancéreux conventionnel.....	63
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES D'AVENIR.....</b>	<b>70</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>72</b>
I. Partie chimique .....	73
II. Partie biochimique.....	86
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>88</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>95</b>
<b>LEXIQUE .....</b>	<b>114</b>

# ABBREVIATIONS

- ABC:** ATP Binding Cassette
- ACCA:** Acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique
- ACCE:**  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamate d'éthyle
- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- APS:** Ammonium persulfate
- ATP:** Adénosine triphosphate
- BCA:** Bicinchoninic Acid
- BP:** Boîte de Pétri
- 3-BrPA:** Acide 3-bromopyruvique
- Caspases :** Cystein Aspartate Specific Proteases
- CHC:** acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
- CPA:** Cyclophosphamide
- D1:** Dérivé 1
- D2:** Dérivé 2
- DCC:** Dicyclohexylcarbodiimide
- DED:** domaine effecteur de mort
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMF:** Diméthylformamide
- DMSO:** Diméthylsulfoxyde
- Dox:** Doxorubicine
- DR:** récepteur de mort
- EGF:** facteur de croissance épidermique
- ER:** récepteur des œstrogènes
- FADD:** domaine de mort associé au ligand de Fas
- FITC:** Fluoresceinisothiocyanate
- 5-FU:** 5-Fluorouracile
- GSH :** Glutathion
- HBL-100:** Human Breast cell Line-100
- HK II :** Hexokinase II
- HPLC:** Chromatographie liquide haute performance
- IP:** Iodure de propidium
- MCF-7:** Michigan Cancer Foundation -7

**MCTs:** Transporteurs monocarboylates  
**MDA-MB231:** M.D.Anderson Metastatic Breast  
**MDR:** Multi Drug Resistance  
**MEM:** Minimum Essential Medium Eagle  
**MTT:** 3-(4, 5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide  
**NF- $\kappa$ B:** facteur nucléaire kappa B  
**OD:** Optical Density  
**PCC:** Chlorochromate de pyridinium  
**PVDF:** PolyVinylidene DiFluoride  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**RES:** Resvératrol  
**ROS:** Espèces réactives oxygénées  
**RPMI-1640:** Roswell Park Memorial Institute  
**SDS:** Sodium Dodécyl Sulfate  
**SDS-PAGE:** SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
**SVF:** Sérum de veau fœtal  
**TC:** Traitement conventionnel  
**TEMED:** Tétraméthyléthylènediamine  
**TGF:** Facteur de croissance tumorale  
**THF:** Tétrahydrofurane  
**TNF:** Facteur nécrosant des tumeurs  
**TRX:** Thiorédoxine  
**uPA:** Plasminogène activateur



## **INTRODUCTION**

Le cancer est un véritable problème de santé publique. Selon le rapport annuel de l'organisation mondiale de la santé (OMS), publié en décembre 2008, cette maladie est devenue l'une des principales causes de mortalité dans le monde, et le nombre de cas devrait doubler d'ici 2030 <sup>(1)</sup>. La lutte contre le cancer représente donc plus que jamais un enjeu mondial d'importance, d'autant plus que la charge du cancer sur les finances des pays ne peut que continuer à s'alourdir. La recherche porte aujourd'hui sur la compréhension des bases moléculaires, énergétiques et génétiques impliquées dans les mécanismes de l'oncogenèse, la recherche de cibles diagnostique, pronostique et thérapeutique, et le développement d'un arsenal thérapeutique approprié.

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité féminine dans la tranche d'âge de 35 à 55 ans <sup>(2)</sup>. Son incidence augmente dans la quasi-totalité des pays, qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement : cette augmentation étant en moyenne de 1% par an <sup>(3)</sup>. L'équipe « Biomolécules et Cibles Cellulaires Tumorales » (Faculté de médecine de l'université de Limoges) est particulièrement impliquée dans la recherche de molécules présentant des effets protecteurs et thérapeutiques sur certains cancers hormono-dépendants tel le cancer du sein. De nombreuses investigations ont été réalisées afin de vérifier l'activité de ces substances en matière de propriétés antiprolifératives et antinéoplasiques <sup>(4,5)</sup>.

La première étape de nos travaux consiste à extraire et à synthétiser un composé polyphénolique, le resvératrol. Ensuite nous poursuivons la synthèse de deux substances inhibitrices du métabolisme énergétique à savoir, l'acide 3-bromopyruvique (3-BrPA) et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (ACCA), dérivé de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHC). Finalement, en nous basant sur les éléments dégagés lors des études antérieures <sup>(6-10)</sup>, nous cherchons à confirmer que le traitement par ces composés induit des activités antiprolifératives sur le développement du cancer du sein.

Le resvératrol a la capacité de bloquer ou d'inhiber diverses étapes du développement du cancer du sein en exerçant une activité antioxydante, en bloquant le processus inflammatoire, et en altérant le cycle cellulaire, ce qui, par conséquent, induit la stimulation de la mort cellulaire programmée <sup>(11-16)</sup>.

Une étude récente a montré que les cellules cancéreuses mammaires affichaient également une sensibilité au traitement par le 3-BrPA qui, en inhibant la glycolyse, permet d'engendrer l'arrêt du cycle cellulaire et d'induire l'apoptose <sup>(8)</sup>.

Le passage du pyruvate et du lactate à travers les membranes cellulaires et les membranes internes mitochondriales s'effectue à l'aide des transporteurs monocarboxylates (MCTs) <sup>(17,18)</sup>. Du fait qu'aucune étude complémentaire aux travaux effectués sur l'inhibition des MCTs par le CHC n'a été effectuée à ce jour, la seconde étape de notre travail est consacrée à une tentative d'élucidation des mécanismes successifs au blocage du transfert du lactate et du pyruvate à travers la membrane plasmique et de démontrer que le déclenchement du processus d'apoptose est directement impliqué dans la mort des cellules cancéreuses mammaires observée lors du traitement par l'ACCA.

En parallèle aux deux étapes de recherche qui font l'objet de nos travaux de thèse, et afin de mettre en évidence d'éventuelles propriétés antiprolifératives, synergétiques ou potentialisatrices de nos produits sur le développement du cancer du sein, nous avons testé l'effet antiprolifératif résultant de l'association du resvératrol, 3-BrPA ou ACCA avec les médicaments chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer du sein : la doxorubicine (Dox), le 5-fluorouracile (5-FU) et le cyclophosphamide (CPA).

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

### **I. Le cancer en tant que contexte de recherche**

#### **I.1. Définition et données épidémiologiques**

« Cancer » est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. On parle aussi de tumeurs malignes ou de néoplasmes. L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation normale, peuvent envahir des parties du corps adjacentes et essaimer dans d'autres organes, formant ainsi ce qu'on appelle des métastases. Ces métastases sont la principale cause de décès par le cancer <sup>(1)</sup>.

De ce fait, le cancer constitue l'un des problèmes de santé publique à l'échelle mondiale et l'une des préoccupations majeures en matière de recherche dans toutes les régions du monde. Selon les estimations de l'OMS, plus de 20 millions de personnes de par le monde sont atteintes de cette maladie, dont 7.6 millions décèdent chaque année, soit environ 13 % du total des décès. L'ampleur de cette morbidité n'a fait que croître au cours de ces 100 dernières années ; mais cette observation doit être mise en relation avec l'augmentation constante de la proportion de la population âgée ou très âgée <sup>(1)</sup> et amplifiée par le fait que la probabilité de développer un cancer augmente avec l'âge.

La pathologie oncologique a fait irruption avec virulence dans les pays en voie de développement, au point qu'elle pèse lourdement sur le fonctionnement des systèmes de santé de ces pays. Plus de 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à faibles revenus ou à revenus intermédiaires. D'après les projections, leur nombre devrait augmenter pour dépasser, selon les estimations, 11 millions de personnes en 2030 à l'échelle mondiale <sup>(1)</sup>.

En Algérie, le cancer est aussi devenu l'une des causes essentielles des décès. Environ 30 000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chaque année, avec une augmentation de plus de 50% du nombre de cas depuis une décennie. Une meilleure accessibilité au diagnostic et aux soins est devenue indispensable pour la politique de santé et repose sur les développements structurels et stratégiques. Les années à venir doivent être consacrées à une véritable politique de développement des soins et de prévention du cancer, quel qu'en soit le type <sup>(19)</sup>.

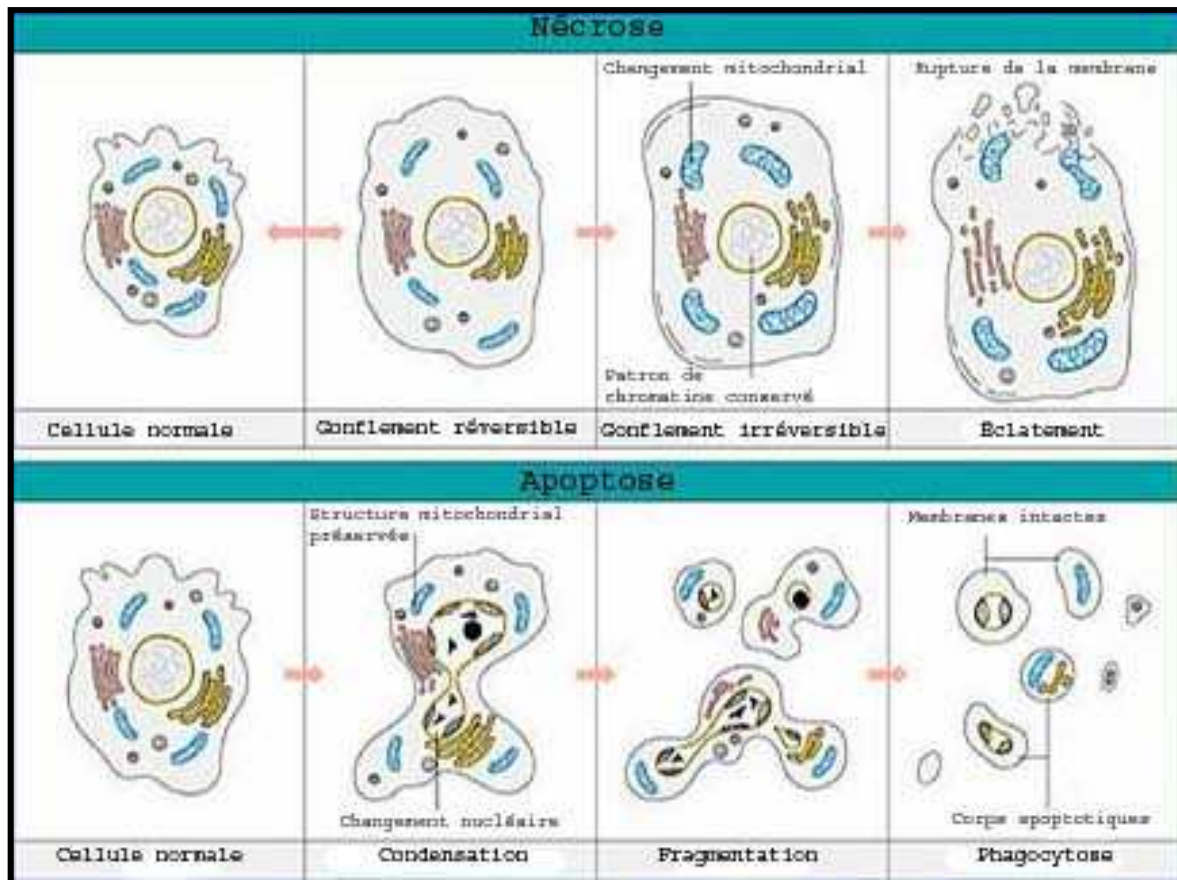
Les cancers qui, chaque année, entraînent le plus grand nombre de décès sont ceux du poumon, du sein, de l'estomac, du foie, et du côlon. Les types de cancer les plus fréquents ne sont pas les mêmes chez l'homme et chez la femme <sup>(1)</sup>.

Le tabagisme est le facteur de risque le plus important, entraînant dans le monde 22% de la mortalité par le cancer et 71% des décès par le cancer du poumon. Fumer provoque de nombreux types de cancer, notamment ceux du poumon, de l'œsophage, du larynx, de la bouche, de la gorge, du rein, de la vessie, du pancréas, de l'estomac et du col utérin. Près de 70% du poids du cancer pulmonaire peuvent être attribués au seul fait de fumer. Il a été prouvé que le tabagisme passif, également connu sous le nom de tabagisme environnemental, provoquait des cancers pulmonaires chez des adultes non-fumeurs <sup>(1)</sup>.

### **I.2. Origine possible du cancer**

Le cancer est le résultat d'une dérégulation des systèmes de contrôle de la croissance cellulaire, une dérégulation qui entraîne la prolifération anarchique et incessante des cellules, accompagnée de l'inhibition des processus de mort cellulaire programmée (apoptose). L'apoptose est un cas de mort cellulaire programmée suivant une séquence d'évènements cellulaires, cytologiques, bien précis, décrits en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie. Elle concerne le monde animal et constitue le cas le plus étudié de mort cellulaire programmée. Elle permet l'élimination d'une cellule sans provoquer de dommages (ou stress) aux cellules environnantes.

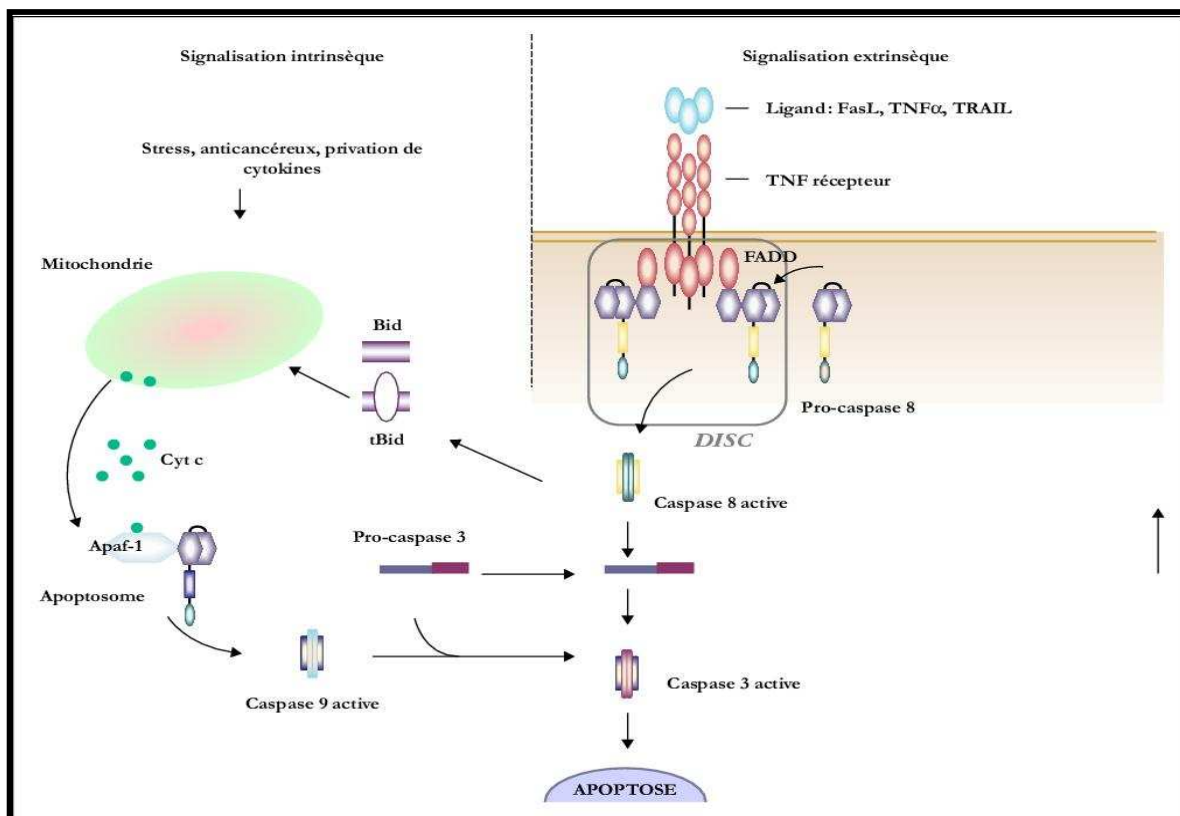
Le terme apoptose désigne un tableau morphologique associant condensation cytoplasmique et chromatinienne, fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), bourgeonnement de la membrane plasmique et perte de l'asymétrie membranaire (externalisation de la phosphatidylsérine membranaire); la synthèse de macromolécules est parfois requise et ces changements sont rapidement suivis de la phagocytose des cellules mortes (Figure 1).



**Figure 1.** Modifications morphologiques des cellules au cours de l'apoptose <sup>(20)</sup>

L'apoptose est contrôlée par deux voies distinctes de signalisation. L'une fait intervenir des récepteurs de « mort », membres de la famille des récepteurs du facteur nécrosant des tumeurs (TNF) qui présentent un domaine intracellulaire de mort, et l'autre voie est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 qui impliquent le relargage du cytochrome C de la mitochondrie. L'ensemble de ces voies aboutit à l'activation d'enzymes protéolytiques, les Cystein Aspartate Specific Proteases (caspases) <sup>(21)</sup>. L'apoptose présente alors une fragmentation des noyaux, une condensation de la chromatine, une rétraction du cytoplasme et la formation de corps apoptotiques <sup>(22)</sup>.

Parmi les récepteurs de « mort » (DR), il existe le récepteur CD95 (FAS/APO-1) et les récepteurs du TNF<sup>(23)</sup>. La partie cytoplasmique du récepteur CD95 contient un domaine de « mort » qui lie des protéines adaptatrices, tel que le domaine de « mort » associé au ligand de FAS (FADD) après activation du récepteur. FADD possède un domaine effecteur de « mort » (DED) qui recrute des protéines contenant DED, tel que la pro-caspase 8<sup>(24)</sup>. Les membres de la famille Bcl-2 sont représentés par une vingtaine de protéines pro et anti-apoptotiques. Le ratio des sous-ensembles pro et anti-apoptotiques détermine la susceptibilité des cellules à s'engager vers la mort cellulaire programmée. Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, Bid sont des protéines pro-apoptotiques alors que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, A1 et MCL-1 sont des protéines anti-apoptotiques<sup>(25)</sup>. Les dimères de protéines anti-apoptotiques se lient sur la membrane externe de la mitochondrie et préviennent le relargage des activateurs des caspases, alors que les protéines pro-apoptotiques augmentent la perméabilité membranaire et induisent le relargage du cytochrome C<sup>(26)</sup> (Figure 2).

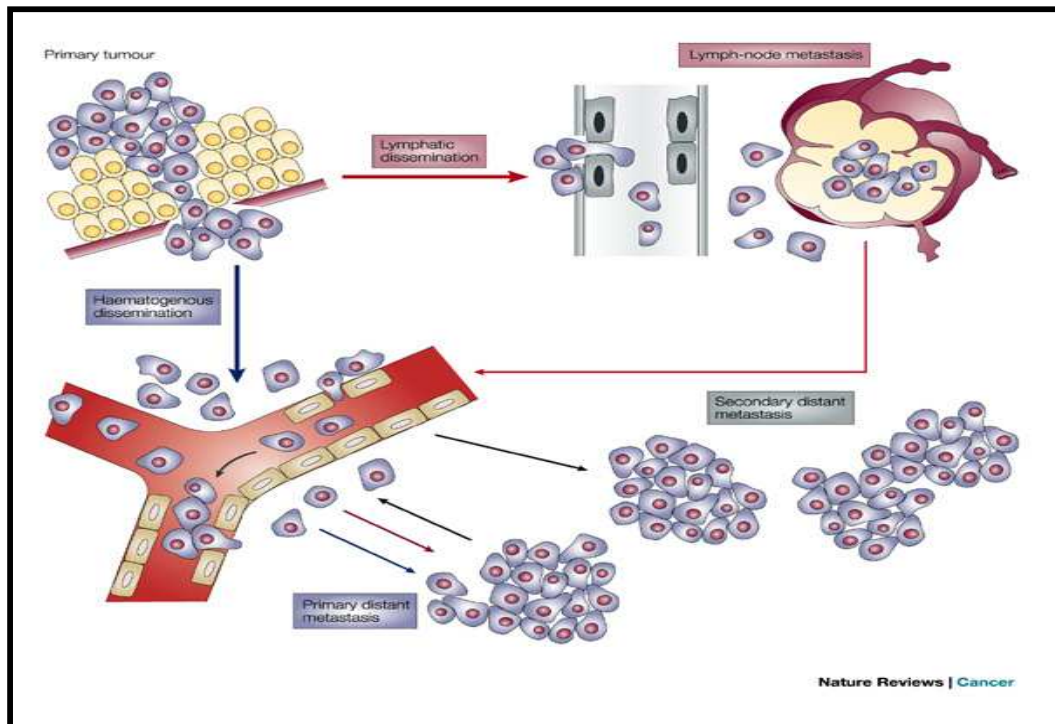


**Figure 2.** Différentes voies de l'apoptose<sup>(27)</sup>

Par conséquent, l'inhibition de ce processus aboutit à la formation, au sein du tissu, d'une masse de cellules anormales appelée tumeur. Bénéignes, ces tumeurs sont petites, localisées et peuvent être retirées par chirurgie. Devenues malignes, elles se nomment cancer, qui peut infiltrer les tissus voisins, récidiver après ablation de la tumeur, ou essaimer par le système circulatoire dans d'autres organes où se forment des métastases.

L'équipe de Pantel a mis en place un modèle de la cascade métastatique qui permet de souligner les différentes voies de dissémination<sup>(28)</sup>. Quand la dissémination des cellules tumorales commence très précocement dans le développement tumoral, un grand pourcentage de cellules de la tumeur primitive acquiert la capacité de métastaser. Les cellules tumorales qui se retrouvent à distance, après avoir emprunté la circulation sanguine, meurent ou restent en phase G0. Ces cellules dormantes sont insensibles à la chimiothérapie traditionnelle qui cible les cellules à division rapide. Elles sont responsables de l'apparition de métastases tardives (quelques mois ou années après la tumeur primitive)<sup>(29)</sup>. Les cellules cancéreuses peuvent également disséminer à partir de la tumeur primitive jusqu'au ganglion lymphatique durant les premières étapes de la croissance tumorale. Ces cellules prolifèrent et forment des métastases solides dans les ganglions lymphatiques (Figure 3).





**Figure 3.** Modèle du processus métastatique. Les cellules tumorales disséminent à partir du site primitif par voie lymphatique (flèches rouges) ou par voie hématoène (flèches bleues) <sup>(28)</sup>

De plus, les cellules tumorales subissent des adaptations métaboliques et développent des mécanismes de résistance à l'apoptose <sup>(30)</sup>. Cette résistance tumorale est la conséquence de changements multiples, aucun n'est mutuellement exclusif.

Les cellules cancéreuses améliorent la signalisation anti-apoptotique, augmentent la réparation de l'ADN endommagé et réactivent les protéines dénaturées etc. Ces changements résultent de l'interaction entre les facteurs génétiques du sujet et les agents extérieurs pouvant être classés en trois catégories:

- Les cancérogènes physiques, comme le rayonnement ultraviolet et les rayonnements ionisants;
- Les cancérogènes chimiques, comme l'amiante, les composants de la fumée du tabac, l'aflatoxine (contaminant des denrées alimentaires) ou l'arsenic (polluant de l'eau de boisson);
- Les cancérogènes biologiques, comme des infections dues à certains virus, bactéries ou parasites.

Le vieillissement est un autre facteur fondamental dans l'apparition du cancer. En effet, l'incidence du cancer augmente de façon spectaculaire avec l'âge, très vraisemblablement à cause de l'accumulation des risques tout au long de la vie, conjuguée au fait que les mécanismes de réparation cellulaire perdent généralement de leur efficacité avec l'âge <sup>(31)</sup>.

Dans ce cadre, la recherche en oncologie poursuit un double objectif : l'exploration de stratégies thérapeutiques innovantes et la mise en place d'actions de prévention ciblant les sujets à risques.

### **I.3. Traitements anticancéreux actuels**

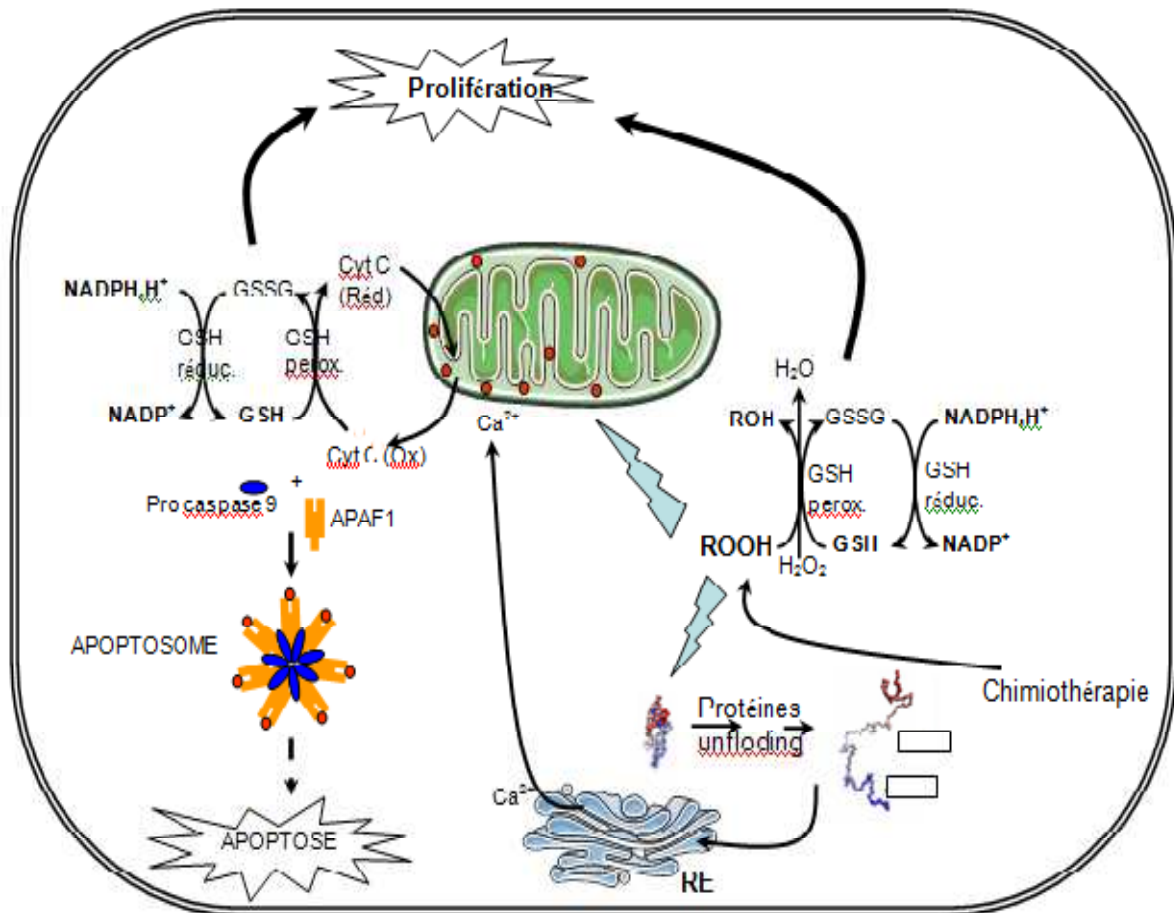
La chimiothérapie anticancéreuse constitue, avec la chirurgie et la radiothérapie, un élément essentiel de l'arsenal thérapeutique anticancéreux d'aujourd'hui <sup>(32)</sup>. De plus en plus souvent, la chimiothérapie apparaît comme un des éléments essentiels de tout programme de traitement anticancéreux multidisciplinaire efficace <sup>(33)</sup>. D'autres approches médicamenteuses sont en cours de développement où viennent d'être ajoutées à l'arsenal thérapeutique tels que les anticorps monoclonaux (herceptine), les modificateurs de la réponse immune (interferon  $\alpha 2$  ; Interleukine II), les inhibiteurs de l'activité protéine-tyrosine kinase (imatinib), les vaccins antitumoraux, les inhibiteurs de l'angiogénèse, la thérapie génique et/ ou cellulaire.

Cependant, la conséquence importante qui est liée à la propriété principale de ces produits sur la division cellulaire, est d'affecter de la même façon les cellules tumorales et les cellules saines et plus particulièrement les tissus présentant un taux de renouvellement important.

La majorité des effets toxiques observés découlent de cette propriété : myélosuppression, troubles de la cicatrisation, retard de croissance (enfants), stérilité, tératogénicité, alopecie, atteinte des muqueuses des voies digestives, etc. Ces substances peuvent même être carcinogéniques. Enfin, ces produits provoquent très souvent des nausées et vomissements sévères lesquels diminuent la compliance des patients. D'autres effets toxiques sont observables de façon spécifique suivant les cas.

De façon générale, les chimiothérapies utilisées agissent en entraînant des dégâts intracellulaires (aduits à l'ADN), s'accompagnant d'une surproduction de radicaux libres, qui aboutissent soit à la mort cellulaire par apoptose, soit à la survie (Figure 4). Celle-ci survient lorsque la cellule a réussi à mettre en place des « parades » efficaces (réparation des lésions ADN, amplification du système antioxydant réduisant les radicaux, etc.), qui lui permettent de réparer les dégâts, et/ou de s'y adapter.

La cellule peut aussi expulser les chimiothérapies au niveau de sa membrane cytoplasmique vers le milieu extérieur par surexpression du transporteur transmembranaire P-glycoprotéine 170, une protéine appartenant à la famille des transporteurs de l'adénosine triphosphate (ATP), associé au phénotype Multi Drug Resistance (MDR) <sup>(34)</sup>.



**Figure 4.**

Schéma des séquences conduisant la chimiothérapie à l'induction de l'apoptose <sup>(35)</sup>

Quels que soient les mécanismes de chimiorésistance, ils sont tous nécessairement très consommateurs d'énergie, et induisent des dégâts d'autant plus importants. De ce fait, les résultats sont encore en deçà des attentes, et la mise au point de nouveaux composés à potentiel anticancéreux qui seraient plus sélectifs en n'affectant pas les cellules normales est indispensable pour pallier à la toxicité des traitements anticancéreux actuels.

## **II. Cancer du sein**

### **II.1. Définition**

La notion de « cancer du sein » relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif. Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes du sein, potentiellement agressives, tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes. Le terme « carcinome » ou « épithélioma » est parfois utilisé, comme synonyme de « cancer ». En réalité le carcinome est un terme spécifique de morphologie microscopique (histologique) qui désigne les types les plus fréquents du cancer du sein d'origine épithéliale.

La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires), soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires <sup>(36)</sup>.

### **II.2. Epidémiologie et facteurs de risque**

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Une femme sur 12 en sera atteinte à un moment de sa vie <sup>(6)</sup>. Il représente 8 à 10% des tumeurs féminines dans le monde, et est responsable de 20% des décès dus aux cancers <sup>(37)</sup>. De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, mais, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein. Ainsi, plusieurs catégories peuvent être identifiées avec des risques relatifs décroissants : les risques principaux, les risques importants, les risques d'importance mineure ou dont l'importance reste à déterminer.

- Les risques principaux

Le sexe est le principal facteur de risque de cancer du sein puisqu'il concerne 99 % des femmes contre 1 % des hommes <sup>(38, 41)</sup>. Après le sexe, l'âge représente un facteur important pour tout type de cancer <sup>(42, 43)</sup>. Le cancer du sein affecte très rarement les femmes de moins de 30 ans, mais plus une femme avance en âge, plus le risque d'en développer augmente <sup>(39, 40)</sup>. L'hérédité joue aussi un rôle important: 5 à 10 % des cancers du sein sont dus à une prédisposition génétique <sup>(45-47)</sup>. Plusieurs gènes sont connus comme associés à un risque accru de ce type de cancer quand ils portent des mutations <sup>(46)</sup>.

- Les risques importants

Les maladies histologiques du sein, même bénignes, ainsi que les antécédents de cancer, quels qu'ils soient, peuvent augmenter le risque de cancer du sein. Avant l'âge de 40 ans, l'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes est susceptible de provoquer un cancer du sein dans les années ultérieures, dans la mesure où ces radiations ionisantes endommagent l'ADN. L'origine géographique influence aussi le risque de cancer du sein. Ce risque augmente plus de 4 fois si la patiente est née en Amérique du Nord ou en Europe du Nord comparé à une femme née en Asie ou en Afrique <sup>(40)</sup>.

- Les risques modérés

Beaucoup d'autres facteurs de risques liés au mode de vie tels que la consommation régulière d'alcool <sup>(48, 49)</sup>, le tabagisme <sup>(50, 51)</sup>, l'obésité <sup>(52, 53)</sup>, une alimentation riche en graisses <sup>(46, 55)</sup>, la contraception orale <sup>(54)</sup>, et bien d'autres peuvent favoriser le risque de cancer du sein <sup>(40, 44)</sup>.

### II.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse mammaire

La cancérogenèse mammaire est un phénomène multifactoriel. Lorsque les gènes qui régulent la prolifération et l'apoptose des cellules épithéliales de la glande mammaires sont altérés, ces cellules deviennent tumorales.

La progression tumorale peut être définie comme étant l'évolution de cellules déjà cancéreuses vers un phénotype hautement malin caractérisé par un potentiel invasif et métastatique. Au cours de ce processus, les cellules cancéreuses du sein subissent des nombreuses altérations génétiques et épigénétiques les rendant aptes à quitter le tissu primaire <sup>(56-58)</sup>. Les mutations somatiques du gène de la protéine p53 (phosphoprotéine nucléaire) sont observées dans approximativement 20 à 30% des carcinomes mammaires et semblent précéder le développement des tumeurs de phénotype invasif et malin <sup>(59-61)</sup>. Les cellules tumorales porteuses de ces mutations ont plus de probabilité d'être invasives et peu différenciées <sup>(62)</sup>.

Concernant le statut estrogénique, approximativement 60 à 80 % des tumeurs du sein expriment le récepteur des estrogènes (ER)  $\alpha$  (tumeurs ER $\alpha$  +). Ces tumeurs ont tendance à croître modérément, sont plus différenciées, et sont de meilleur pronostic <sup>(56)</sup>. La perte de l'expression de ER $\alpha$  est corrélée à une résistance à l'hormonothérapie ainsi qu'à un mauvais pronostic <sup>(63)</sup>. La surexpression du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) est retrouvée dans 25% des tumeurs invasives du sein <sup>(64)</sup>.

Des tests *in vitro* ont montré que l'invasion par les cellules métastatiques du cancer du sein était modulée par l'augmentation de l'expression de métalloprotéases induites par l'EGF ou bien par l'augmentation de l'activité protéolytique de l'urokinase ou de la production du plasminogène activateur de l'urokinase (uPA) induite par le facteur de croissance tumorale (TGF)  $\beta$ 1 <sup>(65)</sup>. La réduction de l'expression de nombreux gènes suppresseurs de métastases (*Nm23*, *KiSS1*, *BRMS1*, *CAD1* (*E-cadhérine*), *KAI1*, *MKK1*), par des mutations, des délétions ou des pertes d'hétérozygotie, caractérisent les tumeurs hautement métastatiques comme la perte de l'expression du récepteur ER $\beta$  <sup>(66)</sup>.

### III. Stress oxydatif et implication dans le développement du cancer

#### III.1. Généralités

De façon générale, le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre en faveur du taux des pro-oxydants, celui des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS), et au détriment de l'efficacité des systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence l'apparition de dégâts irréversibles pour la cellule <sup>(67)</sup>.

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres. Ces derniers dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde  $^1\text{O}_2^\bullet$  et le radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$ , ou de l'azote, tel le monoxyde d'azote  $\text{NO}^\bullet$ . D'autres espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $\text{ONOOH}$ ), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé Espèces Réactives de l'Oxygène ou ROS <sup>(68)</sup>.

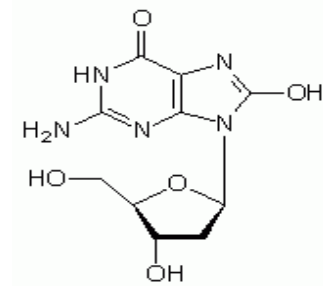
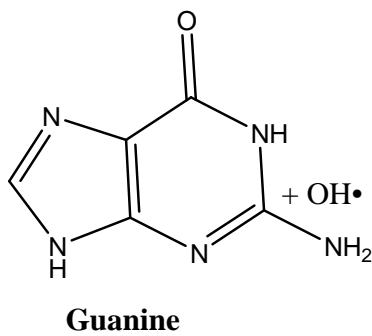
Produites en trop grande quantité, les ROS peuvent entraîner de profondes modifications dans la structure de substrats biologiques comme les protéines, les lipides, les lipoprotéines ou l'ADN. De ce fait, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies (cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, etc.) comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera au niveau d'un tissu et de types cellulaires particuliers. Il mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu <sup>(69)</sup>.



### III.2. Implication des espèces oxygénées activées dans le développement du cancer

La cancérogenèse est donc un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et, finalement, à un stade précoce de cancer. Le développement du cancer se divise en trois grandes étapes (initiation, promotion et progression) dans lesquelles le stress oxydatif est impliqué.

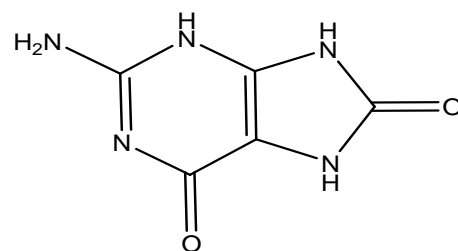
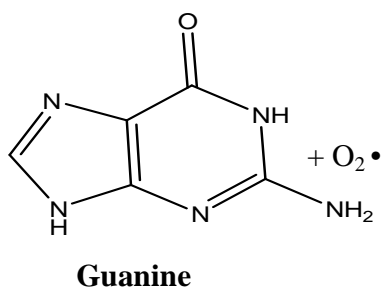
L'étape d'initiation débute lorsque des agents chimiques carcinogènes se fixent sur l'ADN. Des lésions peuvent également se produire sous l'effet de radiations ionisantes ou de rayonnements ultraviolets. Dans ce cas, les ROS, jouent un rôle important dans l'altération du matériel génétique des cellules. Le radical hydroxyle s'attaque à la guanine, base purique constitutive de l'ADN, qui se transforme en 8 hydroxy-2' déoxyguanosine. Ceci a comme conséquence l'apparition d'une mutation au niveau de l'ADN (Schéma1).



**8 hydroxy-2' déoxyguanosine**

**Schéma1.**

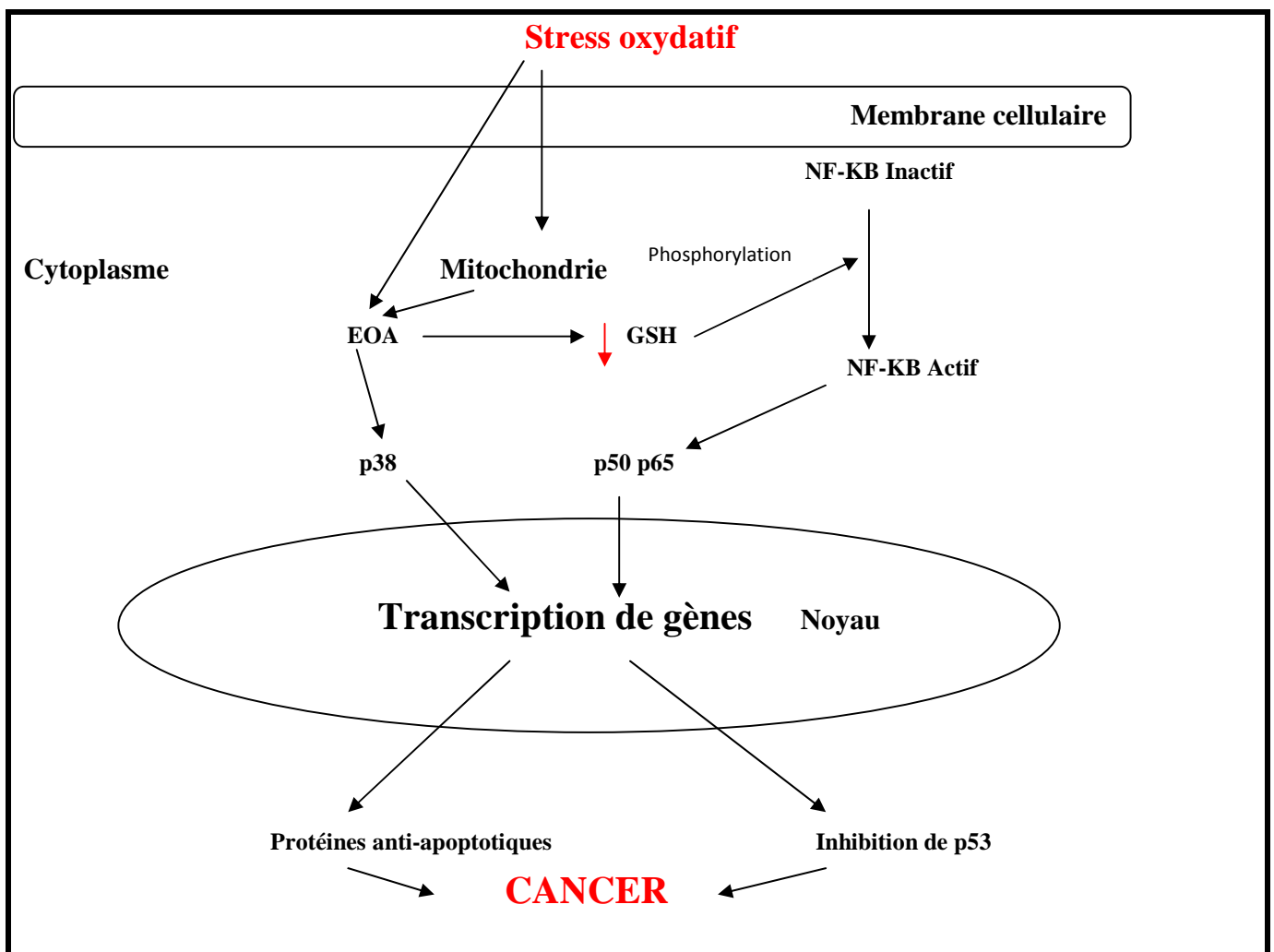
L'oxygène singulet réagit aussi avec la guanine pour former un autre dérivé oxydé, la 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (Schéma 2) <sup>(70)</sup>.



**8-oxo-7, 8-dihydroguanine**

**Schéma 2.**

Les ROS peuvent aussi agir comme messagers secondaires <sup>(71)</sup> en modifiant dans la cellule la régulation rédox du glutathion (GSH) qui est un agent antioxydant important. Il en résulte une activation de la thiorédoxine (TRX) qui active le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-KB) normalement dans un état inactif dans le cytoplasme. Une fois activé, le NF-KB migre dans le noyau de la cellule où il peut transactiver des gènes cibles. Il participe de la sorte à la synthèse de nombreux médiateurs comme des protéines d'adhésion impliquées dans le processus du développement du cancer (Figure 5).



**Figure 5.** Implication du stress oxydatif dans la genèse du cancer <sup>(71)</sup>

La promotion est un processus pouvant se prolonger pendant plusieurs décades au cours desquelles la cellule initiée se transforme en cellule pré-néoplasique. Ce processus peut se produire spontanément ou être induit par un promoteur tumoral comme les lipides alimentaires, les hormones ou même une inflammation (une source importante de production de ROS). Ces facteurs vont permettre le maintien du caractère immortel de la cellule lors de sa multiplication. Les cellules pré-néoplasiques ont une apparence externe modifiée, perdent leur fonction originale, et se différencient en adoptant de nouvelles propriétés.

La dernière phase de propagation (progression) au cours de laquelle les cellules pré-néoplasiques évoluent en cellules néoplasiques ou cancéreuses correspond à un emballement du processus tumoral dû à l'incapacité de l'organisme de reconnaître comme anormales les cellules cancéreuses, à la persistance du facteur causal ou à des perturbations dans les mécanismes de défense (systèmes de réparation de l'ADN permettant, par exemple, l'excision des bases oxydées induites par une augmentation du stress oxydatif). Une fois formées, les tumeurs malignes constituées d'un nombre considérable de cellules peuvent envahir les tissus avoisinants ou essaimer vers d'autres organes et former des tumeurs secondaires appelées métastases <sup>(72)</sup>.

#### **IV. Mécanismes physiologiques des antioxydants dans la prévention du cancer**

##### **IV.1. Antioxydants**

Le terme d'antioxydants est employé pour caractériser un ensemble de substances ou composés, de natures diverses, dont la caractéristique commune est de s'opposer ou de contrôler l'accumulation des ROS au niveau cellulaire. Cette propriété leur permet d'agir directement ou indirectement en tant que moyen de défense contre les espèces réactives de l'oxygène <sup>(73)</sup>.

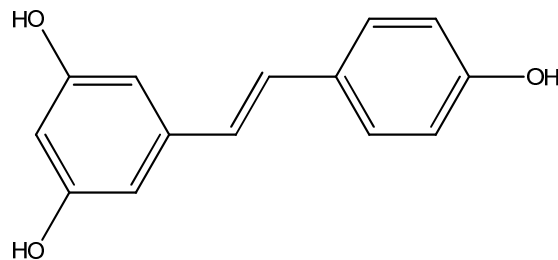
Expérimentalement, il a été bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant les ROS, mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en stimulant les gènes récessifs du cancer et en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs <sup>(74)</sup>.

Les polyphénols regroupent une grande diversité de composés chimiques, qui se distinguent par la nature de leur squelette carboné et par une multitude de propriétés et d'action pharmacologiques bénéfiques <sup>(75)</sup>. Les propriétés antioxydantes qu'ils manifestent sont souvent mises en avant pour rendre compte de ces effets bénéfiques.

Tout d'abord, le pouvoir antiprolifératif des dérivés polyphénoliques a été étudié sur de nombreuses lignées tumorales cellulaires. L'inhibition de la prolifération cellulaire fait intervenir plusieurs mécanismes d'action tels que des modifications de la **transduction** des signaux engendrés par les facteurs de croissance ou les hormones, la liaison avec les récepteurs œstrogéniques présents sur certaines lignées de cellules tumorales, le blocage du cycle cellulaire en différents points et la stimulation de l'apoptose <sup>(76)</sup>. L'implication des dérivés polyphénoliques dans les processus de régulation du cycle cellulaire peut avoir des répercussions sur l'induction de l'apoptose : **induction** de la protéine p53 <sup>(77)</sup>, modulation des protéines Bcl2 et Bax <sup>(78)</sup>.

### IV.2 Le Resvératrol comme cible thérapeutique très prometteuse dans la prévention et le traitement du cancer

#### IV.2.1 Présentation générale



**Figure 6.** *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene ou *trans* resvératrol

---

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) (Figure 6) est un polyphénol de la famille des stilbènes, constitué par deux noyaux phénoliques reliés par une liaison éthylénique. C'est une phytoalexine qui a été isolée pour la première fois des racines du *Veratrum glandiflorum* O par Loes en 1940, puis des racines du *Polygonum cuspidatum* en 1963. Actuellement, d'autres plantes ont été identifiées comme source de resvératrol telles que les raisins rouges, les cacahouètes, etc.

Cependant, ce n'est qu'au cours des années quatre-vingt que les premières propriétés thérapeutiques du resvératrol furent révélées lorsqu'une équipe de chercheurs a remarqué que des racines séchées de renouée du Japon (*Polygonum cuspidatum*), utilisées depuis des siècles par les médecines traditionnelles japonaise et chinoise dans le traitement de tout un éventail de maladies incluant des maladies fongiques, des allergies, différentes inflammations de la peau et des hyperlipidémies, avaient comme principaux principes actifs le resvératrol et ses glucosides <sup>(79)</sup>.

### **IV.2.2 Potentiel thérapeutique du resvératrol**

En 1985, des chercheurs ont découvert l'activité métabolique clé du resvératrol <sup>(80)</sup>. En travaillant sur des leucocytes de rats, ils ont montré que le resvératrol possédait une puissante capacité à inhiber la production d'eicosanoïdes. Ceux-ci sont des composés à 20 atomes de carbone comprenant des prostaglandines, des thromboxanes et des leukotriènes, qui interviennent dans les réactions inflammatoires et l'agrégation plaquettaire.

Depuis, plusieurs scientifiques ont concentré leurs travaux sur les activités thérapeutiques du resvératrol. A ce jour, plus de 4000 études ont mis à jour les propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoires, anti-infectieuses, cardioprotectives, anti-aggrégantes, antioxydantes, immunostimulantes, antidiabétiques et neuroprotectrices, etc... de ce composé.

De part ses multiples propriétés thérapeutiques et suite aux résultats très prometteurs rapportés au cours de la première conférence internationale qui s'est déroulée en septembre 2010 sur le resvératrol, ce dernier peut être considéré actuellement comme l'une des molécules d'avenir fondant le plus d'espoir non seulement dans la prévention mais également dans le traitement de nombreuses pathologies tel que le cancer.

#### **IV.2.2.1. Prévention des maladies cardiovasculaires**

Le resvératrol interfère avec de nombreux mécanismes à l'origine des maladies cardiovasculaires. En effet, grâce à son puissant pouvoir antioxydant, il protège les lipides de la dégradation par la peroxydation et inhibe fortement la synthèse par les plaquettes de la thromboxane dont le rôle est particulièrement important dans le développement des maladies cardio-vasculaires <sup>(81)</sup>.

Des études récentes <sup>(82, 83)</sup> ont également montré, chez des sujets en bonne santé, que la supplémentation en trans-resvératrol augmentait la production d'oxyde nitrique, un composant essentiel dans le bon fonctionnement du cœur et des artères.

### **IV.2.2.2. Une activité anti-inflammatoire**

Des chercheurs ont rapporté que le resvératrol inhibait la libération des cytokines pro-inflammatoires et ont démontré son efficacité dans le traitement de l'inflammation provoquée par une lésion de la moelle épinière <sup>(84)</sup>.

### **IV.2.2.3. Resvératrol et cerveau**

Dans une étude préliminaire, des chercheurs de l'université du Missouri ont montré que le resvératrol protégeait le système nerveux central du stress oxydatif et stoppait l'oxydation des particules de lipoprotéines qui initialisent la mort des cellules neuronales conduisant à la manifestation possible de la maladie d'Alzheimer <sup>(85)</sup>.

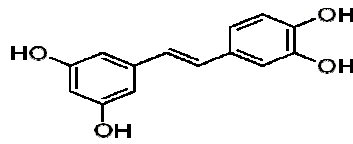
### **IV.2.2.4. Resvératrol et longévité**

Dans un rapport largement médiatisé par Howitz et son groupe en 2003 <sup>(86)</sup>, des chercheurs de la Harvard Medical School et les laboratoires de recherche Biomol ont démontré que le resvératrol activait un « gène de longévité » dans la levure, ce qui en augmentait la durée de vie de 80%.

### **IV.2.2.5. Prévention des multiples étapes de la carcinogenèse**

Les propriétés anticancérogènes du resvératrol n'ont été mises en évidence que très récemment. C'est le premier composant naturel capable de bloquer ou d'inhiber diverses étapes du développement d'un cancer et, cela, dans différents types de cancers. Il est efficace dans les trois phases du processus du cancer : initiation, promotion et progression.

En effet, une étude récente <sup>(87)</sup> montre que l'organisme convertit le resvératrol en un agent anticancéreux, le piceatannol (Figure 7), capable de cibler des cellules cancéreuses sans léser les cellules saines. De plus, associé à des cytokines naturelles (TNF), il pourrait être une alternative plus efficace et moins toxique dans le traitement clinique du cancer <sup>(88)</sup>.



**Figure 7.** Piceatannol

Par ailleurs et à une dose facilement obtenue par la seule alimentation, le resvératrol inhibe la croissance de cellules cancéreuses du sein et bloque l'effet promoteur de croissance de l'acide linoléique <sup>(89)</sup>. Il diminue également de façon prononcée le nombre et la taille des lésions précancéreuses au niveau colique <sup>(90, 91)</sup>.

Enfin, et sans être exhaustif, le resvératrol peut exercer une activité chemopréventive sur le cancer du poumon en réduisant la formation des métabolites cancérigènes tels que le benzopyrene <sup>(92)</sup>. Aussi, il semble impliqué dans l'activation du système immunitaire <sup>(93)</sup> et joue un rôle important dans la suppression de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose au sein des tumeurs pancréatiques <sup>(94)</sup> et du myélome multiple humain <sup>(95)</sup>.

### **IV.2.3. Mécanismes anticancéreux du resvératrol**

#### **IV.2.3.1. Effet antioxydant**

Le resvératrol présente des actions antimutagènes et antioxydantes importantes. Il inhibe la formation de radicaux libres ainsi que l'apparition de dommages oxydatifs causés à l'ADN et qui sont à l'origine du développement du cancer. Le resvératrol participe, également, à la prévention des pathologies en diminuant significativement les marqueurs du stress oxydatif comme l'albumine glyquée dans le sérum et la 8-hydroxyguanosine dans les urines.

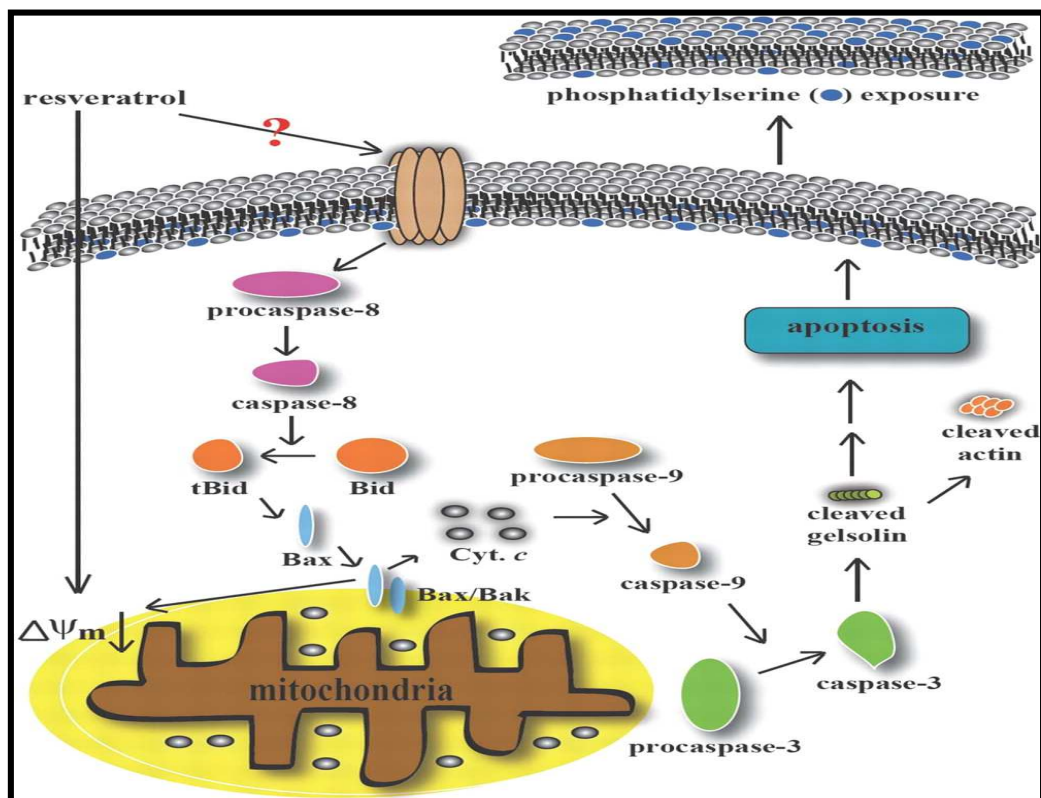
#### **IV.2.3.2. Inhibition du processus inflammatoire**

Jang et ses collaborateurs <sup>(96)</sup> ont rapporté que le resvératrol s'opposait à l'action d'un composant qui favorise la croissance des cellules cancéreuses, l'acide linoléique, réduisant ainsi l'activité des cyclooxygénases, des prostaglandines et des leucotriènes qui favorisent le processus inflammatoire, l'angiogenèse tumorale et la carcinogénèse.

#### IV.2.3.3. Altération du cycle cellulaire et apoptose

Parmi les autres mécanismes par lesquels le resvératrol exerce des propriétés anti-tumorales, on trouve l'induction de l'apoptose. En effet, les travaux de Yongjun Li et coll. en 2009 <sup>(97)</sup>, ainsi que ceux de Jing Cui en 2010 <sup>(98)</sup> démontrent que le resvératrol a la capacité non seulement d'augmenter l'expression des protéines Bax proapoptotiques, qui sont les promoteurs de la mort cellulaire programmée, mais également de diminuer la régulation de la survivine, des Bcl-2, Bcl-x et des protéines anti-apoptotiques qui sont impliquées dans la prolifération et l'angiogénèse tumorale.

Cela a pour conséquences la libération du cytochrome C mitochondrial et une activation des caspases 9 et 3, ce qui est à l'origine de l'induction de l'apoptose au sein des cancers pulmonaires, épithéliaux, pancréatiques, mammaires, hépatiques, prostatiques et œsophagiques (Figure 8).



**Figure 8.** Rôle du resvératrol dans l'induction de l'apoptose <sup>(99)</sup>



Le resvératrol possède également des propriétés antiprolifératives importantes sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses <sup>(100, 101)</sup>, tout comme il provoque des blocages au niveau des phases G0/G1 et G2/M <sup>(102, 103)</sup>.

### **V. Les inhibiteurs des centrales énergétiques comme nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse**

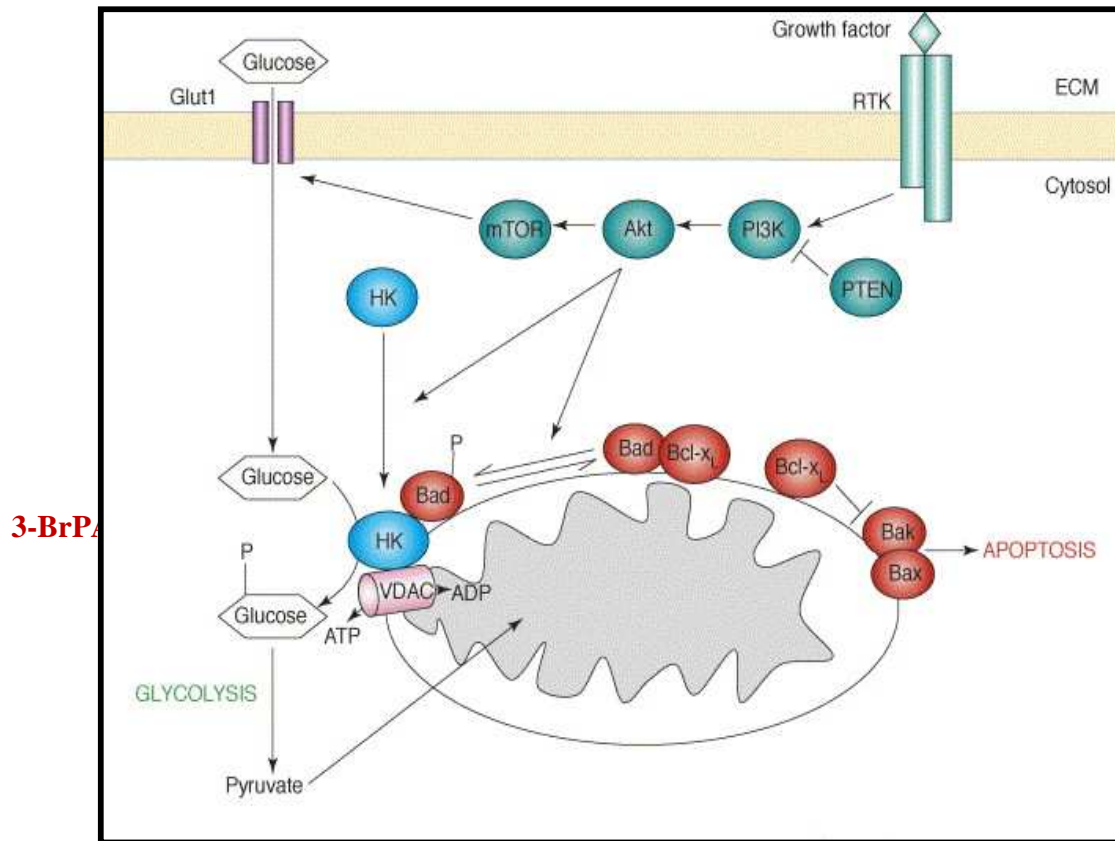
#### **V.1. Généralités**

Contrairement à la plupart des cellules saines qui puisent leur énergie en métabolisant le glucose ou les acides gras, et où les mitochondries sont les principaux producteurs d'ATP (>90%), les cellules cancéreuses fabriquent la majorité de leur ATP en métabolisant directement le glucose en acide lactique, même en présence d'oxygène (effet Warburg) <sup>(104)</sup>. L'acide lactique, déchet de cette transformation, est libéré dans la matrice extracellulaire où le pH diminue. Les cellules normales sont ainsi soumises à une agression chimique de la part des cellules tumorales, ce qui les affaiblit et les détruit, laissant la place à l'expansion de la tumeur. De cette manière, la cellule tumorale peut croître et se développer même en l'absence d'oxygène. De plus, par ses métastases, la cellule tumorale prélève le sucre présent dans le pool sanguin pour continuer la production de son ATP et appauvrir en nutriments les cellules saines.

Les nouvelles stratégies thérapeutiques consistent, de ce fait, à détruire ou à prévenir les cancers, en ciblant leurs usines de production d'énergie, c'est à dire, "les centrales énergétiques". Dans ce contexte, certains inhibiteurs énergétiques ont été proposés comme des agents potentiellement anticancéreux contenu de leur efficacité dans le traitement de différents types de cancers <sup>(105-110)</sup>.

#### **V. 2. Mécanismes anticancéreux du 3-BrPA**

La caractéristique principale des cellules cancéreuses est l'augmentation de la glycolyse anaérobie. Là est l'intérêt considérable du 3-BrPA. En effet, ce dernier, de part son analogie structurale avec l'acide lactique, a la capacité d'interrompre la production glycolytique d'ATP dans les cancers à croissance rapide en inhibant l'hexokinase (HK) <sup>(111,112)</sup> (Figure 9).



**Figure 9.** Inhibition de l'hexokinase par le 3-BrPA <sup>(113)</sup>

Nelson a signalé en 2002 que les cellules cancéreuses hépatiques sont réduites à 10%, sans dommage apparent au niveau des cellules saines, à la suite de la prise d'une dose unique du 3-BrPA, ce qui suggère que ce dernier possède une sélectivité tumorale élevée et une faible toxicité <sup>(114)</sup>. Un autre groupe de chercheurs a précisé que les cellules cancéreuses qui présentaient une sensibilité moindre aux agents chimiothérapeutiques, pourraient être efficacement détruites par inhibition de la glycolyse en utilisant le 3-BrPA <sup>(115)</sup>.

Une étude récente a rapporté que le 3-BrPA inhibait significativement la prolifération de la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7 en fonction du temps <sup>(116)</sup>. Les cellules MCF-7 exposées au 3-BrPA ont montré une diminution de l'expression de la Bcl-2 et du mutant p53, un processus largement associé au programme de signalisation de la mort cellulaire programmée.

### **V.3. Impact de l'acidification intracellulaire par le CHC dans l'inhibition de la production énergétique au sein de la cellule tumorale**

Le passage du pyruvate et du lactate à travers les membranes cellulaires et les membranes internes mitochondriales s'effectue à l'aide des MCTs <sup>(17)</sup>. Des études *in vitro* <sup>(35,107, 117, 124, 125)</sup> ont révélé que l'approche qui consiste en l'inhibition des MCTs, situés au sein de la membrane plasmique et chargés de véhiculer le lactate vers le milieu extracellulaire, par certains agents tel que le CHC, peut induire une accumulation du lactate au cœur de la cellule tumorale et une réduction du pH intracellulaire, favorisant ainsi l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire <sup>(118)</sup>.

De plus, les résultats très récents de Tanaka et collaborateurs (2011) <sup>(119)</sup> et ceux de Diers et son groupe (2012) <sup>(120)</sup> démontrent que le mécanisme qui consiste à cibler la libération du lactate et à inhiber la consommation du pyruvate, en utilisant le CHC, a un potentiel clinique important sur le développement des tumeurs gliales et mammaires, respectivement. Par ailleurs, l'efficacité de l'inhibition des MCTs par le CHC, sur des modèles de cancer du sein et de la prostate a également été évaluée par des études *in vivo* chez la souris <sup>(120,121)</sup> validant ainsi cette stratégie comme très prometteuse dans le traitement du cancer.

Par conséquent, suite aux données très encourageantes qui ont été apportées par ces récentes recherches dans le traitement du cancer, il serait nécessaire, aujourd'hui, de développer davantage ces résultats par des études plus approfondies, permettant de mettre en évidence l'impact des mécanismes d'acidification cellulaire dans le déclenchement du processus apoptotique.

**CHIMIE**  
**SYNTHESE ORGANIQUE**

Pour bien comprendre les travaux que nous avons effectués en synthèse organique, il est utile de préciser le cadre général dans lequel ces travaux ont été réalisés ainsi que les objectifs qui leur ont été assignés. Les propriétés du resvératrol, notre molécule de référence, sont nombreuses et variées, comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce manuscrit. La principale caractéristique qui a retenu notre attention est que cette substance, dans toutes ses activités biologiques, ne présente aucun effet secondaire indésirable connu à ce jour. De plus, dans le domaine du cancer, son inhibition de la croissance des cellules tumorales n'affecte en rien les cellules saines, au contraire de toutes les substances antitumorales connues en usage dans le passé et dans le présent.

Ces observations nous ont fait émettre trois hypothèses :

1°. Si le resvératrol contribue de manière bénéfique non seulement à la préservation de la santé, mais aussi à son maintien et cela, sans effets adverses, son association aux traitements anticancéreux pourrait déboucher sur une diminution des doses administrées et, par conséquent, sur une réduction de la gravité des effets secondaires des anticancéreux classiques.

2°. La synthèse ciblée de quelques dérivés du resvératrol pourrait conduire à la mise au point de substances à activité biologique plus ample que celle du composé de départ et, dans le meilleur des cas, ces substances seraient dotées d'une activité antitumorale plus sélective que celle des anticancéreux connus à ce jour.

3°. Enfin, il découle de ces deux hypothèses l'intérêt de vérifier si l'association de ces dérivés au traitement antitumoraux classiques pouvait servir de test pour évaluer leur impact sur le traitement lui-même, ainsi que sur la contribution de ces nouvelles substances à la chimiothérapie ciblée.

Sur cette base, notre travail ne vise pas en priorité la synthèse de molécules nouvelles ou originales, mais dans un premier temps, il a pour objectif de disposer du resvératrol pour pouvoir vérifier la validité de nos hypothèses. Ensuite, cette substance servira de matière première pour élaborer deux composés originaux qui contribueront, eux aussi, à la vérification de ces mêmes hypothèses. Enfin, l'association resvératrol-inhibiteurs des centrales énergétiques cellulaires est intéressante afin de disposer d'une vision globale susceptible de nous orienter dans les travaux futurs.

Par conséquent, cette thèse n'est pas une thèse de chimie pure, mais plutôt une thèse de chimie organique appliquée à la résolution d'une problématique biologique, justifiant par là sa dénomination de doctorat de chimie bio organique. Les substances synthétisées ainsi que leurs propriétés sont largement connues dans la littérature. Par conséquent, nos identifications se feront par comparaison avec les données spectrales et les propriétés physico-chimiques trouvées dans les documents de spécialité. Dans cette partie, nous allons décrire trois synthèses : la première est celle de l'acide 3-bromopyruvique, substance qui possède une analogie structurale avec l'acide lactique et qui, selon Warburg, possède la propriété de court-circuiter le processus énergétique de cellules tumorales<sup>(104)</sup>.

### I. Synthèse de l'acide 3-bromopyruvique (3-BrPA)

Elle s'effectue par un processus très simple conformément au schéma suivant :

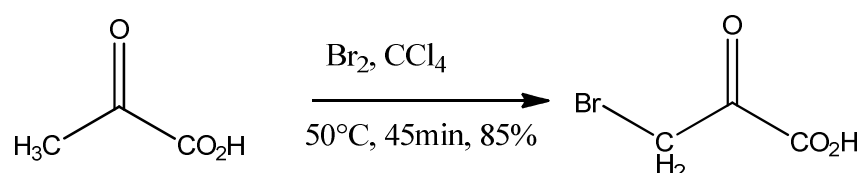


Schéma 3. Synthèse de l'acide 3-bromopyruvique (3-BrPA) [1]

Le traitement de l'acide pyruvique par le brome dans le CCl<sub>4</sub> en présence de l'acide sulfurique conduit à un mélange qui est débarrassé du solvant pour laisser une pâte. Cette dernière est mise à sécher dans un dessiccateur sous vide muni de pastilles de KOH que l'on change chaque jour jusqu'à la formation d'un solide, signe de la fin du séchage. Lorsque le séchage est terminé, on obtient un solide légèrement marron fondant à 80°C (lit. 79-82°C)<sup>(122)</sup> avec un rendement de 85%. Son spectre RMN est très simple, car constitué uniquement de deux singulets à 5,98 et 10,28 ppm.

### II. Synthèse de l'acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (ACCA)

La deuxième synthèse est celle de l'ACCA. Dans la littérature, il est dit que cette substance empêche la sortie de l'acide lactique produit au sein de cellules tumorales, ainsi que son épanchement dans le milieu extérieur. Ce phénomène est vital pour la prolifération tumorale et le développement des métastases. En effet, un pH acide est nocif pour les cellules saines, mais pas pour les cellules tumorales.

Ces dernières survivent dans un milieu acide et fragilisent les cellules saines. De plus avec ce pH, les cellules tumorales n'ont pas la capacité de se répandre dans l'organisme <sup>(105)</sup>. Par conséquent, il était important de disposer de ce composé pour vérifier une synergie éventuellement bénéfique avec les traitements antitumoraux existant.

L'ACCA est synthétisé selon le schéma décrit ci-dessous et le processus commence par une estérification de l'acide cyanoacétique en présence d'acide sulfurique.

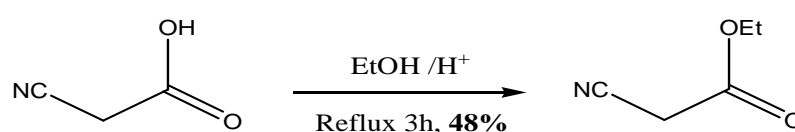


Schéma 4. Synthèse du cyanoacétate d'éthyle [2]

Au cours de cette réaction, il est important d'utiliser une quantité catalytique d'acide afin d'éviter le passage du cyanoacétate d'éthyle au malonate d'éthyle correspondant. A la fin de la réaction et après élimination de l'excès d'alcool et neutralisation de l'excès de l'acide avec du carbonate de sodium, le mélange réactionnel est séché puis distillé sous vide pour donner l'ester [2] attendu avec un rendement de 48% (Ebullition 97-98°C/16mmHg). Ce produit montre les caractéristiques spectrales suivantes dans l'infra rouge : disparition de la bande caractéristique du carboxyle avec apparition de la bande du carbonyle de l'ester à 1745  $\text{cm}^{-1}$ , tout comme le maintien de la bande caractéristique de la triple liaison CN vers 2200  $\text{cm}^{-1}$ .

Par la suite, cet ester est engagé dans la réaction qui vise l'obtention de l'ACCA comme illustré ci-dessous.

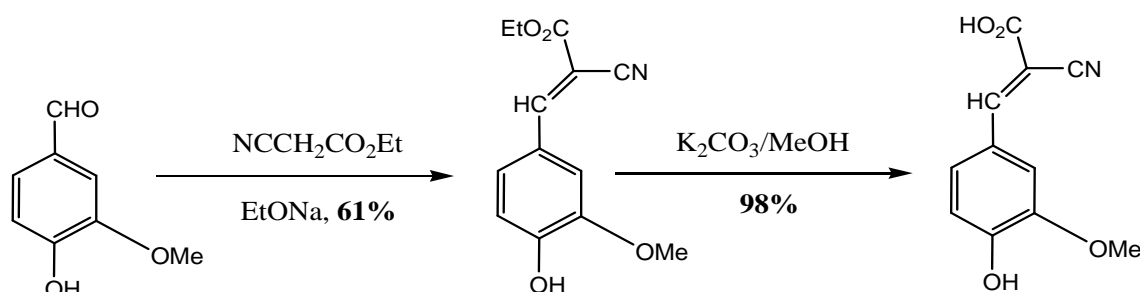


Schéma 5. Synthèse du  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamate d'éthyle (ACCE) [3] et de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (ACCA) [4]

On prend soin de disposer de réactifs bien anhydres pour la suite de cette synthèse. Dans une première étape, la mise en présence de l'ester cyanoacétique et de la vanilline dans l'éthanol anhydre, avec l'éthanolate de sodium comme catalyseur conduit à l' $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamate d'éthyle [3] avec un rendement de 61%. Le spectre infra rouge permet de confirmer le maintien du groupe cyano dont on voit la bande d'absorption vers  $2200\text{ cm}^{-1}$ .

L'hydrolyse de la fonction ester pour arriver à l'acide correspondant est effectuée avec l'hydroxyde de lithium ou le carbonate de potassium dans le méthanol et à température ambiante. Le produit obtenu [4], avec un rendement de 98%, est identifié par les techniques classiques. En effet, la RMN dans le  $\text{CDCl}_3$ , montre le signal de l'acide à 9,82 ppm ainsi que celui du proton vinylique à 7,60 ppm.

### III. Synthèse du resvératrol

Enfin, la troisième partie est consacrée à la synthèse du resvératrol. La structure de ce composé est donnée ci-dessous et son analyse rétrosynthétique fait ressortir deux synthons essentiels, fragment **A** et fragment **B**, qui sont à la base de notre schéma général de travail. Il s'agit de dérivés aldéhydique et haloalkyle du crésol et du phénol.

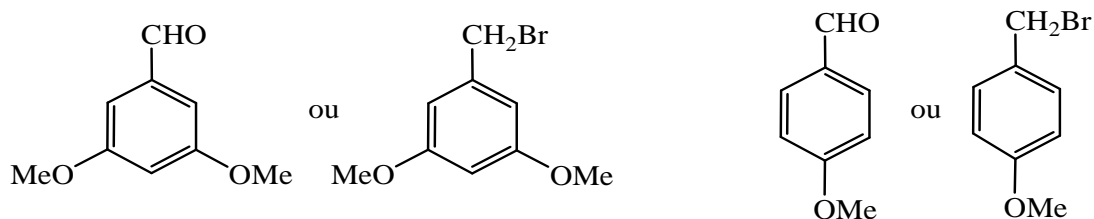
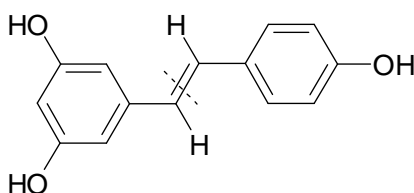


Schéma 6. Fragments A et B du resvératrol



Tous ces synthons sont des produits connus dans la littérature. Ces derniers peuvent aisément être engagés dans une synthèse de Wittig ou d'Arbusov pour aboutir à la double liaison souhaitée entre les deux cycles phénoliques. Pour cela, la synthèse a commencé par la préparation de quelques précurseurs indispensables qui peuvent être obtenus par les séquences représentées dans le schéma suivant.

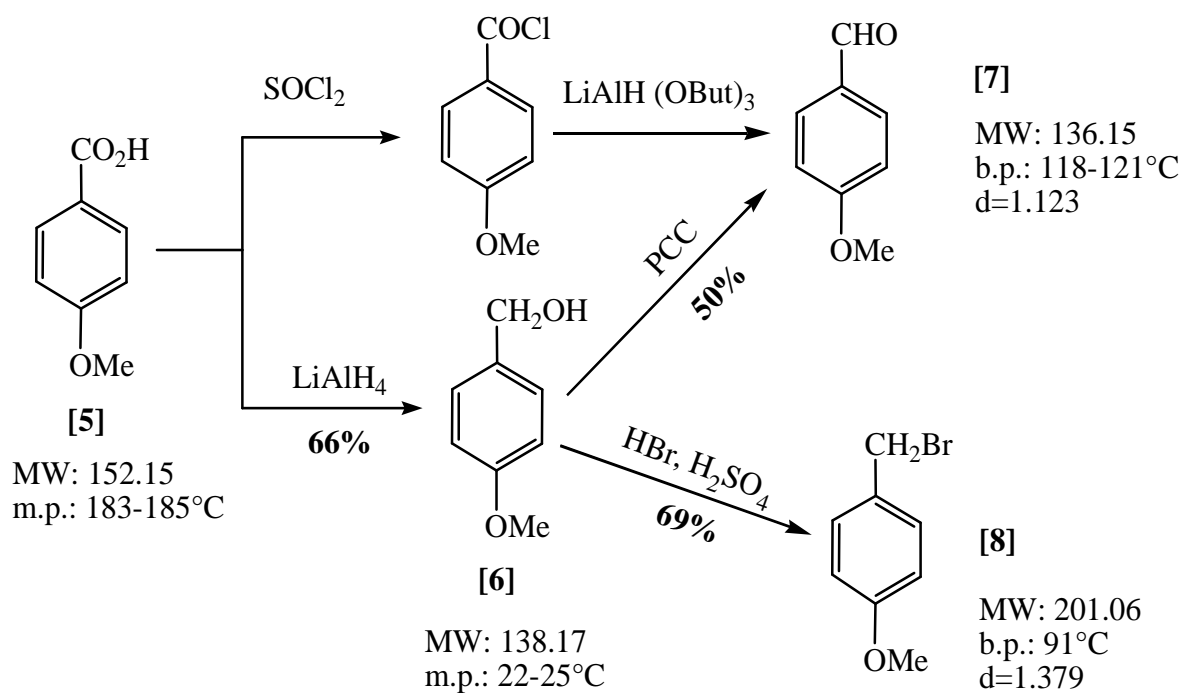


Schéma 7. Synthèse des précurseurs du fragment B

Il est bien évident que seules les séquences réalisables en fonction des disponibilités de notre laboratoire seront retenues.

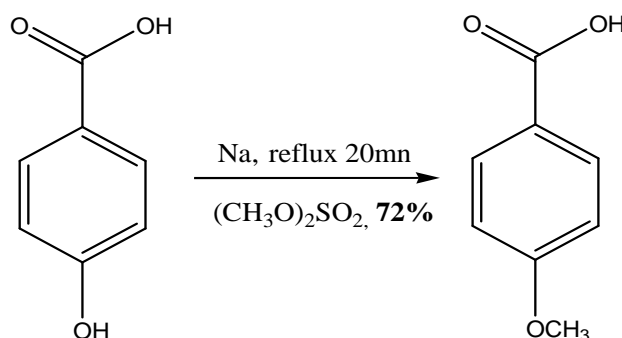


Schéma 8. Synthèse de l'acide p-méthoxybenzoïque [5]

Le premier précurseur préparé est l'acide p-méthoxybenzoïque [5]. Il est obtenu par méthylation de l'acide correspondant avec le diméthylsulfate en présence de sodium. Le spectre infra rouge indique la présence des bandes C-O-C du groupement méthoxy vers  $1020\text{ cm}^{-1}$ , tandis que son point de fusion correspond à celui décrit dans la littérature<sup>(123)</sup>.

Ensuite, [5] est engagé dans une réaction de réduction avec  $\text{LiAlH}_4$  pour fournir un liquide blanchâtre qui se solidifie au repos à température ambiante et qui a une température de fusion de  $25^\circ\text{C}$ . Les caractéristiques spectrales IR de ce solide montrent clairement la disparition du groupe carbonyle de l'acide à  $1712\text{ cm}^{-1}$  et l'apparition des vibrations du groupement hydroxyle vers  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Ces résultats confirment bien la conversion de [5] en alcool p-méthoxybenzylique [6].

Selon le même protocole, nous avons aussi préparé le p-méthoxybenzaldéhyde [7] qui a été obtenu avec un rendement de 50%. Ce composé se conserve difficilement ; c'est pour cela qu'il n'a pas été retenu pour la suite des opérations.

La troisième étape consistait à synthétiser le 1-bromométhyl-p-méthoxybenzène [8] en faisant réagir le composé [6] avec l'acide bromhydrique en présence d'acide sulfurique. La réaction aboutit à la formation d'un liquide jaunâtre avec un rendement de 69%. En IR, la vibration de la liaison C-Br apparaît vers  $700\text{ cm}^{-1}$  et la disparition de la bande OH de l'alcool indiquent que le produit obtenu correspond au 1-bromométhyl-p-méthoxybenzène [8].

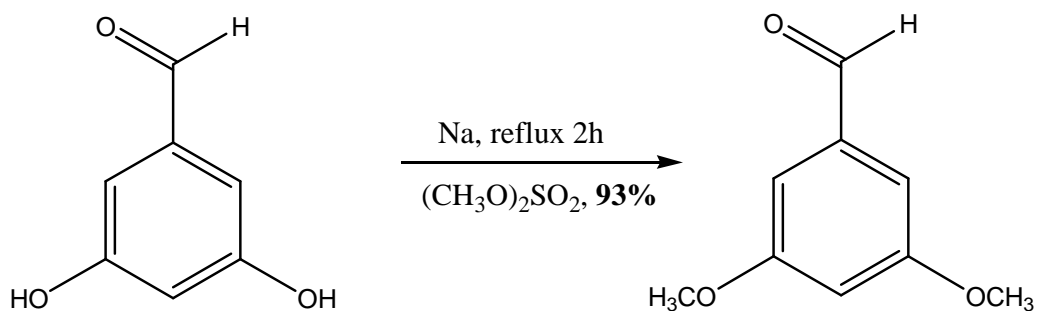


Schéma 9. Synthèse du 3,5-diméthoxybenzaldéhyde [10]

Le 3,5-diméthoxybenzaldéhyde [10] est obtenu par méthylation du 3,5-dihydroxybenzaldéhyde avec le diméthylsulfate en présence de sodium. La disparition de la bande OH et l'apparition de celle du carbonyle correspondant à  $1683\text{ cm}^{-1}$  permettent de l'identifier facilement.

Le processus que nous avons adopté est celui d'un brevet US qui nous a permis d'aboutir au resvératrol (124).

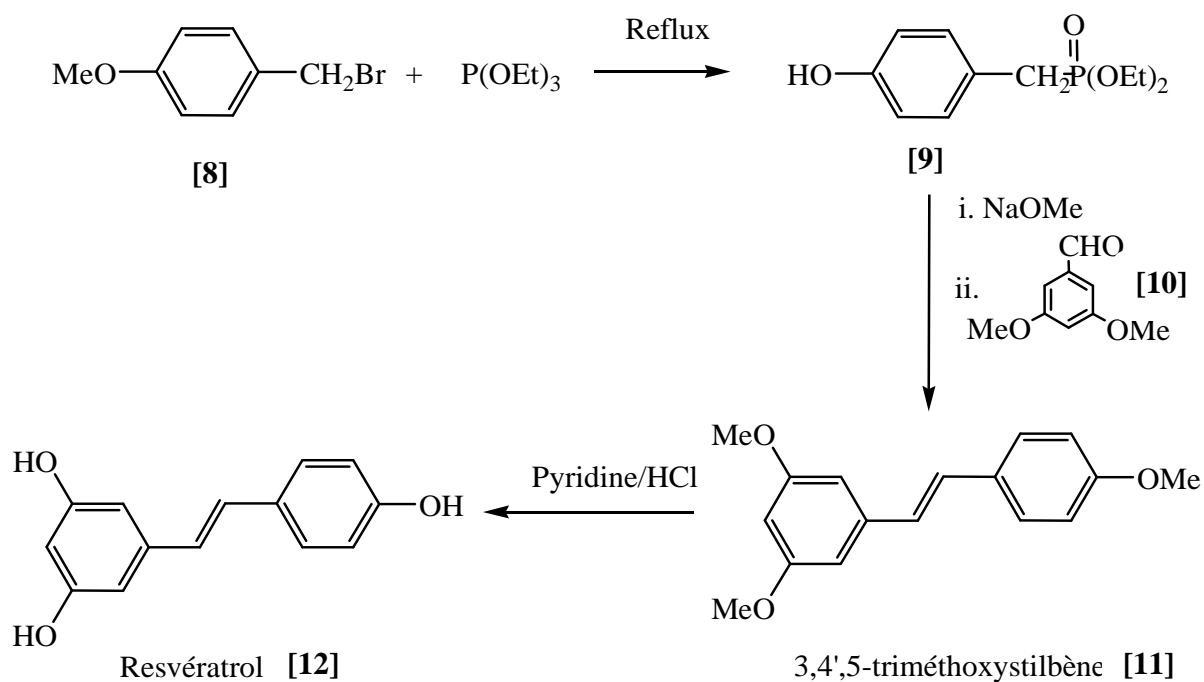


Schéma 10. Synthèse du resvératrol [12]

Le 1-bromométhyl-p-méthoxybenzène [8] est traité avec le triéthylphosphite à 165 °C pour produire le phosphonate [9]. Ce dernier a été choisi comme réactif intermédiaire, car il est bien connu que les phosphonates conduisent généralement à une double liaison de configuration *trans* lors de leur réaction avec les aldéhydes et cétones.

La condensation de [9] avec le 3,5 diméthoxybenzaldéhyde [10] en présence de NaOMe, aboutit à la formation du 3,4',5-triméthoxystilbène [11], un solide qui est essentiellement identifié d'abord grâce à son spectre  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,78 (s, 9H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,37 (t,  $J=2,10\text{Hz}$ , 1H, Ar), 6,64 (d,  $J=2,10\text{Hz}$ , 2H, Ar), 6,82 (d,  $J=8,70\text{Hz}$ , 1H), 6,85 (d,  $J=15,9\text{Hz}$ , 1H, =C-H), 7,00 (d,  $J=15,9\text{Hz}$ , 1H, =C-H), 7,35 (d,  $J=9,0\text{Hz}$ , 2H, Ar) et  $^{13}\text{C}$  RMN : 55,4 ; 99,7 ; 104,5 ; 115,8 ; 126,3 ; 128,1 ; 128,9 ; 129,7 ; 139,9 ; 155,9 ; 160,9.

Ce dernier est converti en resvératrol [12] par déméthylation avec le chlorure de pyridinium et le produit obtenu possède un point de fusion égal de 254°C. Le spectre  $^1\text{H}$  RMN dans le DMSO- $d_6$  du produit obtenu et recristallisé dans un mélange éthanol-eau (1 :9), montre les signaux suivants : RMN (300MHz) ( $\delta$ , DMSO- $d_6$ ): 6,13 (t,  $J=2,1\text{Hz}$ , 1H, Hp), 6,40 (d,  $J=2,10\text{Hz}$ , 2H, Ho), 6,73 (d,  $J=8,40\text{Hz}$ , 2H, Ho'), 6,82 (d,  $J=16,5\text{Hz}$ , 1H, =C-H), 6,94 (d,  $J=16,5\text{Hz}$ , 1H, =C-H), 7,40 (d,  $J=8,70\text{Hz}$ , 2H, Hm), 9,21 (s, large, 2H, OH), 9,59 (s, large, 1H, OH). Pour sa part, la RMN  $^{13}\text{C}$  donne les signaux suivants : 99,1 ; 101,8 ; 104,3 ; 115,5 ; 125,7 ; 127,9 ; 128,1 ; 139,3 ; 157,2 ; 158,5. Le spectre IR montre les principales bandes suivantes : 3285 (OH), 1606-1444 (doublet aromatique), 1326 (déformation O-H), 831  $\text{cm}^{-1}$  (phényle bi et trisubstitué).

#### IV. Extraction du resvératrol

##### IV.1. A partir d'un produit commercial (espèce *Polygonum cuspidatum*)

La forme commerciale du resvératrol, notamment Resvératrol BIOVEA, est constituée par des comprimés dosés à 250mg comportant également des additifs dont il fallait se débarrasser pour disposer du produit pur. La forme *trans* du resvératrol étant la plus active, et comme elle est susceptible d'isomériser en configuration *cis* sous l'effet de la lumière, l'extraction s'effectue dans l'obscurité pour empêcher ce processus. Après un broyage manuel des comprimés, l'extraction s'effectue à chaud dans l'éthanol pur. Après évaporation du solvant, le produit est récupéré sous forme d'une poudre beige qui est recristallisé dans un mélange éthanol/eau (1:9 v/v).

. Les caractéristiques spectrales identifient clairement le resvératrol fondant à 250°C. Le spectre IR montre les bandes caractéristiques de 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$  et 3200  $\text{cm}^{-1}$  correspondant respectivement au doublet aromatique et aux OH phénoliques, Quant à la RMN dans le  $\text{CDCl}_3$ , elle indique les signaux des groupements OH à 7,35 et 7,38 ppm ainsi que ceux des protons vinyliques à 6,95 ppm confirmant la présence de l'isomère *trans* grâce à une constante de couplage de 16Hz.

#### IV.2. A partir de la peau des raisins rouges (espèce *vitis vinifera*)

Le resvératrol existe dans la nature sous forme d'un glucoside. Pour éviter son isomérisation, toutes les opérations d'extraction et de conservation sont effectuées à l'abri de la lumière.

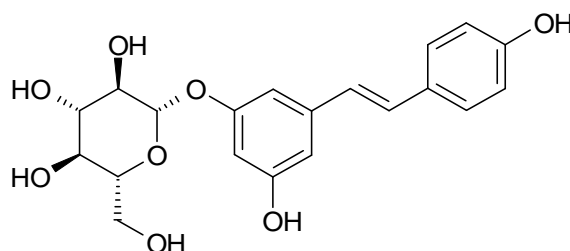


Schéma 12. Glucoside du resvératrol

Toujours à l'abri de la lumière, les peaux de raisin sont décongelées à température ambiante. L'extraction s'effectue également avec l'éthanol pur et le filtrat est centrifugé avant d'être analysé par HPLC. Il est utile de signaler que la teneur de la vigne en resvératrol dépend de la quantité des phytosanitaires qui lui sont appliqués pour la protéger : plus le traitement est faible, plus grande sera la teneur en resvératrol. Cela signifie que le resvératrol constitue un phytosanitaire naturel que la vigne sécrète pour se protéger des agressions extérieures (pucerons, champignons et autres agents agressifs).

En Algérie, la vigne étant généralement traitée, nous ne pouvons pas nous attendre à une teneur significative, au point de prendre cette plante comme source rentable de resvératrol. En effet, comme nous avons pu le constater par HPLC, on n'obtient que des traces de produits après extraction de la pulpe, ce qui rend difficile son isolation. Par conséquent, la HPLC ne peut servir que d'outil d'identification qualitative. En présence d'un étalon, le chromatogramme de l'extrait laisse apparaître le pic du *trans*-resvératrol avec un temps de rétention de 40,07mn, la détection étant faite dans l'UV à 306 nm.

# **ETUDE BIOCHIMIQUE**

## **I. Matériels et méthodes**

Les listes des réactifs et du matériel sont situées dans les annexes du document.

### **I.1. Les lignées cellulaires, les réactifs et les milieux de culture**

La lignée cellulaire épithéliale humaine immortelle du sein HBL100 ainsi que les lignées humaines de l'adénocarcinome mammaire MCF-7, T47D et MDA-MB 231 proviennent de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). HBL-100 et MDA-231 (harboring mutant p53), T47D (harboring mutant p53), et MCF-7 (harboring wt p53). Elles sont respectivement mises à croître dans le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) et MEM (Minimum Essential Medium Eagle). Les milieux de culture sont supplémentés avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. Le milieu MEM est supplémenté davantage de 0,1mM d'acides aminés non essentiels (NEAA) et de 10µg/ml d'insuline. Tous les milieux de culture et les suppléments ont été obtenus de Life Technologies (Saint Aubin, France). Le MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) et l'annexin V-PI staining kit proviennent de Calbiochem (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

2mM de la solution mère d'ACCA (l'acide alpha cyano-4-hydroxy-3-methoxycinnamique) sont préparés dans le dimethylsulfoxyde (DMSO) et conservés à -20°C. L'ACCA est ajouté aux cellules aux concentrations indiquées. En ce qui concerne le contrôle, la concentration de DMSO utilisée est  $\leq 0.1$  % (v/v). Les solutions sont stérilisées avec des filtres seringue de 0.22 µm et la solution mère est diluée dans un milieu sans sérum, à la concentration finale exigée.

Nous aimerions signaler que les produits de synthèse désignés **D1** et **D2** et qui interviennent dans la description des différents tests réalisés ont montré des résultats tellement prometteurs qu'ils pourraient déboucher sur des principes actifs originaux. De ce fait et pour des raisons compréhensibles, ni leur synthèse et encore moins leurs structures ne seront dévoilées.

## I.2. Culture cellulaire

### I.2.1. Caractéristiques des lignées cellulaires

Les caractéristiques des lignées humaines cancéreuses du sein utilisées au cours de ce travail sont mentionnées dans le tableau 1.

**Tableau 1. Caractéristiques des lignées cancéreuses**

Lignées cellulaires	Acronyme	Type de cancer	Origine
<b>MDA-MB-231</b>	M.D. Anderson Metastatic Breast	Carcinome ductal invasif	Métastase : effusion pleurale
<b>MCF-7</b>	Michigan Cancer Foundation -7	Carcinome ductal invasif	Métastase : effusion pleurale
<b>T47D</b>	—————	Carcinome ductal invasif	Métastase : effusion pleurale

### I.2.2. Décongélation des cellules

Les lignées humaines proviennent de l'American Type Culture Collection. Les cellules sont décongelées rapidement dans un bain-marie à 37°C jusqu'à ne laisser qu'un seul glaçon. Le contenu du cryotube (1ml) est transféré dans un tube de 15 ml contenant 9 ml de milieu froid, tout en aspirant et en refoulant à l'aide d'une pipette (afin d'homogénéiser la suspension et diluer le diméthylsulfoxyde (DMSO)). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 mn à 1000 rpm puis re-suspendues dans leur milieu (aspirations et refoulements avant d'être étalées dans des flasques. L'incubation s'effectue à 37°C, sous une atmosphère de CO<sub>2</sub> à 5%.

### I.2.3. Trypsination des cellules

Les cellules cancéreuses doivent être diluées quand elles sont à confluence. Pour cela, le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec une solution PBS diluée au dixième. Après l'ajout du volume de trypsine nécessaire, les cellules sont incubées pendant 5 min à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> (jusqu'à ce que les cellules soient bien décrochées et dissociées). Le volume nécessaire du milieu est additionné dans la flasque après l'incubation, afin de bloquer l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est transférée dans un tube pour une centrifugation de 5 mn à 1000 rpm et à température ambiante. Au bout de ce temps, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est re-suspendu dans le milieu cellulaire adéquat avant d'être dilué dans des flasques pour une nouvelle incubation.



### **I.3. Estimation de la viabilité cellulaire par exclusion du bleu trypan**

Le bleu trypan est un composé toxique qui pénètre dans les cellules. Les cellules vivantes sont capables d'expulser le bleu trypan dans le milieu extracellulaire grâce aux transporteurs d'ATP Binding Cassette (ABC). Ces protéines membranaires utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour expulser les molécules cytotoxiques hors de la cellule. Les cellules mortes, ne produisant plus d'ATP, sont incapables d'expulser le bleu de trypan et apparaissent donc de couleur bleue.

Les cellules ( $3 \times 10^5$ ) sontensemencées en plaques 6 puits : deux puits sont consacrés à chaque lignée (HLB100, MDA-MB 231, MCF-7 et T47D) et chaque lignée est traitée avec 0 et 50  $\mu\text{M}$  d'ACCA pour 1, 2, 3, 6 et 10j. Au bout de chaque période, les milieux sont éliminés et les cellules sont lavées 2 fois avec le PBS, trypsinées puis centrifugées à 1000 rpm pendant 5mn à température ambiante. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans les milieux de culture puis diluées à 10% en présence de bleu trypan (lui-même dilué à 10% dans le PBS). Les cellules vivantes excluant le bleu trypan sont comptées sous microscope optique sur une cellule de Malassez.

### **I.4. Mesure de la viabilité cellulaire par le test de clonogénicité**

Pour une étude aigüe du traitement, les cellules cancéreuses MDA-MB 231, MCF-7 et T47D sont d'abord incubées à 20% de confluence dans des boîtes de Pétri (BP) de 60 mm de diamètre. La formation des colonies est mesurée après traitement par différentes concentrations d'ACCA (0, 25, 200  $\mu\text{M}$ ) sur des cellules à 70% de confluence. Après 48h de traitement, les cellules sont trypsinées, centrifugées, re-suspendues dans leur milieu de culture puis énumérées sur cellules de Malassez. Elles sont de nouveau mises dans des BP de 100mm de diamètre à une faible densité 1000-2000 cellules/BP et les clones sont incubées pour 3 à 4 semaines (en triplicata). Le milieu de culture est renouvelé tous les 4 à 5 jours. Au bout de ce temps, les cellules sont fixées dans 50% d'éthanol et maintenues dans du bleu de Coomassie pour le comptage des colonies.

### **I.5. Mesure de la prolifération cellulaire par le 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide (MTT) assay.**

La mesure de la prolifération des cellules cancéreuses est réalisée grâce au MTT assay.

Ce test est basé sur la réduction du MTT par les déshydrogénases mitochondriales dépendantes du NADH ou du NADPH. Tandis que le MTT est de couleur jaune, le formazan, produit de la réaction, est de couleur violette. Les cellules mortes ne produisent pas de cristaux de formazan. L'intensité de la coloration violette est donc fonction de la proportion de cellules vivantes. En pratique, les lignées cellulaires cancéreuses sontensemencées dans des plaques de 96 puits à une concentration de  $1 \times 10^4$  cellules/puits dans leur milieu de culture.

Après 24h d'incubation, elles sont traitées avec les concentrations présentées dans les tableaux 2 et 3 pour 24 et 48h respectivement. Le contrôle est traité avec 0,1% de DMSO. Au bout de ce temps, les milieux sont éliminés et remplacés par 100  $\mu$ l de solution de MTT (5mg/mL) par puits. Après 3h d'incubation à 37°C, 100 $\mu$ L de SDS à 10% sont ajoutés et la lecture des plaques s'effectue par spectrophotométrie visible à 550 nm et 590 nm. Chaque essai a été effectué en double. Ce test de prolifération cellulaire est utilisé pour évaluer la cytotoxicité de nos produits sur les différentes lignées cellulaires.

**Tableau 2. Concentrations des produits utilisés dans le MTT assay, sur les lignées HBL100, MDA/MB 231, MCF-7 en fonction du temps et de l'ajout d'un traitement conventionnel (TC)**

T (H)	Produit	RES ( $\mu$ M)	ACCA ( $\mu$ M)	3-BrPA ( $\mu$ g/ml)	D1 ( $\mu$ M)	D2 ( $\mu$ M)
24	-TC	100	200	25	100	100
48	- TC	100	200	25	100	100
24	+TC	100	200	25	100	100
48	+TC	100	200	25	100	100

**Tableau 3. Concentrations de l'ACCA, utilisées dans le MTT assay, sur les lignées HBL100, MDA-MB 231, MCF-7 et T47D en fonction du temps**

T (h)	24						48					
C ( $\mu$ M)	0	25	50	100	150	200	0	25	50	100	150	200

### **I.6. Etude de l'apoptose par cytométrie en flux**

10<sup>6</sup> cellules/BP (Ø 35mm) des différentes lignées cellulaires MDA-MB 231, MCF-7 et T47D sont traitées avec 0 et 200µM d'ACCA pour 48h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Au bout de ce temps, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et récupérées après 5 mn de centrifugation à 1000 rpm et à température ambiante. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont re-suspendues dans le tampon pour une concentration finale de 5x10<sup>5</sup>/ml.

195µL de la suspension sont transférés dans un nouveau tube pour FACS et fixés avec 5µl de FluoresceinIsoThioCyanate (FITC) conjuguée à l'annexin V pendant 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, elles sont de nouveau lavées avec 1 ml de tampon (140 mM NaCl, 10 mM HEPES/NaOH, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) puis re-centrifugées à 1000 rpm. Après élimination du surnageant, 190µL de tampon sont additionnés et la suspension cellulaire est fixée avec 10µL d'iodure de propidium (IP) à 1µg/ml pendant 15 min à l'obscurité. L'activité apoptotique est analysée par le cytomètre en flux (BD FACS Canto).

### **I.7. Analyse de l'expression des MCT1, Bax et Bcl-2 par western Blot**

#### **I.7.1. Principe de la technique**

Le western blot est une méthode de protéomique utilisée pour détecter, par immunomarquage, une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique pour cette protéine. Après extraction, les protéines de l'échantillon sont séparées selon leurs masses moléculaires par électrophorèse au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) le plus souvent. Il s'agit alors de la technique SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

Les protéines sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) sous l'influence d'un champ électrique. Des accrochages non spécifiques entre les anticorps et certains constituants de la membrane existent par le fait d'interactions hydrophobes. Ces interactions vont produire un bruit de fond. En pratique, pour diminuer ce marquage aspécifique, un mélange contenant des protéines et des macromolécules (comme le lait) est appliqué sur la membrane avant l'incubation de l'anticorps (saturation des sites d'interactions non spécifiques).

Afin de caractériser la protéine d'intérêt, la membrane est ensuite incubée avec l'anticorps spécifique de cette protéine (anticorps primaire). Après une série de lavages, le complexe antigène-anticorps formé est reconnu par un deuxième anticorps dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire (anticorps secondaire). Cet anticorps secondaire est habituellement lié à la peroxydase qui, par ajout de luminol, permet l'identification de la protéine d'intérêt par chimiluminescence.

### **I.7.2. Modalités de traitement**

Les cellules ont été incubées en présence de 0 et 200  $\mu\text{M}$  d'ACCA pendant 48 h à 37°C, et sous 5%  $\text{CO}_2$ .

### **I.7.3. Lysats cellulaires**

Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, puis le tampon de lyse [Tris (pH 7.5), 50 mM; EGTA 5 mM; NaCl, 120 mM;  $\alpha$ -glycérophosphate 20 mM; Nonidet P-40 1%; Na pyrophosphate 15 mM; NaF 50 mM; Na orthovanadate 10 mM; fluorure de phénylméthylsulfonyl 0.5 mM; aprotinin 10  $\mu\text{g/ml}$ ; leupeptin 10  $\mu\text{g/ml}$ ; glycerol 20%] est déposé (500 $\mu\text{l}$ /BP) sur les cellules pendant 10 à 30 mn à 4°C. Le tapis cellulaire est gratté et les cellules sont recueillies puis centrifugées (12 000 rpm, 15mn à 4°C). Les lysats cellulaires sont dosés en protéines et échantillonnés par 50  $\mu\text{l}$  puis stockés à -80°C.

### **I.7.4. Dosage des protéines**

Le dosage des protéines dans les échantillons est réalisé par le kit Bio-Rad pour déterminer le volume de prise d'essai pour chaque échantillon afin d'obtenir la même concentration de protéines.

### **I.7.5. Electrophorèse par SDS-PAGE, transfert et immunodétection des protéines**

En présence de SDS, les protéines sont chargées négativement et migrent vers l'anode en fonction de leurs masses moléculaires, après application d'un champ électrique. 50  $\mu\text{g}$  de protéines sont mises en solution dans 6  $\mu\text{L}$  de tampon Laemmli 5X (9 mL de tampon Laemmli 5X contiennent : 0,4 g SDS ; 2,5 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; 5 mL glycérol ; 2 mg bleu de bromophénol). Le volume est alors ajusté à 30  $\mu\text{L}$  avec du PBS. Les échantillons ainsi que 5  $\mu\text{L}$  du marqueur de masse moléculaire, sont séparés par SDS-PAGE, et transférées à travers des membranes de nitrocellulose.

### **I.7.6. Migration**

Les gels de polyacrylamide (1mm d'épaisseur) sont coulés entre deux mini plaques de verre (protean II cell, Biorad). Compte tenu des poids moléculaires attendus de Bax (25KD) et Bcl-2 (26KD), la migration est réalisée dans un tampon de migration (25 mM Tris Base ; 192 mM glycine ; 0,1% SDS). Après 2h, la piste de migration est découpée (les puits et la partie gel de concentration).

### **I.7.7. Transfert**

La membrane PVDF est préalablement mouillée dans de l'éthanol pur puis, trempée dans l'eau jusqu'à totale réhydratation et rincée dans le tampon de transfert (25 mM Tris Base ; 192 mM glycine ; 0,03% SDS m/v) pendant 10 mn. Le transfert sur membrane PVDF (Bio-Rad, France) est réalisé à l'aide de la cuve de transfert (Bio-Rad). Après le transfert, la membrane PVDF est saturée pendant 2h à 4°C dans du TBS- Tween (5% de lait écrémé dans 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl et 0.1% Tween-20, pH 7.6).

### **I.7.8. Incubation avec les anticorps**

Les membranes sont incubées, en présence des anticorps primaires dissous dans le TBS-Tween: lapin anti-MCT1, souri anti-Bax, lapin anti-Bcl-2 (Santa-Cruz Biotechnologies, CA) et anti-EF-1a (Millipore, Billerica, MA), pendant une nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées vigoureusement (3 x 15 mn) dans du TBS-Tween avant addition des anticorps secondaires. L'incubation avec ses derniers est réalisée dans du TBS-Tween 0,05% pendant 45mn, suivie de 4 vigoureux lavages de 10 mn dans du TBS-Tween 0,05%. La révélation s'effectue à l'aide du kit de révélation par chimiluminescence (Pierce, Perbio Science France SAS, France), composé d'une solution de luminol et d'une solution de peroxyde d'hydrogène. En milieu alcalin, l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène produit une émission lumineuse. Cette réaction de chimiluminescence est catalysée par la peroxydase de Raifort et la quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité de catalyseur. Ainsi, l'anticorps secondaire est détecté grâce à cette réaction de chimiluminescence.

Pour ce faire, la membrane est immergée dans le mélange chimiluminescent, constitué de volumes égaux des 2 solutions du kit ( 250 $\mu$ L) et 1 ml de PBS pendant 1 mn, égouttée, couverte d'un film plastique, puis exposée en cassette à un film photographique (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Amersham Biosciences, France) (autoradiographie) pendant 1 à 10 mn. La position du complexe immun sur la membrane est alors visualisée après révélation du film.

### **I.8. Tests de migration, d'invasion cellulaire et de tumorigénicité *in vivo***

Les tests de migration et d'invasion Transwell ont été effectués dans une chambre Boyden modifiée (BD Bioscience, Bedford, MA, USA). En résumé, le Matrigel a été réhydraté pendant 2h à température ambiante par addition à chaud de milieu de culture DMEM sans sérum. Les puits de la chambre inférieure ont été remplis avec du DMEM contenant 10% de NuSerum, et les chambres sont assemblées en plaçant une membrane non couverte entre les compartiments inférieurs et supérieurs selon les instructions du fabricant. Les MDA-MB231 ( $10^5$ ) sont suspendues dans le compartiment supérieur dans le milieu DMEM sans sérum contenant 0.1% de BSA. L'ACCA est ensuite additionné, en fonction de sa concentration (25, 100 et 200 $\mu$ M), dans le compartiment supérieure pour une incubation de 48h à 37°C au sein d'une étuve à 5% de CO<sub>2</sub>. En ce qui concerne la migration, les cellules  $5 \times 10^4$  sont placées dans le compartiment supérieur des chambres BioCoat supplémenté avec les concentrations d'ACCA mentionnées ci-dessus. Les puits du compartiment inférieur ont été remplis avec du RPMI 1640 contenant 10% de NuSerum et les chambres de chaque compartiment ont été assemblés similairement à la méthode décrite ci-dessus. Le test de migration a été effectué à 37°C pour une durée de 15 à 18h. Les cellules qui envahissent ou migrent à travers la membrane couverte sont fixées et colorées avec le RAL 555 staining kit. Les cellules colorées sont comptées et normalisées relativement au nombre de cellulesensemencées. L'expérience a été répétée 3 fois et au moins 10 champs ont été comptés à chaque expérience. Le test *in vivo* de tumorigénicité a été effectué comme décrit précédemment <sup>(125)</sup>. Brièvement, les cellules exponentiellement croissantes MDA-MB 231 ont été suspendues dans du PBS et mixées avec du Matrigel (Ratio 1 :1), puis, 100  $\mu$ L de cellules ( $2 \times 10^6$ ) sont injectées en sous-cutanée (s.c) sur le flanc droit de chaque souri. Une semaine après l'injection tumorale, les souris sont traitées avec l'ACCA (25  $\mu$ mol dans 200  $\mu$ l <sup>(126)</sup>) cinq fois/semaine à partir de la première semaine qui suit l'injection sous-cutanée des cellules tumorales. Le taux de croissance tumorale a été déterminé comme décrit précédemment <sup>(125)</sup>.

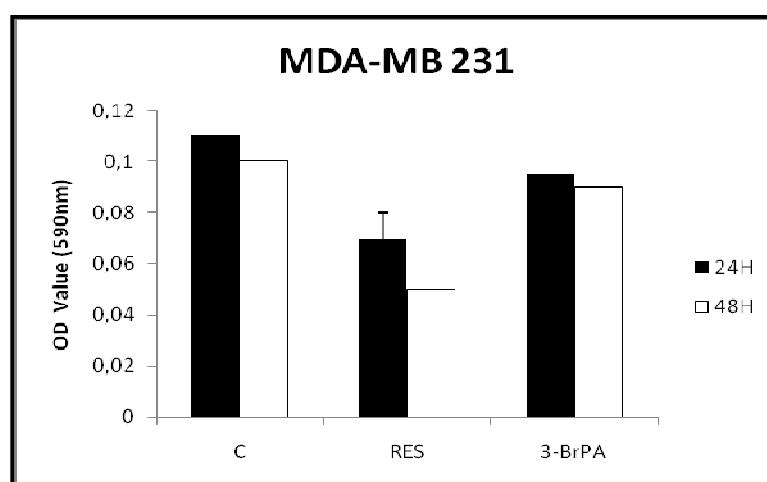
### I.9. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés statistiquement en utilisant le logiciel SPSS 18.0 et représentés en Moyenne  $\pm$  SEM. La comparaison entre les groupes a été effectuée par le test *t* de student et  $p < 0,05$  a été considéré comme étant significatif.

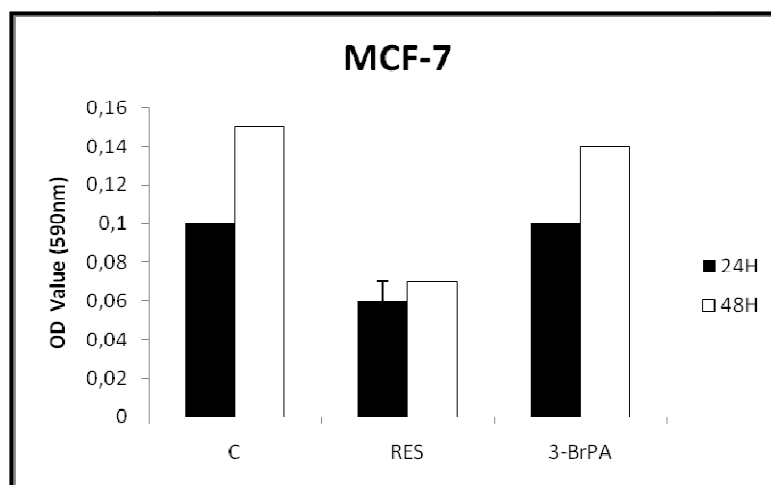
## II. RESULTATS

### II.1. Effets du resvératrol et du 3-BrPA sur la prolifération du cancer du sein par le MTT assay

Afin de déterminer l'impact du resvératrol et du 3-BrPA sur la prolifération cellulaire au sein des lignées cancéreuses mammaires humaines, les cellules MCF-7 et MDA-MB231 ont été traitées avec du resvératrol à 100 $\mu$ M et du 3-BrPA à 25  $\mu$ g/ml. Par comparaison avec le groupe control, Les résultats indiquent que le traitement à 100 $\mu$ M de resvératrol a un effet inhibiteur significatif sur les lignées MCF-7 et MDA-MB231, *in vitro*, et progressif en fonction du temps (Figures 10 et 11). Cependant, aucune diminution significative n'a été observée avec le 3-BrPA à 25  $\mu$ g/ml sur les deux lignées cellulaires et ceci quelque soit le durée du traitement.



**Figure 10.** Effet inhibiteur du resvératrol (RES) 100 $\mu$ M et du 3-BrPA 25 $\mu$ g/ml sur la croissance des lignées MDA/MB 231



**Figure 11.** Effet inhibiteur du resvératrol (RES) 100 $\mu$ M et du 3-BrPA 25 $\mu$ g/ml sur la croissance des lignées MCF-7

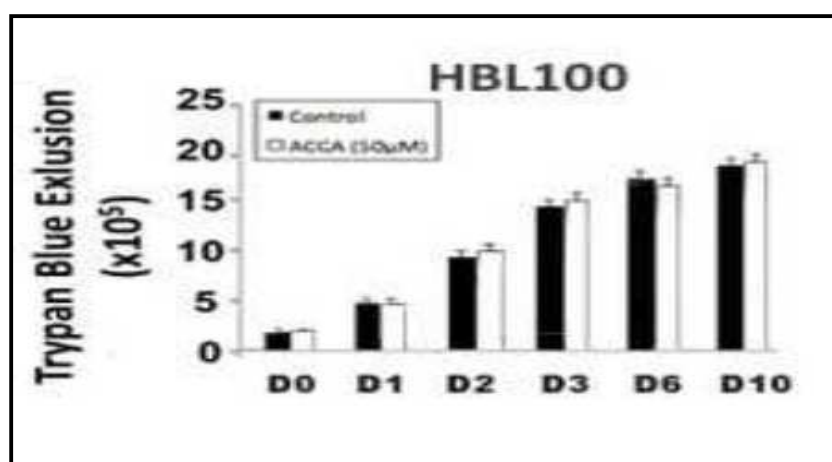
## II.2. Mécanismes impliqués dans l'inhibition *in-vitro* du cancer du sein par l'ACCA

### II.2.1. Effet de l'ACCA sur la viabilité des cellules cancéreuses du sein et sur la formation des colonies

Pour mettre en évidence l'activité de l'ACCA sur la viabilité des cellules cancéreuses, les lignées MDA-MB 231, MCF-7 et T47D ont été traitées avec 0 et 50  $\mu$ M d'ACCA pour 1, 2, 3, 6 ou 10 jours. Au bout de ce temps, la détermination de la viabilité cellulaire a été réalisée par le test d'exclusion au bleu trypan. Une baisse importante du nombre de cellules excluant le bleu trypan a été observée, par comparaison avec le contrôle (Figures 13-15). Par contraste avec les cellules tumorales malveillantes du sein, le traitement des cellules épithéliales humaines normales immortelles HBL100, avec la même concentration d'ACCA, n'a pas eu d'influence sur la croissance des cellules HBL100 (Figure 12).



De plus, afin de confirmer l'activité inhibitrice de l'ACCA sur la prolifération cellulaire, les cellules cancéreuses humaines mammaires ont été exposées à différentes concentrations d'ACCA (0, 25, ou 200  $\mu\text{M}$ ) pour 48h. Ensuite, les lignées cellulaires MDA-MB 231, MCF-7 et T47D ont été, de nouveau,ensemencées à une densité (1000-2000 cellules/BP) et gardées sous incubation durant 3 à 4 semaines à 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  afin de permettre la formation des colonies dans les milieux de culture DMEM, MEM et RPMI-1640, respectivement. Les milieux de culture sont renouvelés tous les 4 à 5 jours. La pré-exposition de cellules à des concentrations croissantes d'ACCA pendant 48h se traduit par une diminution de la formation des colonies (Figures 16 et 17). Ces résultats appuient davantage l'observation que l'ACCA, à des concentrations supérieures ou égales à 50  $\mu\text{M}$ , induit manifestement une mort cellulaire significative.



**Figure 12.** Cellules HBL100 traitées avec l'ACCA durant 1, 2, 3, 6 ou 10 jours

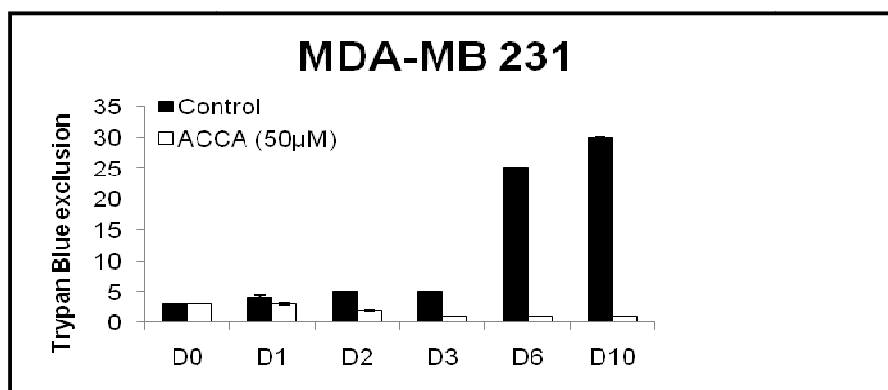


Figure 13. Cellules MDA-MB 231 traitées avec l'ACCA durant 1, 2, 3, 6 ou 10 jours

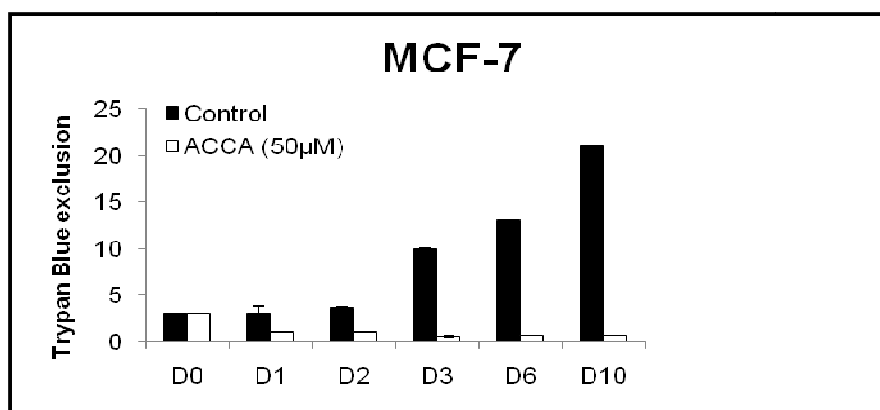


Figure 14. Cellules MCF-7 traitées avec l'ACCA durant 1, 2, 3, 6 ou 10 jours

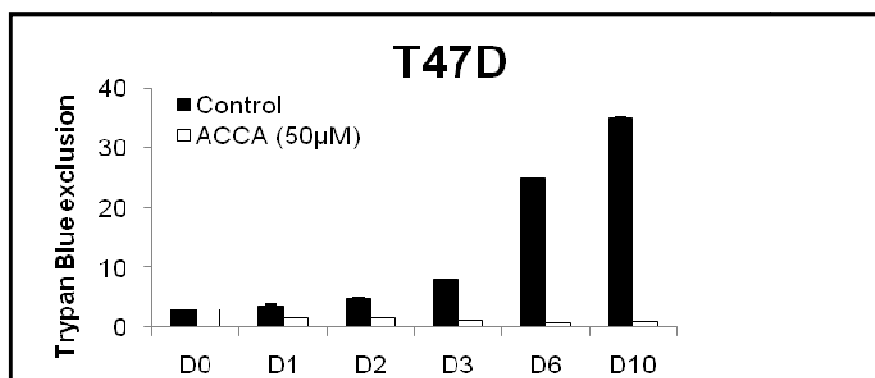


Figure 15. Cellules T47D traitées avec l'ACCA durant 1, 2, 3, 6 ou 10 jours

Les cellules qui excluent le bleu trypan ont été quantifiées. Les valeurs mentionnées sur les graphes (13-15) représentent le nombre de cellules  $\times 10^5$ .

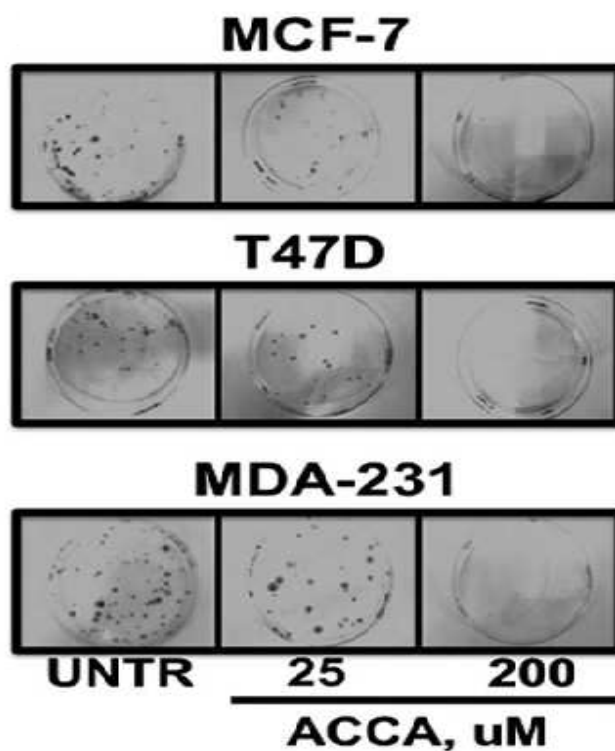


Figure 16. Images des colonies formées à l'issue du test de clonogénicité

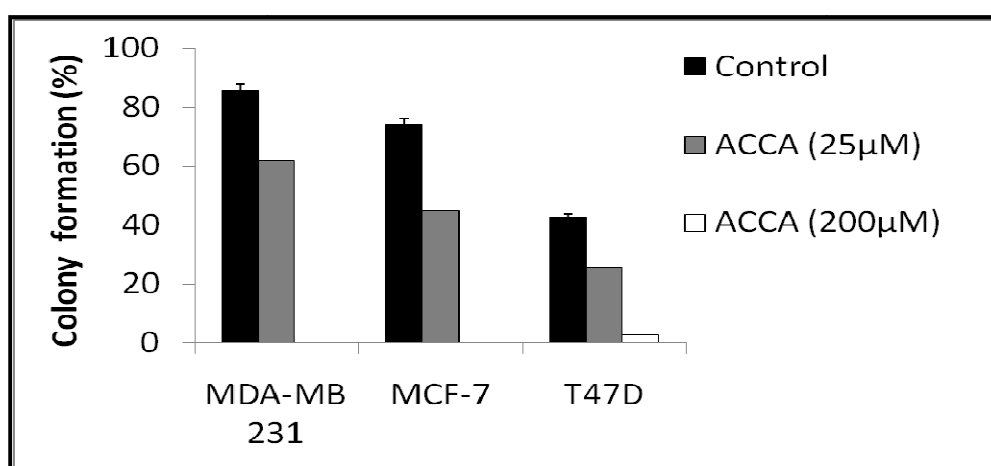
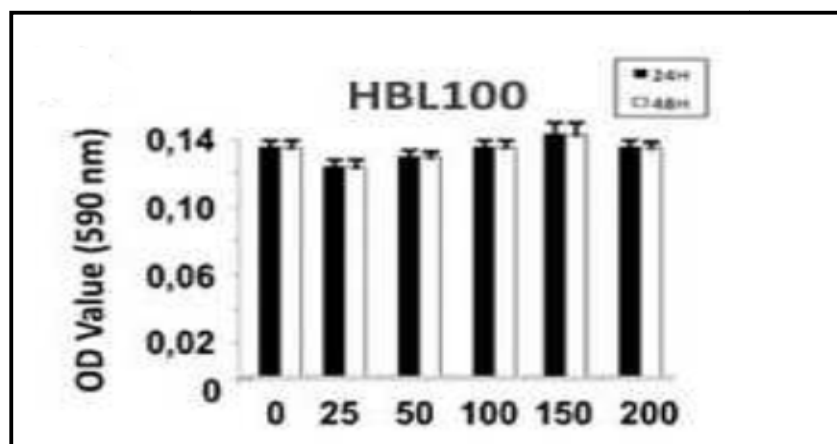


Figure 17. Histogramme des pourcentages

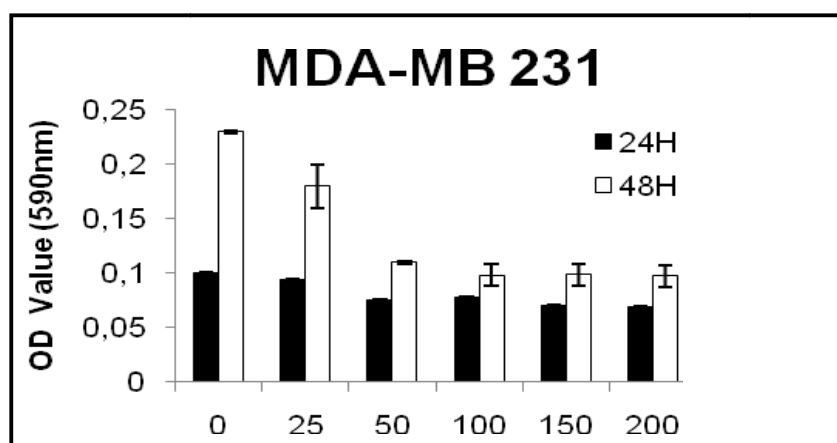
## II.2.2. Effet de l'ACCA sur la prolifération des lignées cellulaires HBL100, MDA-MB231, MCF-7 et T47D

Afin de déterminer l'effet de l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales mammaires MDA-MB231, MCF-7 et T47D exposées à l'ACCA, ces lignées ont été traitées avec différentes concentrations d'ACCA allant de 0 jusqu'à 200  $\mu\text{mol/L}$  pendant 24 et 48 h. Par comparaison avec le contrôle, une baisse non significative de la prolifération cellulaire a été observée lorsque les cellules sont traitées pendant 24h à une concentration de 25  $\mu\text{M}$ . Cependant, en se référant aux résultats obtenus ci-dessous, les traitements de 48h à des concentrations croissantes d'ACCA (25, 50, 100, 150 et 200  $\mu\text{M}$ ) produisent un effet inhibiteur significatif dose-dépendant sur la croissance des cellules cancéreuses. Cet effet suppressif est plus remarquable à une concentration de 200  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  pour les lignées MCF-7 (54.47 %; P 0.005), T47D (77.47 %; P 0.005) et MDA-231 (64.67 %; P 0.005), respectivement (Figures 19-21). En revanche, le traitement des cellules épithéliales immortelles normales HBL100, avec des concentrations croissantes d'ACCA (25, 50, 100, 150 et 200  $\mu\text{M}$ ), n'affecte pas la croissance cellulaire (Figure 18). Ces résultats confirment que l'ACCA inhibe sélectivement la prolifération des lignées MDA-MB231, MCF-7 et T47D *in vitro*.

De plus, nous avons vérifié l'hypothèse qui stipule que l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la prolifération cellulaire des lignées cancéreuses mammaires persisterait également après l'élimination de l'ACCA du milieu. Pour cela, les cellules cancéreuses MDA-231 ont été traitées avec le milieu seul ou contenant 50  $\mu\text{M}$  d'ACCA pour une durée de 48 h, et la prolifération tumorale a été évaluée par l'essai du MTT (d0). Nos données montrent, en compatibilité avec nos résultats précédents, que l'ACCA inhibe significativement la prolifération des MDA-231 (d0, OD contrôle, 0.235; OD ACCA, 0.084, inhibition de 62.38 %, P < 0.001). Par la suite, le milieu a été remplacé avec un autre milieu de culture contenant 10 % de FBS et la croissance cellulaire a été évaluée après 4 jours supplémentaires. Nos données montrent que les effets suppressifs de l'ACCA au 4<sup>ème</sup> (d4) étaient semblables à celles observées à d0, (d0, OD le contrôle, 1.775; OD ACCA, 0.580, inhibition de 67.33 %, P < 0.001). Ces résultats indiquent clairement que l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la prolifération cellulaire persiste, également après son élimination du milieu de culture.



**Figure 18.** l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des cellules épithéliales immortelles normales, HBL100



**Figure 19.** l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des lignées cancéreuses MDA/MB 231

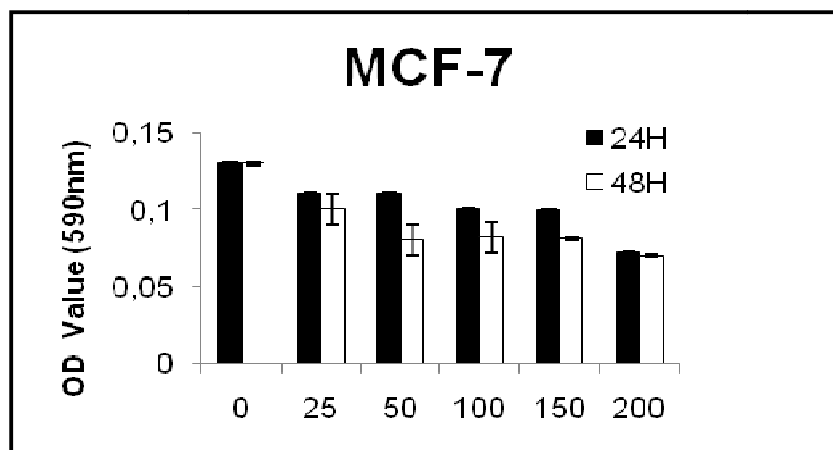


Figure 20. l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des lignées cancéreuses MCF-7

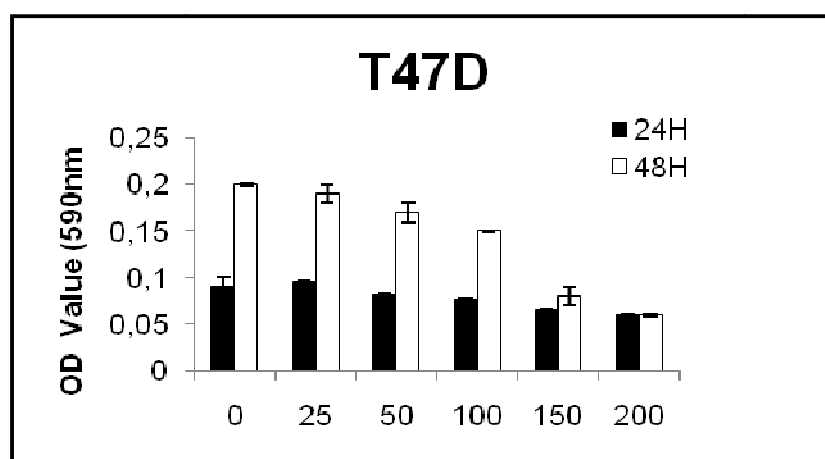
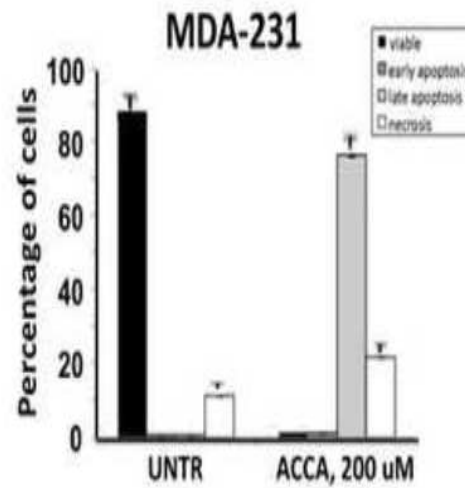
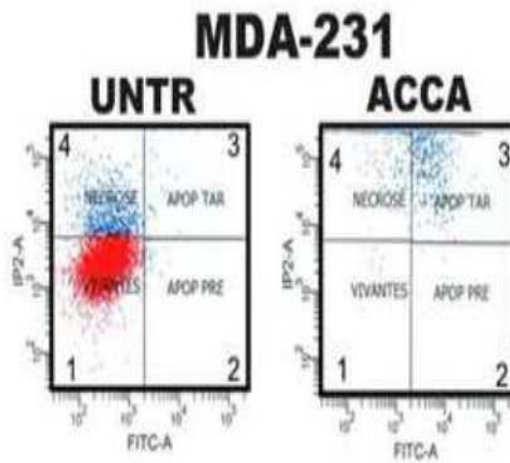
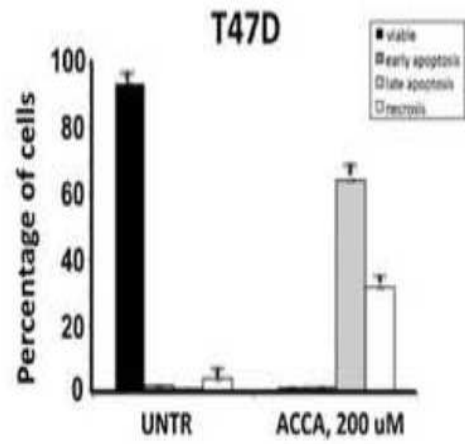
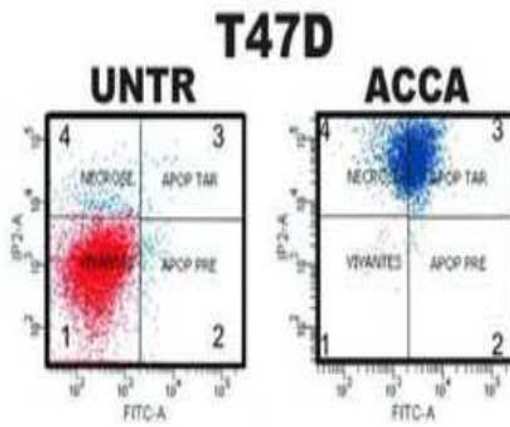
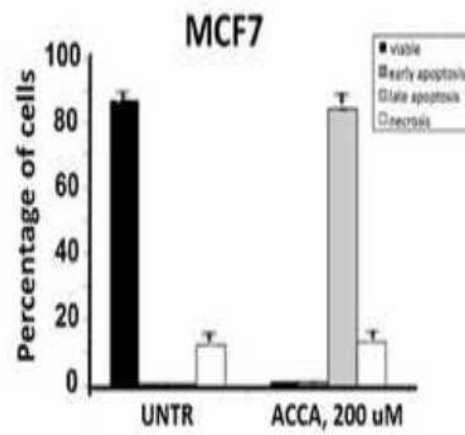
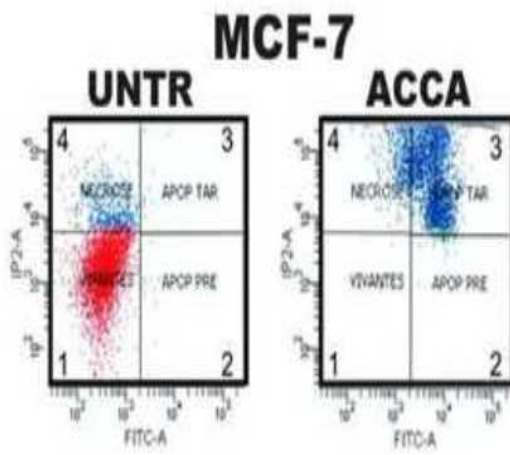


Figure 21. l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des lignées cancéreuses T47D

### **II.2.3. Effet de l'ACCA sur l'induction de l'apoptose**

Afin de déterminer le type de mort cellulaire induite sous nos conditions expérimentales, les cellules cancéreuses ont été traitées pendant 48h avec 0 et 200 $\mu$ M d'ACCA puis, soumises à une analyse par cytofluorométrie après fixation avec l'annexin V-FITC et le PI. La fixation à l'annexin est une mesure de l'externalisation de la phosphatidylsérine sur la membrane plasmique cellulaire, représentant l'une des principales caractéristiques de l'apoptose.

Comme indiqué sur les Figures 22-24, le traitement avec l'ACCA diminue le taux de viabilité cellulaire au niveau de toutes les lignées cancéreuses du sein, alors que le pourcentage des cellules apoptotiques augmente. En effet, le traitement des MDA-MB 231, MCF-7 et T47D avec l'ACCA, à 200 $\mu$ M, montre un pourcentage de 77,6, 85,8 et 65,9 % d'apoptose cellulaire (regroupant les étapes précoces et tardives) face à 21,6, 13 et 31,8 % de nécroses cellulaires, respectivement. Ces données montrent que l'ACCA, à une concentration de 200 $\mu$ M, pourrait induire de sérieux dommages cellulaires et augmenter la mort par apoptose.





Les cellules MDA-MB 231, MCF-7 et T47D ont été incubées, pour 48h, avec 0 et 200  $\mu$ M d'ACCA. Avant d'être analysées par FACS, les cellules ont été fixées par l'annein V-FITC (AnV) et l'iodure de propidium (PI). Le pourcentage des cellules a été calculé avec le CELL Quest software.

**Tableau 4. Effets de l'ACCA sur l'induction de l'apoptose et la nécrose au sein des lignées cellulaires MDA-MB 231, MCF-7 et T47D**

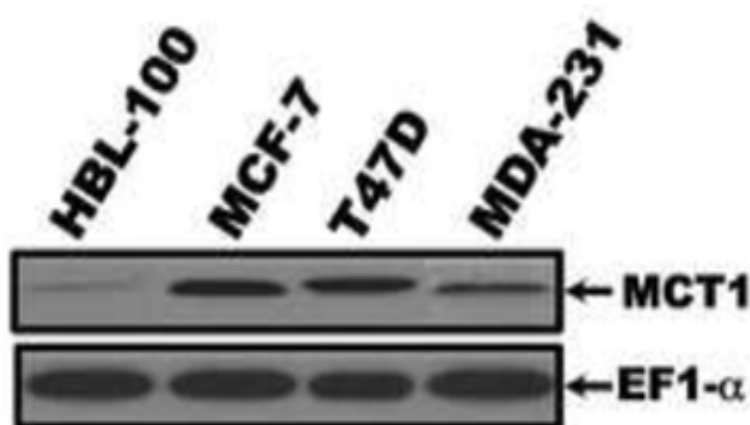
ACCA concentrations ( $\mu$ M)		% des cellules			
		Vivantes	Apop pre	Apop tard	Nécroses
MDA-MB 231 <sup>b</sup>	C <sup>a</sup>	87,9	0,4	0,4	11,3
	200	1,1	1,3	76,3	21,6
MCF-7 <sup>b</sup>	C <sup>a</sup>	87,4	0,3	0,3	11,9
	200	1,2	1,3	84,5	13
T47D <sup>b</sup>	C <sup>a</sup>	94,4	1,5	0,6	3,5
	200	1,4	1,3	64,6	31,8

<sup>a</sup>C= groupe contrôle. <sup>b</sup> les cellules ont été analysées par cytométrie en flux après avoir été fixées avec l'annexin V-FITC et le PI. Le pourcentage des cellules a été calculé avec le CELL Quest software

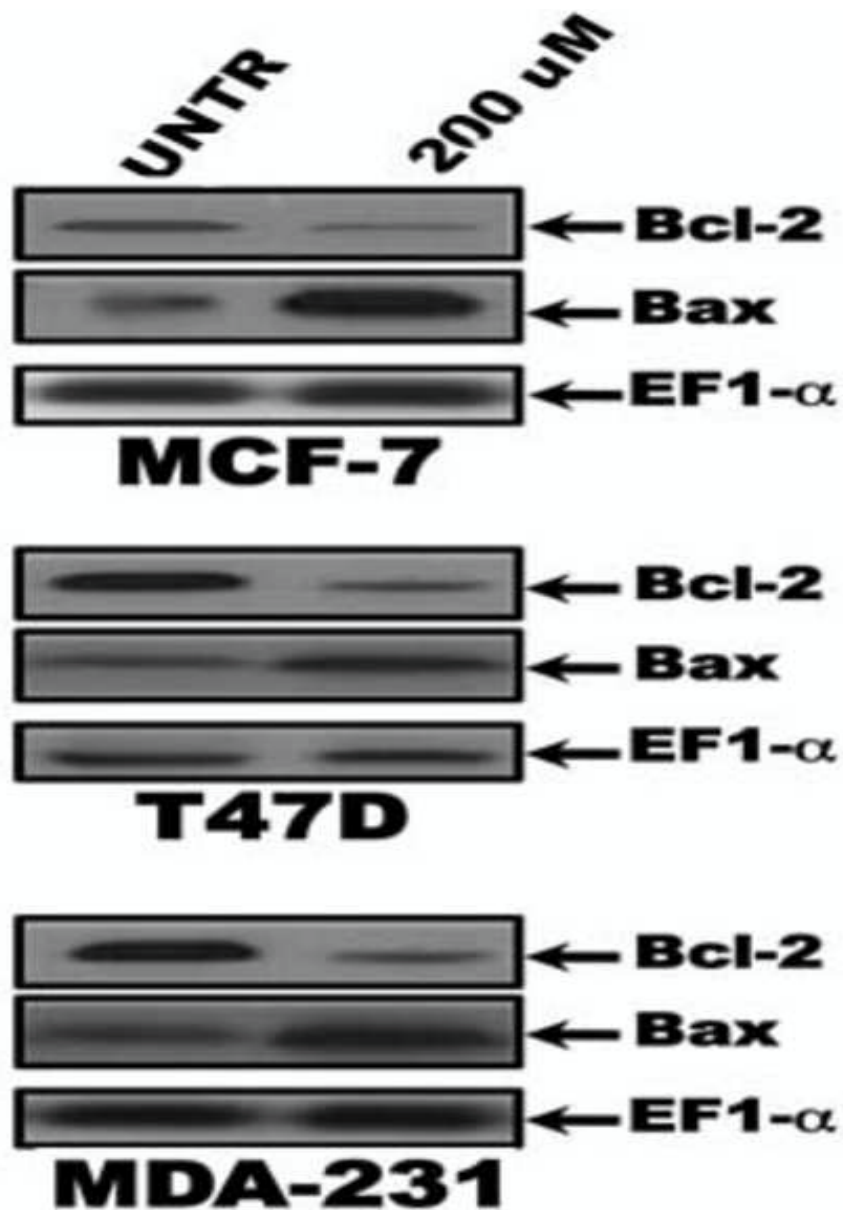
#### II.2.4. Effet de l'ACCA sur l'expression des MCT1, Bax et Bcl-2

Parce que l'ACCA est connu pour être un inhibiteur des transporteurs monocarboxylate (MCTs) avec une efficacité marquée pour les MCT1 en comparaison avec d'autres MCTS, nous avons évalué, par western blot, l'expression de la protéine MCT1 dans les cellules épithéliales humaines normales immortelles du sein HBL100 et dans les lignées cancéreuses mammaires comprenant les MCF-7, MDA-231 et T47D. Nous avons constaté que la protéine MCT1 est surexprimée sur les trois lignées cancéreuses mammaires contrairement à la lignée cellulaire immortelle du sein HBL-100 (Figure 25).

Nous avons ensuite défini les gènes cibles potentiels associés à l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires et pouvant être régulés par l'ACCA. Vu l'importance des protéines de la famille des Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose, nous avons évalué les niveaux d'expression des protéines antiapoptotiques (Bcl-2) et les protéines proapoptotiques (Bax) au sein des cellules cancéreuses mammaires. Comme illustré dans la Figure 26, l'ACCA diminue le niveau d'expression des protéines Bcl-2 (1.8-, 2.4- et 2.6-pI, respectivement) et induit une surexpression des protéines Bax (3.4-, 2.4- et 3.2-pI, respectivement) au sein des lignées cancéreuses mammaires MCF-7, T47D et MDA-231, respectivement. A l'inverse, les niveaux des protéines pro-et antiapoptotiques diverses n'ont pas été significativement modifiées dans la lignée HBL100 suite au traitement par l'ACCA (données non illustrées). Ces études suggèrent que l'ACCA augmente le ratio des protéines pro-antiapoptotiques, renversant ainsi la balance des cellules cancéreuses de la survie vers la mort cellulaire programmée.



**Figure 25.** Expression des MCT1 sur les lignées cellulaires épithéliales humaines normales immortelles de poitrine, HBL100 et lignées cellulaires tumorales du sein MCF-7, T47D et MDA-231



**Figure 26 :** Effet de l'ACCA sur l'expression des protéines Bax et Bcl-2. Les cellules cancéreuses des lignées MDA-MB 231 et MCF-7 ont été incubées avec des concentrations d'ACCA (0, 200 $\mu$ M) pour 48h; Le taux des protéines Bax et Bcl-2 a été détecté par western blot

### **II.2.5. Effet de l'ACCA sur la migration, l'invasion et la croissance tumorales des cellules cancéreuses humaines mammaires in vivo**

Pour déterminer si l'ACCA pourrait affecter les propriétés biologiques importantes des cellules cancéreuses mammaires, tout d'abord, nous avons pratiqué les tests in vitro de migration et d'invasion cellulaire. Comme le montre la Figure 27, la capacité migratoire et invasive des MDA-MB 231 est significativement affectée par l'ACCA de façon dose dépendante. A une concentration élevée de 200 $\mu$ M, l'ACCA induit une réduction de ~90 et 85% de la migration et de l'invasion cellulaire, respectivement, par comparaison avec les cellules non traitées (contrôle). Nous avons aussi déterminé l'effet de multiple injections d'ACCA sur la croissance des cellules MDA-MB 231 injectées par voie sous-cutanée chez la souris (Figure 28). Les concentrations d'ACCA administrées comme traitement dans notre étude se situent dans la gamme utilisée dans les précédentes études animales <sup>(126)</sup>. Le volume tumoral moyen des souris traitées avec l'ACCA était significativement diminué par rapport aux souris contrôle non traitées. Au bout du 32 jour qui suit l'injection des cellules tumorales, les cellules MDA-MB 231 étaient significativement réduites par comparaison avec les souris contrôle (195 $\pm$ 12 mm<sup>3</sup> contre 12 $\pm$ 2 mm<sup>3</sup>) indiquant que l'ACCA diminue la croissance tumorale jusqu'à 94 %. Par ailleurs, Le traitement des souris recevant les cellules MDA-231 avec l'ACCA aboutit au 8<sup>e</sup> jour à une diminution moins marquée de la croissance tumorale ; cependant, la différence était toujours observable. De plus, les animaux sont restés en bonne santé tout au long de l'expérience et aucune perte de poids n'a été observée après le traitement, suggérant que l'ACCA a été bien toléré avec ce régime (les données n'ont pas été communiquées).

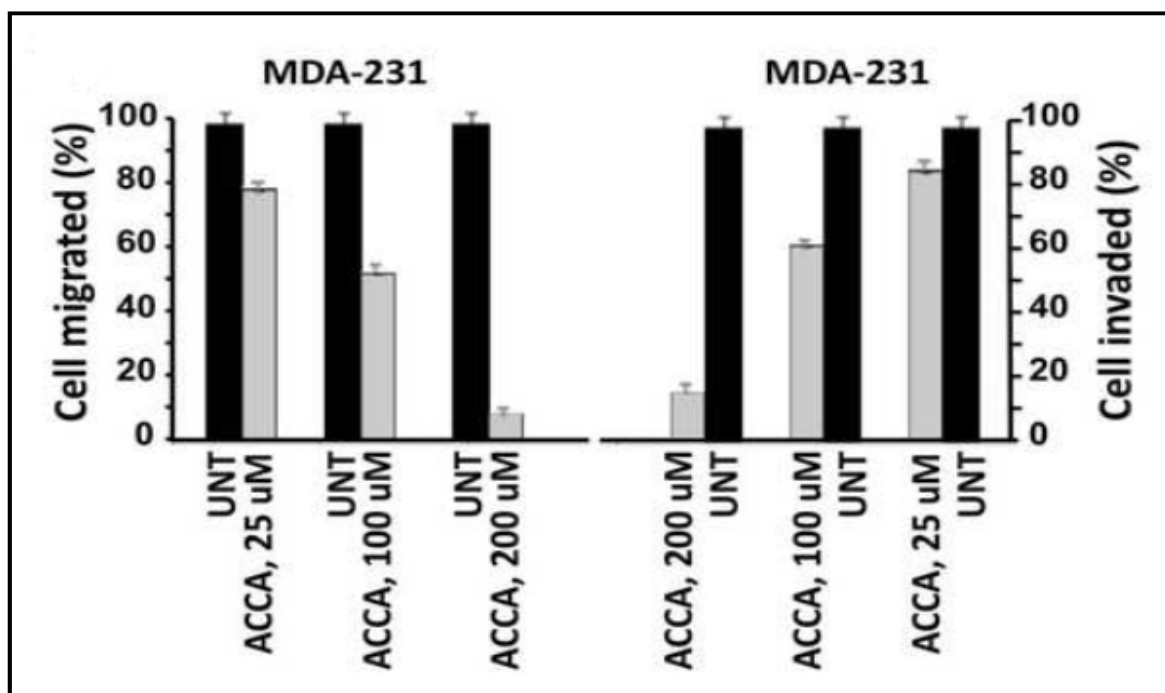


Figure 27. Effet de l'ACCA sur la migration et l'invasion *in vitro*

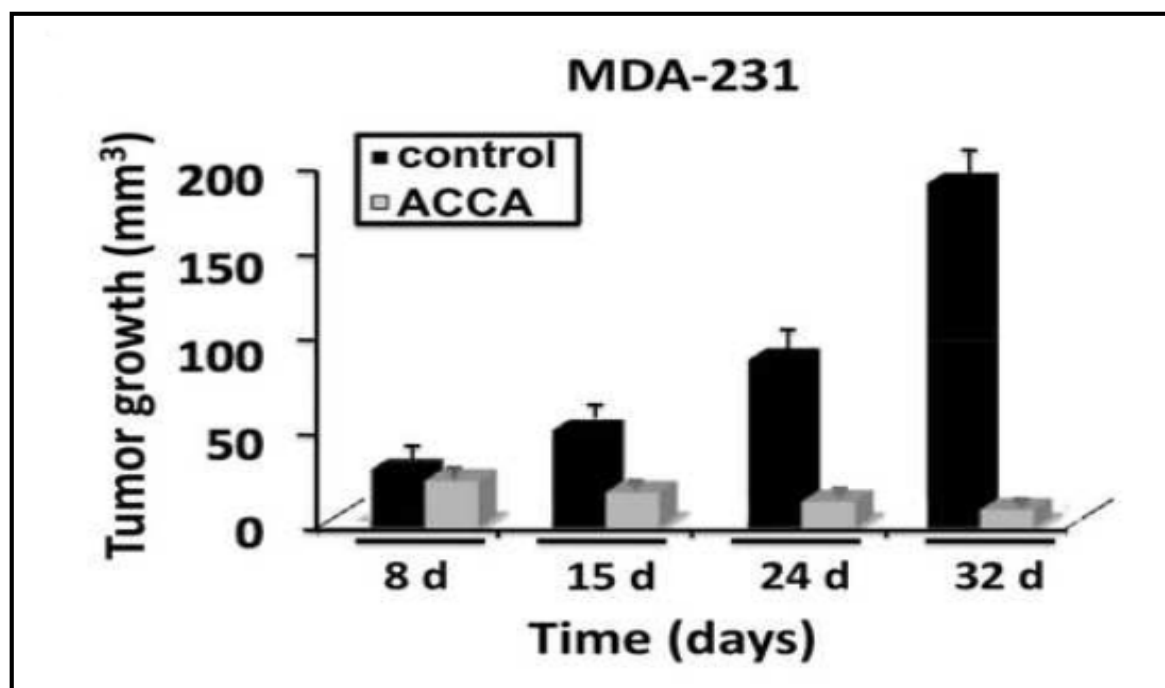
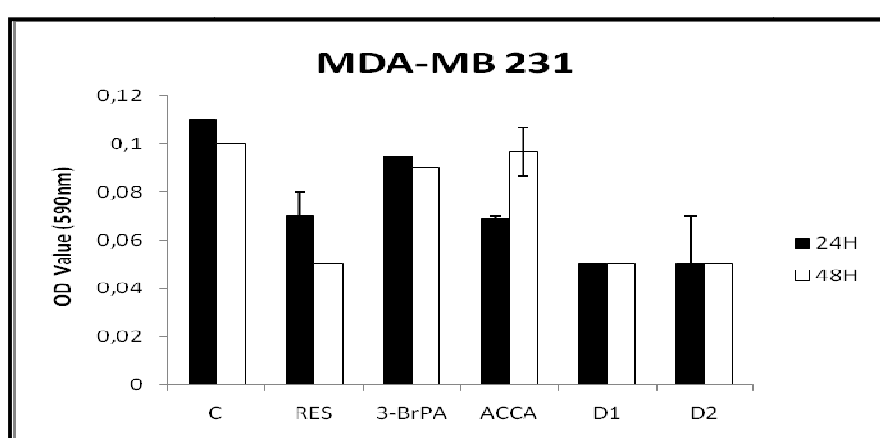
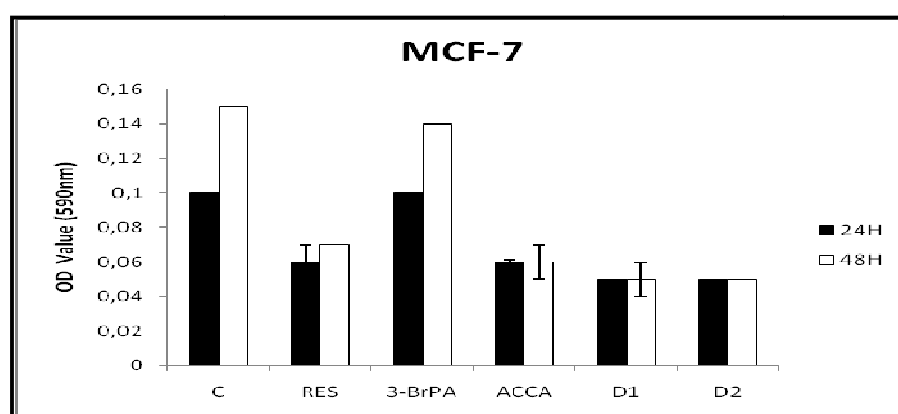


Figure 28. Prolifération tumorale mammaire *in vivo*

**II.3. Effets du dérivé 1 (D1) et du dérivé 2 (D2) sur la prolifération des lignées MDA-MB 231 et MCF-7.** Par comparaison avec le groupe de contrôle, le traitement avec **D1** et **D2** à 100 $\mu$ M, a révélé une baisse significative de la prolifération des cellules cancéreuses MDA-MB 231 et MCF-7 par rapport à celle observée lorsque nos substances étaient testées séparément. Ces résultats (Figures 29 et 30) justifient, de ce fait, que les nouveaux dérivés possèdent un effet antiprolifératif plus prononcé et induisent une inhibition cellulaire similaire qui est indépendante du temps contrairement aux effets des produits individuels.



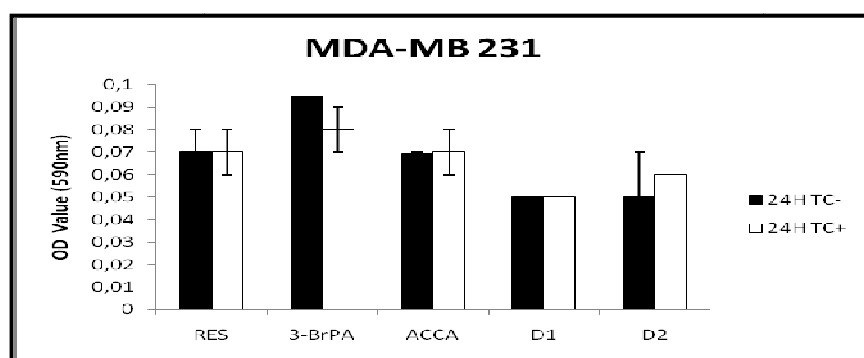
**Figure 29.** Effet inhibiteur du RES à 100 $\mu$ M, 3-BrPA à 25 $\mu$ g/ml, ACCA à 200 $\mu$ M, D1 et D2 à 100 $\mu$ M sur la lignée MDA-MB 231



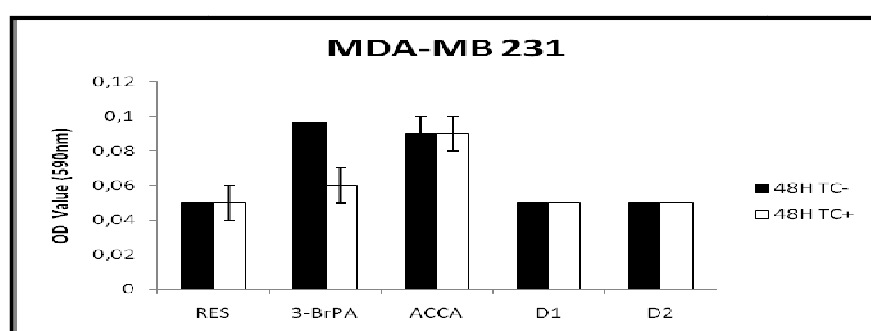
**Figure 30.** Effet inhibiteur du RES à 100 $\mu$ M, 3-BrPA à 25 $\mu$ g/ml, ACCA à 200 $\mu$ M, D1 et D2 à 100 $\mu$ M sur la lignée MCF-7

#### II.4. Effets de nos composés sur la prolifération cellulaire en association avec le traitement anticancéreux conventionnel

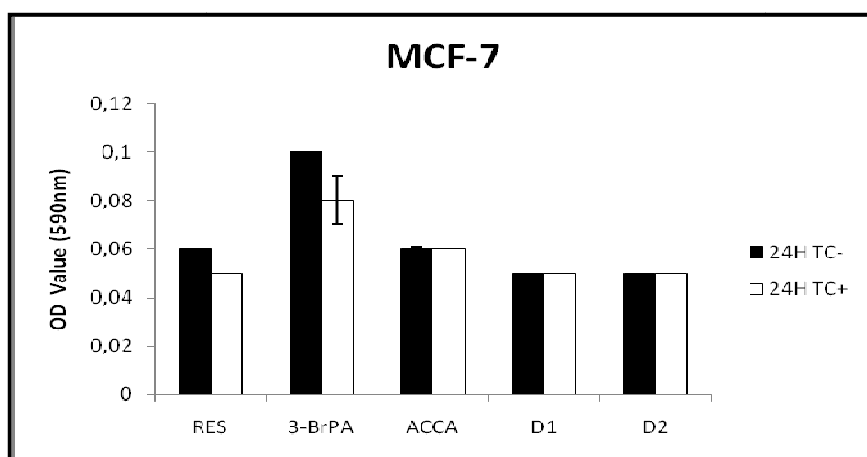
Quelle que soit la durée du traitement (24 ou 48h), l'association de nos produits (resvératrol, l'ACCA, **D1** et **D2**) avec le traitement conventionnel (5µg/ml Dox+ 25µg/ml 5-FU+ 500µg/ml CPA) n'induit aucune différence significative sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB 231 et MCF-7. Ceci montre des résultats similaires par rapport au groupe traité uniquement avec le resvératrol, l'ACCA, et les dérivés **D1** et **D2**. En revanche, le traitement avec 25µM de 3-BrPA a révélé une baisse significative à 24 et 48h sur toutes les lignées cellulaires. Ces données démontrent ainsi qu'à l'exception du 3-BrPA, l'association avec le traitement conventionnel n'est pas à l'origine d'un effet antiprolifératif synergique (Figures 31-34).



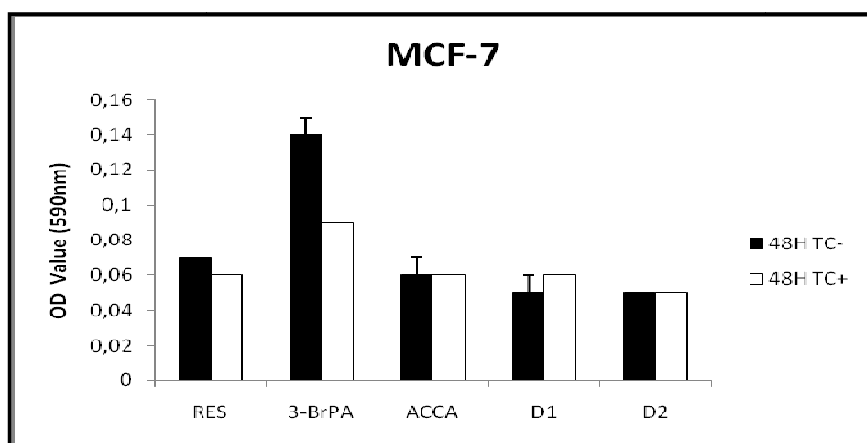
**Figure 31.** Effet inhibiteur du RES à 100µM, 3-BrPA à 25µg/ml, ACCA à 200µM, **D1** et **D2** à 100µM sur la lignée MDA-MB 231 /24h



**Figure 32.** Effet inhibiteur du RES à 100µM, 3-BrPA à 25µg/ml, ACCA à 200µM, **D1** et **D2** à 100µM sur la lignée MDA-MB 231 /48h



**Figure 33.** Effet inhibiteur du RES à 100 $\mu$ M, 3-BrPA à 25 $\mu$ g/ml, ACCA à 200 $\mu$ M, **D1** et **D2** à 100 $\mu$ M sur la lignée MCF-7 /24h



**Figure 34.** Effet inhibiteur du RES à 100 $\mu$ M, 3-BrPA à 25 $\mu$ g/ml, ACCA à 200 $\mu$ M, **D1** et **D2** à 100 $\mu$ M sur la lignée MCF-7 /48H .



**DISCUSSION**

**GENERALE**

La dérégulation de la prolifération cellulaire et l'échappement à la mort sont deux caractéristiques des cellules tumorales, dont le cancer du sein. De ce fait, une variété de composés a été développée afin de pallier à ce phénomène et promouvoir l'entrée des cellules cancéreuses mammaires dans le processus de mort cellulaire programmé.

**L'originalité de nos travaux se décline en plusieurs points :**

- **Le resvératrol ou le 3-BrPA affectent différemment la prolifération des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB 231 et MCF-7**

Les travaux antérieurs rapportent que le resvératrol joue un rôle crucial dans l'inhibition de la prolifération cellulaire d'un large panel de lignées cancéreuses humaines et ceci, en exerçant diverses activités biochimiques incluant, principalement, des effets antioxydants. De plus, le mécanisme de l'apoptose induit par le resvératrol est dépendant de la nature et du type de cancer. Nos résultats confirment que le resvératrol, notre référence dans cette étude, inhibe, en fonction du temps, la prolifération cellulaires des lignées cancéreuses mammaires humaines MDA-MB 231 et MCF-7, ce qui renforce l'effet antiprolifératif de ce composé sur le cancer du sein, rapporté par Filomeni et collaborateurs <sup>(127)</sup>.

En effet, ces derniers ont démontré, que le trans-resvératrol en affectant l'état redox de la cellule tumorale, a pu altérer le ratio GSH/GSSG. Ce mode d'action a été reflété par une activation temporellement différente de JNK et p38MAPK, avec une faible activation de cette dernière et une rapide induction de la première. Pozo-Guisado et coll, <sup>(128)</sup> ont examiné le mécanisme d'apoptose déclenché par le resvératrol sur les lignées cancéreuses mammaires humaines MCF-7 et MDA-MB-231 et ont démontré que ce composé augmentait l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et diminuait celle de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Ceci implique l'activation de la caspase-3 et l'inhibition de l'activité de la ribonucléotide réductase. Il en résulte de ce processus, un arrêt du cycle cellulaire à la phase S et une induction de l'apoptose. Par conséquent, le traitement par le resvératrol aboutirait à la mort cellulaire programmée.

Par ailleurs, la dérégulation des voies métaboliques au cours du processus tumoral et son implication dans la prolifération rapide du cancer au détriment de la croissance des cellules saines est actuellement connue sous le terme de “l’effet Warburg”<sup>(104)</sup>. Spencer et collaborateurs<sup>(129)</sup> ont montré que le mécanisme qui altère l’effet Warburg et inhibe le métabolisme énergétique avait une importante activité cytostatique et cytotoxique sur un large panel de cellules cancéreuses humaines.

Quant au 3-BrPA, il inhibe en premier lieu l’hexokinase II (HK II). HK II se trouve sur la membrane externe de la mitochondrie et transforme le glucose en glucose 6-phosphate. Cette enzyme est généralement surexprimée dans les cellules cancéreuses, comme cela a été montré par des études protéomiques<sup>(111-113)</sup>. L’interaction de HK II avec les molécules pro-apoptotiques Bax permettrait de lever l’inhibition par les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl2 ; ceci conduit à l’ouverture des canaux et à la libération des molécules apoptogènes, en particulier le cytochrome C oxydé. La conséquence de tout ceci c’est le déclenchement de l’apoptose par la voie mitochondriale<sup>(112)</sup>.

Les observations faites par Liu et collaborateurs<sup>(116)</sup> montrent que le 3-BrPA exerce une activité antiproliférative à une concentration de 25µg/ml. Par contre, notre travail montre que le 3-BrPA ne serait pas à l’origine de l’effet antiprolifératif significatif à une concentration de 25µg/ml *in-vitro*. Nous avons en effet observé que des concentrations de 50 µg/ml n’entraînaient aucune augmentation significative de l’effet antiprolifératif, ce qui obligeait à envisager des concentrations supérieures. Par conséquent, nos résultats vont dans le même sens que les observations du groupe de X-D Zhang<sup>(35)</sup> quant à l’inefficacité du 3-BrPA à des doses inférieures à 200µM et à la nécessité de prolonger la durée du traitement jusqu’à 72h pour obtenir une meilleure inhibition cellulaire. Il est utile de souligner que ces derniers travaux n’ont pas été effectués sur une lignée tumorale du sein.

- **Rôle thérapeutique de l'ACCA**

Le transport des monocarboxylates tels que le pyruvate, le lactate et l'acétoacétate, à travers la membrane plasmiques des cellules cancéreuses est facilité par une famille de transporteurs membranaires protéiques, les MCTs <sup>(18)</sup>.

La perturbation ou le changement du métabolisme énergétique des cellules tumorales, suite à l'inhibition des fonctions des MCTS, mène souvent à la mort cellulaire via l'induction des voies de signalisations apoptotiques mitochondriales <sup>(118)</sup>. Dans ce contexte, Le blocage des MCTs, qui jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme tumorale, représente une perspective thérapeutique prometteuse pour le développement de thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein <sup>(129)</sup>.

Lors de ces travaux, nous avons étudié les propriétés pro-apoptiques de l'ACCA sur le carcinome mammaire. Sur la base des défauts génétiques précédemment observés sur les lignées cancéreuses humaines, impliquant principalement les mutations de la p53 <sup>(130)</sup>, il est évident que l'effet antinéoplasique de l'ACCA n'a pas pour origine l'action de ce gène suppresseur de tumeur mais dépend de l'inhibition des MCT1 par L'ACCA. En effet, ce dernier, par son action sur les MCT1, a la capacité d'inhiber efficacement la croissance des cellules cancéreuses mammaires sauvages et p53 mutantes. De plus, il est important de noter que la viabilité et la prolifération des cellules épithéliales humaines normales immortelles de poitrine HBL100 n'ont pas été significativement inhibées par l'ACCA aux concentrations s'étendant de 25 à 200  $\mu$ M, des concentrations qui ont significativement déclenché la mort cellulaire au niveau des lignées cancéreuses MDA-231, MCF-7 et T47D.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'ACCA inhibe significativement la migration, l'invasion et la prolifération tumorale des MDA-231 *in vivo*. Ces données vont dans le même sens que les études précédentes, démontrant des effets antiprolifératifs semblables de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique à travers l'inhibition des transporteurs du lactate <sup>(106, 117, 121)</sup>, et suggèrent que l'ACCA posséderait une activité thérapeutique potentielle contre les lignées cancéreuses mammaires, sans affecter la viabilité de cellules saines.

De plus, les membres de la famille des Bcl-2 sont des éléments importants dans le maintien de l'homéostasie entre la survie et la mort cellulaire <sup>(131)</sup>. Cette étude démontre que l'ACCA a la capacité d'induire l'apoptose dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires. La mort cellulaire déclenchée par l'ACCA est accompagnée d'une surexpression de la protéine proapoptotique Bax tandis que les niveaux de Bcl-2 sont significativement diminués.

Aussi, nos résultats confirment les études de ces dernières années <sup>(132-135)</sup>, et apportent la preuve de l'existence d'une mort cellulaire indépendante de p53.

- **Propriétés synergiques des dérivés D1 et D2.**

Dans le but d'amplifier l'activité du resvératrol naturel, nous l'avons utilisé comme matière première pour aboutir à deux nouveaux dérivés, notamment **D1** et **D2**. L'ensemble des résultats est allé au-delà de nos attentes.

Le MTT assay indique clairement que, sur les cellules cancéreuses MDA-MB 231 et MCF-7, les nouveaux dérivés **D1** et **D2**, à une concentration de 100µM, entravent le développement du cancer du sein de manière plus significative que le resvératrol, le 3-BrPA ou l'ACCA utilisés comme références. Nous pensons que l'inhibition simultanée du stress oxydatif et du métabolisme énergétique ciblerait davantage les voies de signalisation pro-apoptotiques et serait, par conséquent, à l'origine de cet important effet antiprolifératif observé.

De plus, l'efficacité de la chimiothérapie seule associant la Dox, le 5-FU et le CPA dans le traitement du cancer du sein a été confirmée <sup>(136)</sup>. En effet, cette trithérapie synergique induit la mort cellulaire des lignées cancéreuses MDA-MB 231 et MCF-7 par apoptose. Ce résultat a pour origine la libération du cytochrome C mitochondrial et l'activation des caspases 9, 7 et 3.

Chacun de nos produits a été testé séparément, puis en association avec le cocktail thérapeutique mentionné ci-dessus. Les résultats des essais individuels de nos produits ont déjà été décrits plus hauts et sont similaires à ceux obtenus lors de leur association avec la trithérapie classique. Ceci nous permet de déduire que cette association n'est pas à l'origine d'un effet antiprolifératif synergique. En revanche, l'association du 3-BrPA, à une dose non efficace en elle-même (25µg/ml), avec la trithérapie conventionnelle, constitue une combinaison active dans la diminution de la prolifération du cancer du sein.

**CONCLUSION**

**PERSPECTIVES D'AVENIR**

- **Conclusion**

La toxicité des anticancéreux actuellement utilisés dans le traitement des cancers du sein, notamment **la doxorubicine, le 5-Fluorouracile et le Cyclophosphamide**, entraîne d'importantes perturbations au niveau du tractus gastrointestinal des patients, des chutes de cheveux, une diminution du taux des cellules sanguines, des mucites, de sévères douleurs musculaires ou articulaires ainsi que des troubles cardiaques, pouvant conduire à une modification ou un arrêt du traitement anticancéreux.

A l'inverse, les résultats de nos travaux de recherches *in-vitro* ont démontré, non seulement que **le resvératrol**, ses dérivés **D1 et D2** ainsi que **l'ACCA** étaient à l'origine de remarquables effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur les lignées cancéreuses humaines mammaires, mais également que ces produits de synthèse avaient la propriété clé de compromettre sélectivement la viabilité des cellules tumorales en protégeant les cellules saines et en limitant la survenue des effets indésirables.

De part ces résultats remarquables, **le resvératrol**, ses dérivés **D1 et D2** ainsi que **l'ACCA**, constitueraient une cible thérapeutique très prometteuse dans le traitement du cancer du sein.

- **Perspectives d'avenir**

Notre étude a démontré que **l'ACCA** était à l'origine de nombreux effets antiprolifératifs *in-vivo* et *in-vitro*, de réelles propriétés pro- apoptotique et d'une remarquable sélectivité tumorale. Par conséquent, il est nécessaire d'appuyer davantage ces résultats en effectuant des essais précliniques afin d'étudier la cinétique de **l'ACCA**, de pouvoir déterminer les doses effectives extrapolables chez l'humain et de confirmer l'absence de survenue d'effets indésirables à long terme.

De plus, étant donné les résultats antiprolifératifs impressionnant que nous avons obtenus avec les dérivés **D1 et D2**, des études plus approfondies devraient être réalisées dans le but de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'activité anticancéreuse des ces produits.

Finalement, les perspectives d'exploration d'éventuelles autres propriétés thérapeutiques (diabète, SIDA, cancer de la prostate, etc), relatives à nos substances, et de synthèse de nouveaux dérivés seraient d'une grande utilité dans le combat contre ces maladies qui demeurent toujours incurables.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**



## **I. Partie « chimie »**

### **Descriptif expérimental**

#### **A. Solvants et Réactifs**

Tous les réactifs et les solvants commerciaux utilisés pour la synthèse proviennent de Sigma Aldrich (Prochima, Sigma, Tlemcen). La plupart des solvants pour les synthèses en milieu anhydre ont été purifiés avec les méthodes classiques. Les réactifs commerciaux pour la synthèse ont été utilisés sans purification préalable.

#### **B. Spectres**

Les spectres d'absorption infra-rouge ont été enregistrés au centre de mesure du laboratoire COSNA sur un spectromètre Mattson Genesis II FTIR, et les valeurs de fréquences sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$ . Les produits huileux ont été directement traités dans des cellules sous forme de film, et les solides ont été analysés sous forme de pastilles de KBr.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés au laboratoire des macromolécules de l'Université d'Oran Es-Sénia sur un spectromètre BRUCKER 300MHz soit dans  $\text{CDCl}_3$  ou le  $\text{DMSO-d}_6$  selon les cas. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en ppm. La multiplicité des signaux est désignée par les abréviations suivantes: (s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz (Hz).

#### **C. Points de fusion :**

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un fusionomètre digital Electrothermal 900.

### I.1. Synthèse de l'acide 3-bromopyruvique (3-BrPA)

L'acide pyruvique (8ml, 0,11mol) est dissous dans du  $\text{CCl}_4$  et la solution est chauffée à  $50^\circ\text{C}$  dans un tricol muni d'un réfrigérant protégé par une garde à chlorure de calcium. Ensuite, on ajoute goutte à goutte et en agitant le brome (6ml, 0,23mol), préalablement séché par lavage avec l'acide sulfurique concentré (10ml). Le chauffage est maintenu pendant 45 min. Le sirop obtenu est immédiatement placé dans dessiccateur sous vide contenant du KOH avec de fréquents renouvellements de base jusqu'à arrêt du dégagement des vapeurs de HBr. Le résidu est gardé et réduit en fine poudre. Le produit obtenu est recristallisé dans du chloroforme sec. Rendement: 16,11g (85%); Point de fusion:  $80^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,98 (s, 2H,  $\text{BrCH}_2$ ), 10,28 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).

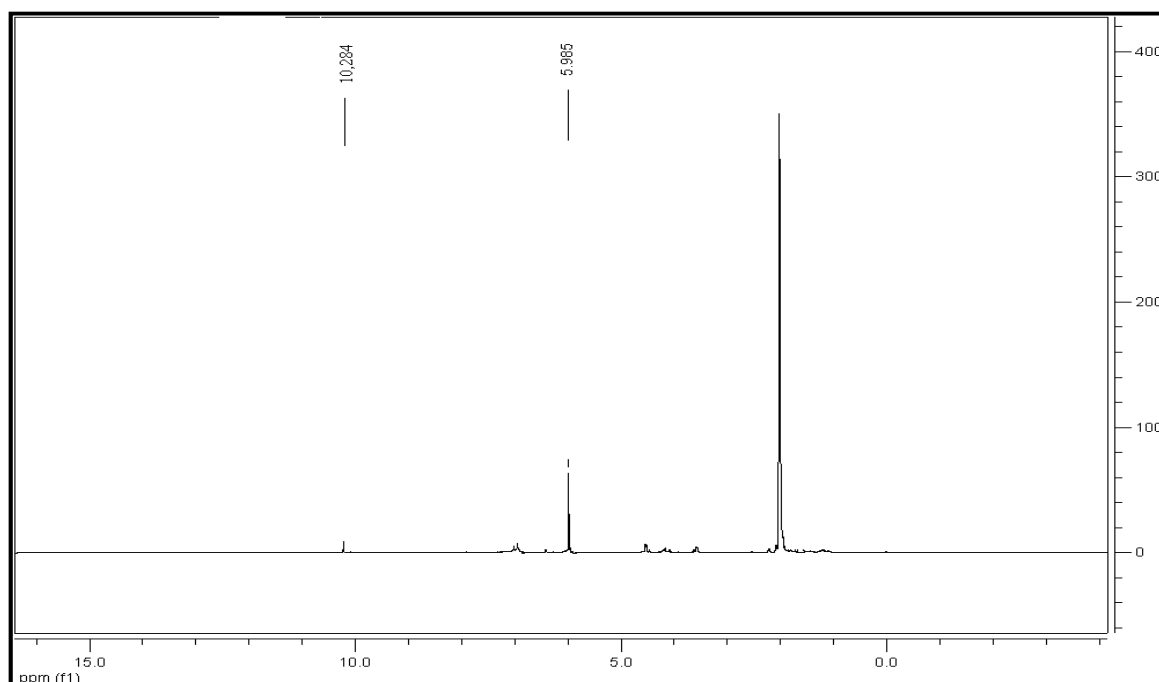


Figure 35. Spectre RMN du 3-BrPA

## I.2. Synthèse de l'acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (ACCA)

### I.2.1. Synthèse du cyanoacétate d'éthyle

(20.4g, 0.24moles) d'acide cyanoacétique sont dissous dans 27 mL d'éthanol absolu. Du  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré (0,5ml) est ajouté à la solution précédente et le tout est porté à reflux pendant 3h. Au bout de ce temps, l'excès d'alcool et l'eau de la réaction sont éliminés sous vide avec le bain de l'évaporateur rotatif maintenu à  $60^\circ\text{C}$ , puis le mélange est refroidi à température ambiante. On neutralise le résidu avec une solution aqueuse concentrée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3x40ml). Les extraits organiques réunis sont mis à sécher sur  $\text{MgSO}_4$  et le solvant est éliminé sous vide. Le liquide incolore obtenu, correspondant à l'ester, est purifié par distillation sous vide à  $97-98^\circ\text{C}$ . Rendement: 13,02g (48%); Point d'ébullition:  $98^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.21 (t,  $J= 7\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.43 (s, 2H,  $\text{CN-CH}_2$ ), 4.14 (q,  $J= 7\text{Hz}$ , 2H,  $\text{OCH}_2$ ).

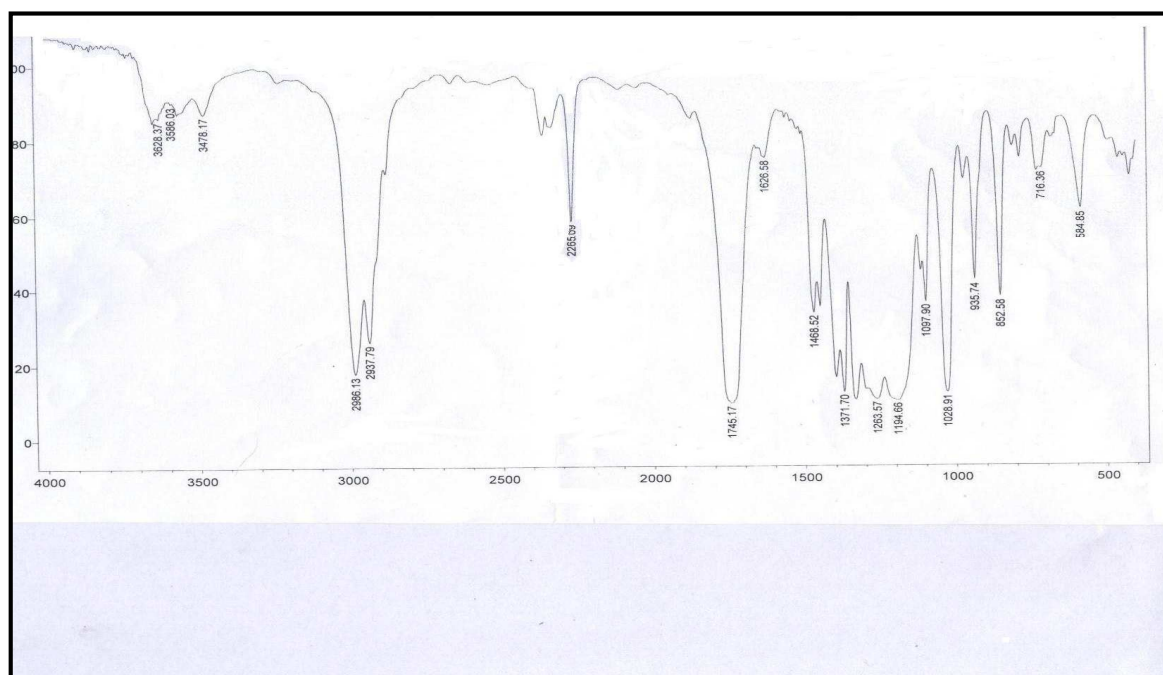


Figure 36. Spectre IR du cyanoacétate d'éthyle

### I.2.2. Synthèse de l'ester $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamate d'éthyle (ACCE)

Dans un tricol sec, contenant de l'éthanol anhydre et muni d'un réfrigérant, introduire le cyanoacétate d'éthyle (7,4g, 65mmol), du sodium propre (1g, 44mmol) et de la vanilline (6.7g, 44mmol) tout en maintenant l'ensemble à 5°C. L'agitation est poursuivie jusqu'à dissolution totale du Na. Après 30 min d'agitation supplémentaire, l'acide acétique glacial (5ml) est ajouté et la réaction est maintenue pendant une nuit à température ambiante. Au bout de ce temps, l'eau distillée (10ml) est prudemment additionnée goutte à goutte, dans un bain de glace. La phase aqueuse est extraite avec l'acétate d'éthyle (25ml) et les phases organiques réunies sont traitées avec du HCl à 50% jusqu'à obtenir un  $\text{pH} \leq 2$ . La couche organique est séparée, lavée avec de l'eau puis de la saumure, puis séchée sur sulfate de magnésium. Un solide jaune est obtenu après évaporation des solvants. Rendement: 10,97g (61%); Point de fusion: 65°C;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1,24 (t,  $J= 7\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,80 (s, 1H, OH), 4,23 (q,  $J= 7\text{Hz}$ , 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 5,35 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7,0(s, 1H, Ar), 7,62 (s, 1H, Ar), 7,76 (s, 1H, Ar), 8,24 (s, 1H, H vinylique).

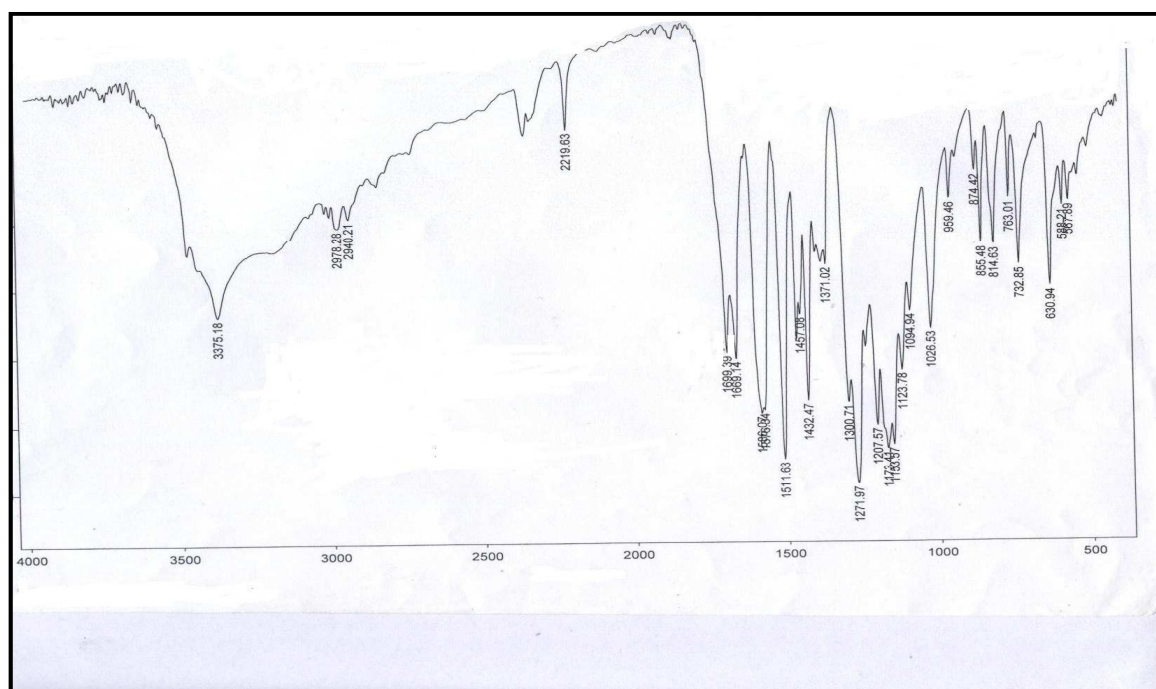


Figure 37. Spectre IR de l'ACCE

### I.2.3. Synthèse de l'ACCA

Dans un tricol sec muni d'un réfrigérant, l'ACCE (10.9g, 44mmol) est dissous dans le méthanol (30ml) ; la solution obtenue est additionnée goutte à goutte et à 0°C à une solution de LiOH/ H<sub>2</sub>O (1,1g, 44mmol). La réaction est poursuivie pendant une nuit à température ambiante. Au bout de 24h, le méthanol est éliminé sous vide et la phase aqueuse est lavée avec l'acétate d'éthyle (30ml). La phase aqueuse est acidifiée avec une solution de HCl (pH ≤ 2), puis extraite avec l'acétate d'éthyle (3x30ml). L'extrait est lavé avec de la saumure puis mis à sécher sur sulfate de magnésium. Le solide jaunâtre est obtenu après évaporation des solvants. Rendement: 9,47g (98%); Point de fusion: 97°C; <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 3.98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.73 (s, 1H, OH), 6.67 (d, *J*= 1.8Hz, 1H, Ar), 7.60 (d, *J*=1.8Hz, 1H, Ar), 7.85 (d, *J*= 1.8Hz, 1H, Ar), 8.16 (s, 1H, H vinylique), 9.82 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H).

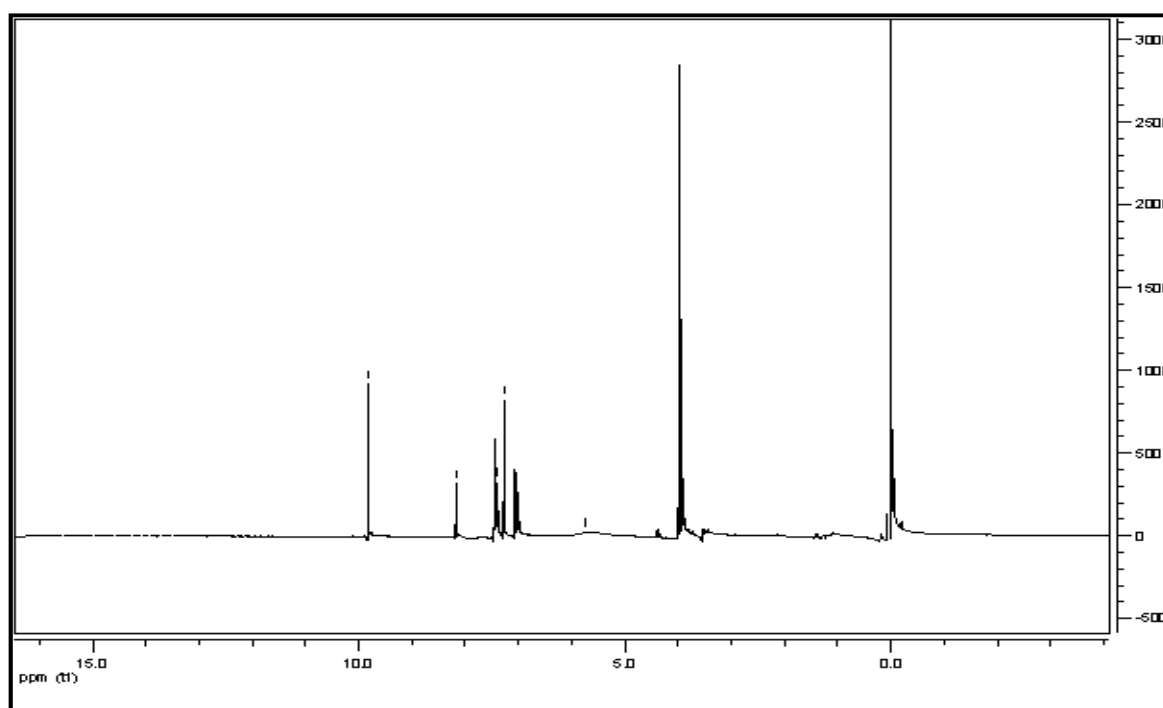


Figure 38. Spectre RMN de l'ACCA

### I.3. Synthèse du resvératrol

#### I.3.1. Synthèse de l'acide p-méthoxybenzoïque

Dans un bicol de 250ml muni d'un réfrigérant, dissoudre l'acide p-hydroxybenzoïque (10g, 72,40mmol) dans le méthanol à 99,5% (100ml). Ajouter lentement et à froid du sodium bien propre (2,6g, 113,04mmol), en lui laissant le temps de bien passer en solution. Une fois la solution homogène obtenue, porter à reflux durant 20 mn puis, ajouter très lentement, par le haut du réfrigérant à l'aide d'une ampoule à décanter, le diméthylsulfate (35ml,) jusqu'à obtention d'un pH acide. Refroidir et ajouter prudemment, toujours par le haut du réfrigérant, une solution aqueuse de NaOH à 30% (50ml) jusqu'à obtenir un pH basique. A la dernière solution ainsi obtenue et refroidie, ajouter de l'eau (50ml) ; extraire avec l'éther (3x50ml). La phase aqueuse est acidifiée à froid avec du HCl concentré (25ml). Le solide formé qui se dépose est séparé par filtration sur Buchner puis mis à sécher. Rendement: 7,93g (72%); Point de fusion: 178°C;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7,19 (d,  $J= 2\text{Hz}$ , 2H, Ar), 8,0(d,  $J= 2\text{Hz}$ , 2H, Ar), 10,9(s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).

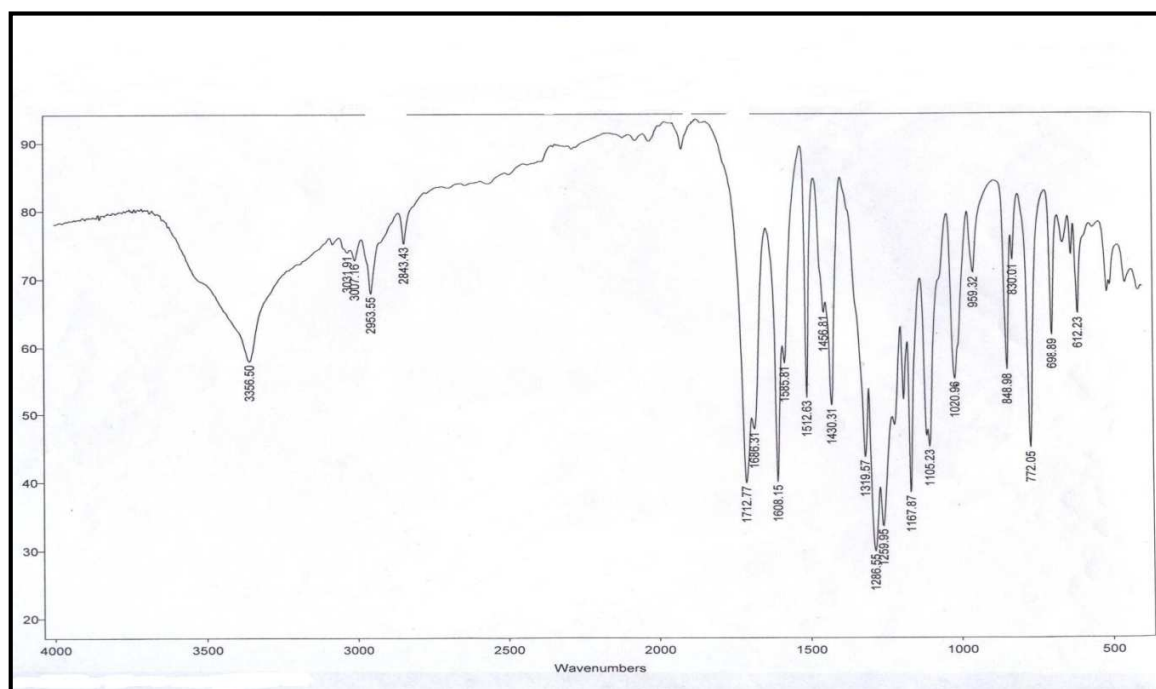


Figure 39. Spectre IR de l'acide p- méthoxybenzoïque

### I.3.2. Synthèse de l'alcool p-méthoxybenzylique

L'acide p-méthoxybenzoïque (3,5g, 23mmol) est ajouté à l'aide d'un entonnoir à solide dans un tricol muni d'un réfrigérant sous courant d'azote, contenant une suspension refroidie à 0°C de LiAlH<sub>4</sub> (3,5g, 92 mmol) dans le THF anhydre (30ml). Le reste de l'acide récupéré est dissous dans 20ml de THF anhydre et ajouté à la suspension par une ampoule à addition, en l'absence d'humidité. Laisser agiter une nuit à température ambiante. Refroidir le mélange réactionnel dans un bain de sel et de glace pour éviter tout emballement puis hydrolyser précautionneusement le mélange avec une solution à 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jusqu'à l'obtention d'un pH acide. Séparer la phase organique ; extraire la phase aqueuse avec l'éther (3x20ml) ; les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium. Filtrer et éliminer le solvant sous vide. Le résidu blanc obtenu se solidifie à température ambiante. Rendement: 2,09g (66%); Point de fusion: 25°C; <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 3,60 (s, 1H, OH), 3,70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,89 (d, J= 2Hz, 2H, Ar), 7,0 (d, J= 2Hz, 2H, Ar).

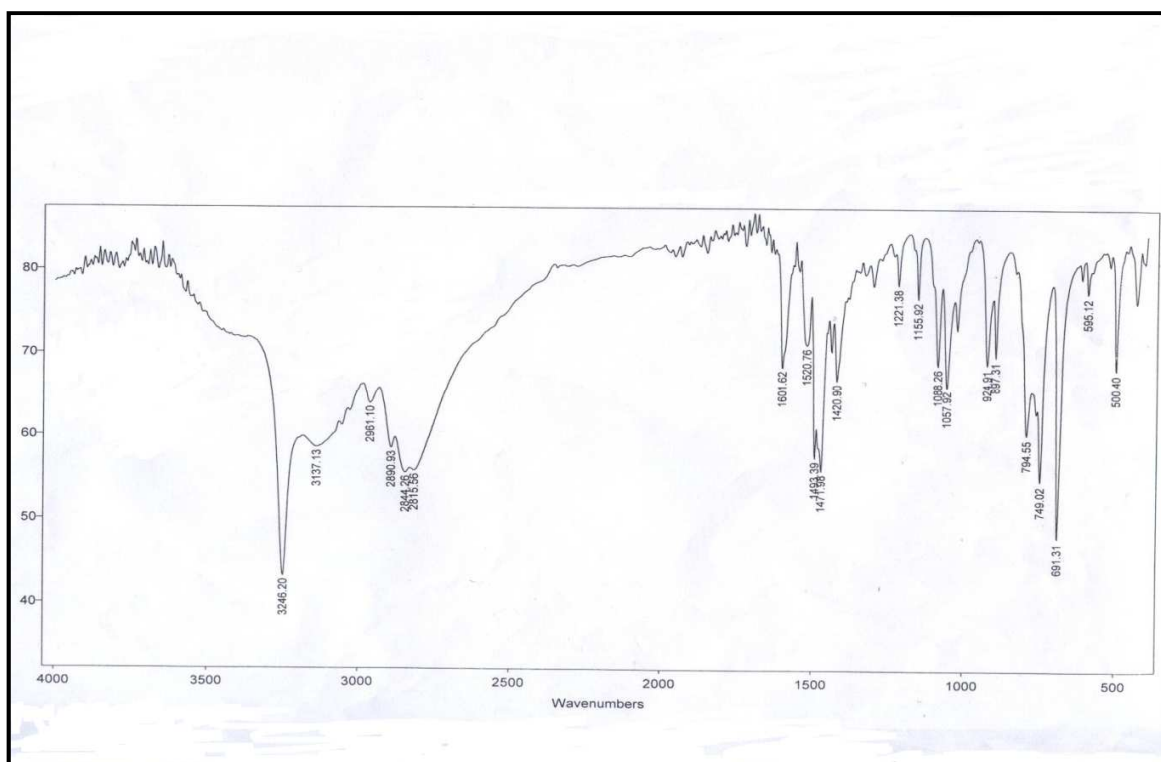


Figure 40. Spectre IR de l'alcool p-méthoxybenzylique

### I.3.3. Synthèse du 1-bromométhyl-p-méthoxybenzène :

Dans un ballon de 50 ml, on introduit l'alcool p-méthoxybenzylique (1.5 g, 10,85 mmol) puis une solution commerciale de l'acide bromhydrique 48% (18.6 mmol). Le mélange est porté à reflux durant 2h. Au bout de ce temps, on ajoute 10 ml d'eau et on effectue une extraction avec l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium à 5% puis avec une solution saturée de NaCl. Après séchage et filtration de la phase organique, on la débarrasse du solvant par évaporation sous pression réduite. Le résidu obtenu avec un rendement de 1,5g (69%) cristallise au repos. Ebullition: 90°C;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,60 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 6,89 (d,  $J=2\text{Hz}$ , 2H, Ar), 7,0 (d,  $J=2\text{Hz}$ , 2H, Ar).

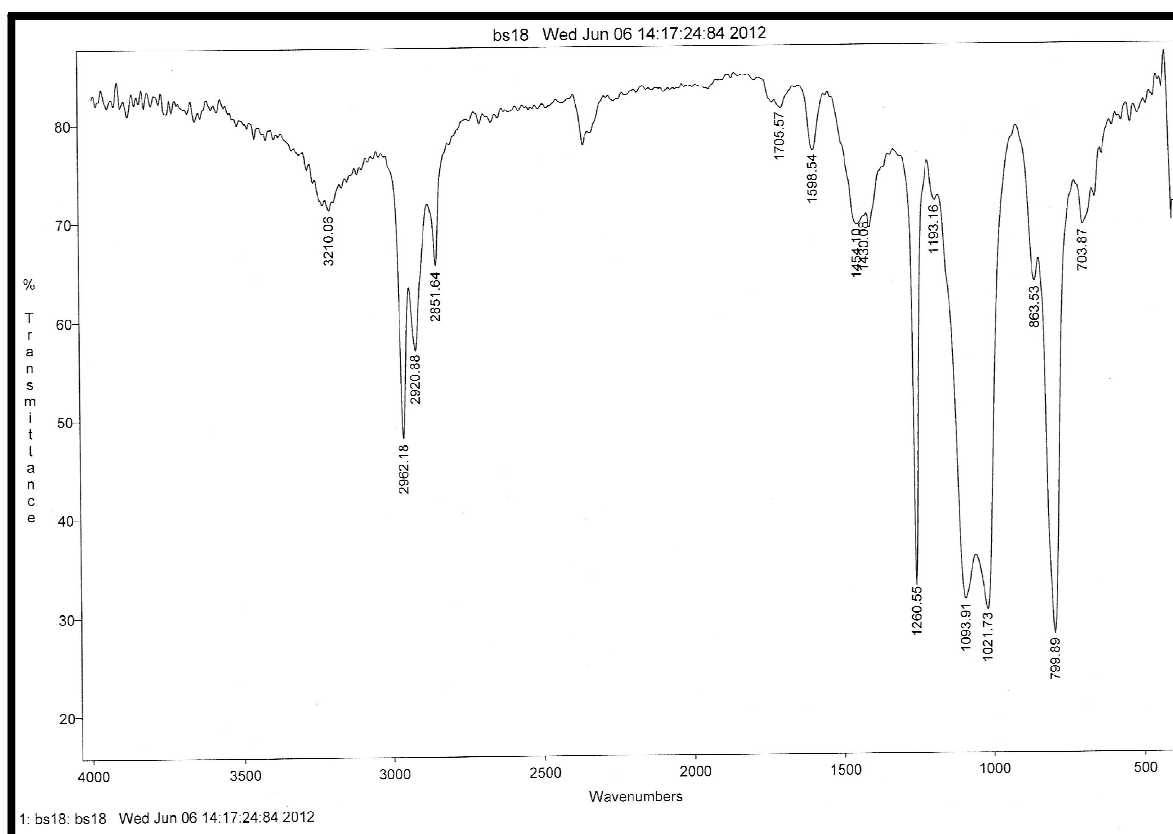


Figure 41. Spectre IR du 1-bromométhyl-p-méthoxybenzène



### I.3.4. Synthèse du 3,5-diméthoxybenzaldéhyde

Dans un bicol de 250ml muni d'une agitation magnétique et d'un réfrigérant surmonté d'une garde de chlorure de calcium, on introduit (2,82g, 122.82 mmol) de sodium et on le laisse réagir avec le méthanol, puis on ajoute (10g, 72,40 mmol) de 3,5-dihydroxybenzaldéhyde. On porte le mélange à reflux durant 30 min. Après l'ajout de diméthylsulfate (8,08 ml, 85,15 mmol), le mélange réactionnel est porté à reflux durant 2h. Le solvant est chassé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Au résidu obtenu on ajoute 30 ml d'eau. La phase aqueuse est légèrement acidifiée avec 35 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 5% à environ pH = 5 ; elle est ensuite extraite 3 fois avec l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont successivement lavées avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 5%, une solution saturée de NaCl et enfin avec de l'eau ; elles sont ensuite séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées puis concentrées. Le résidu qui reste se solidifie à température ambiante et possède un point de fusion de 40°C ; rendement : 11,18g (93%). <sup>1</sup>H RMN (δ, CDCl<sub>3</sub>): 3,80 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 6,29 (s, 1H, Ar), 6,69 (s, 2H, Ar), 10,0 (s, 1H, CH=O).

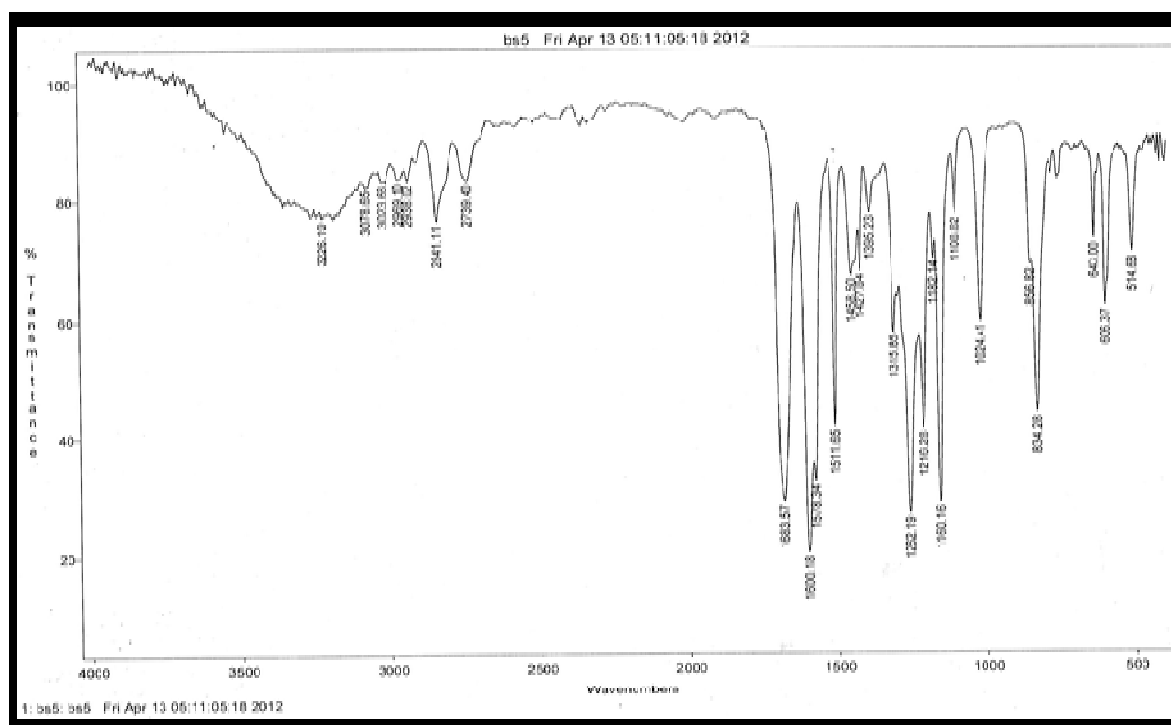


Figure 42. Spectre IR du 3,5-diméthoxybenzaldéhyde

### I.3.5. Synthèse du resvératrol

#### a) synthèse du phosphonate

Dans un bicol de 100 ml, on introduit le bromométhyl-4-méthoxybenzène (1,5g, 7,4mmol) et le triéthylphosphite (4,84g, 5ml, 29,16mmol). Le mélange est chauffé à 165°C durant 6h et sous courant d'azote. Par la suite, on refroidit à température ambiante et l'excès de triéthylphosphite est éliminé par distillation sous vide. Le résidu qui reste dans le ballon est un liquide incolore. Rendement : 6,92g (92%). Son spectre RMN dans le chloroforme deutéré montre les caractéristiques suivantes : 1,24 (t,  $J=7,5\text{Hz}$ , 6H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,0 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2$ ), 3,79 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,24 (q,  $J=7,5\text{Hz}$ , 4H,  $\text{OCH}_2$ ), 6,80 (d,  $J=1,8\text{Hz}$ , 2H, Ar), 7,10 (d,  $J=1,8\text{Hz}$ , 2H, Ar).

**b) synthèse du triméthoxystilbène** : dans un bicol de 100 ml placé sous courant d'azote, on prépare le méthanolate de sodium par dissolution de Na (1g, 18,5mmol) dans le méthanol (50 ml). Ensuite, le diméthylformamide sec (20mL) et le phosphonate (4,13g, 16mmol) sont ajoutés à la solution précédente. Le tout est ensuite refroidi à 0°C sous courant d'azote et on ajoute lentement le 3,5-diméthoxybenzaldéhyde (3,12g, 18,8 mmol) en gardant la température à 0°C. On laisse le mélange remonter à température ambiante et on laisse reposer durant 1h. On porte le tout à 100°C pendant 1h, puis on le laisse reposer 12h à température ambiante. On ajoute ensuite 30 ml d'un mélange de méthanol et d'eau (2 :1) et on filtre le solide qui se dépose. Ce solide est lavé sur Büchner avec de l'hexane, puis on le recristallise dans le méthanol pour obtenir 3,46g (80%) d'un solide blanc.  $^1\text{H}$  RMN ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,80 (s, 9H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,18 (d,  $J=2\text{Hz}$ , 1H, Ar), 6,80 (d,  $J=2\text{Hz}$ , 2H, Ar), 7,0 (d,  $J=2,1\text{Hz}$ , 2H, Ar), 6,92 (d,  $J=16,2\text{Hz}$ , 1H, H vinylique), 7,0 (d,  $J=1,9\text{Hz}$ , 2H, Ar), 7,12 (d,  $J=16,2\text{Hz}$ , 1H, H vinylique), 7,70 (d,  $J=1,9\text{Hz}$ , 2H, Ar).  $^{13}\text{C}$  RMN: 54,8 ; 100,0 ; 105,3 ; 113,9 ; 123,9 ; 127,1 ; 129,8 ; 130,1 ; 139,8 ; 160,9.

#### c) Déméthylation :

Un mélange du produit précédent (2g, 7,3 mmol) et du chlorhydrate de pyridinium (10,2g, 88,8 mmol) est chauffé à reflux entre 180-190°C durant 4h. On refroidit à température ambiante puis on dilue le tout avec de l'eau glacée. Ensuite, on acidifie avec du HCl dilué et on procède à une extraction avec l'acétate d'éthyle (3x 30ml).

Les extraits sont réunis et lavés successivement avec de l'eau, de la saumure et finalement séchés sur sulfate de calcium. Le solvant est enlevé sous vide et le résidu résultant est purifié sur colonne de gel de silice avec comme éluant, un mélange de chloroforme et de méthanol. On obtient 1,40g (83%) de produit pur après évaporation de l'éluant. Fusion 254°C ; IR (KBr) : 3450, 1612, 1529, 1180, 1013, 958, 833. <sup>1</sup>H RMN (δ, DMSO-d<sub>6</sub>) : 6,12 (d, J= 2Hz, 1H, Ar), 6,39 (d, J=2Hz, 2H, Ar), 6,80 (d, J=7Hz, 2H, Ar), 6,90 (d, J=16,4Hz, 1H), 7,20 (d, J=16,4Hz, 1H), 7,30(d, J= 7Hz, 2H, Ar), 9,2 (s large, 2H), 9,50 (s large, 1H). <sup>13</sup>C RMN: 101 ; 103,9 ; 115,7 ; 127,3 ; 129,8 ; 139,9 ; 156,8.

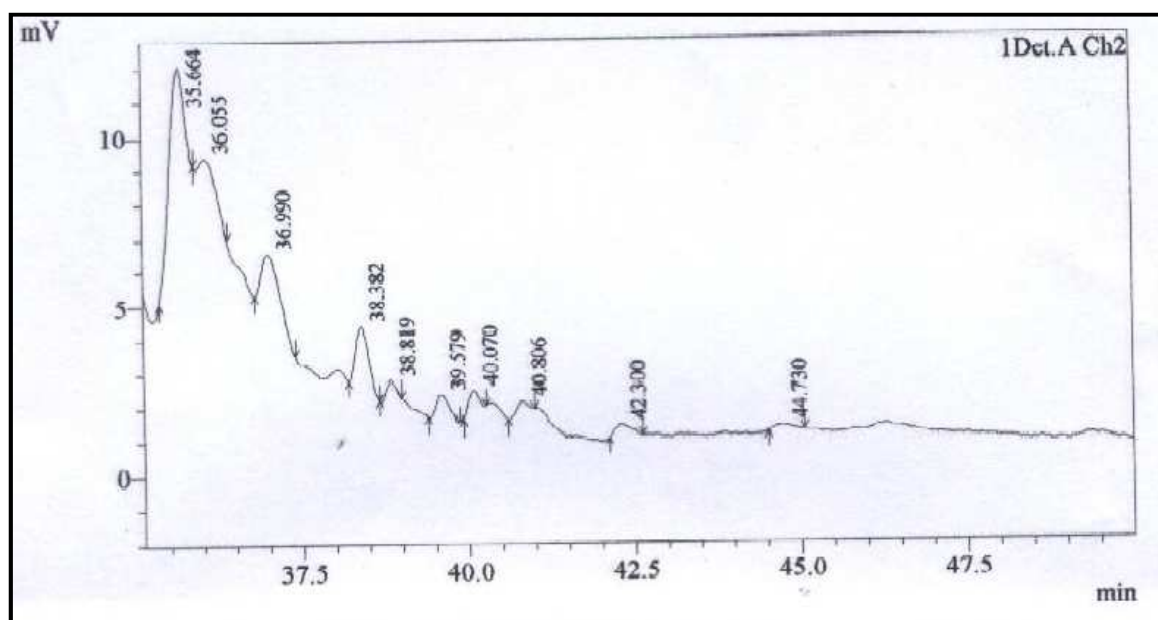
#### I.4. Extraction

##### I.4.1. Extraction du resvératrol à partir de la peau des raisins rouges (espèce : *Vitis vinifera*)

- 3Kg de raisin rouge (espèce algérienne non traitée) sont recueillis en début septembre 2011;
- Les raisins sont pelés à la main et la peau est conservée à -20°C jusqu'à l'extraction ;
- L'échantillon (0,2g de peau de raisin rouge) est protégé de la lumière, au cours de l'acheminement jusqu'au laboratoire ;
- L'homogénéisation de l'échantillon s'effectue dans 25ml d'un mélange Ethanol/Eau (v/v : 80/20) pendant 30 min à 60°C, sur une plaque chauffante couplée à un système d'agitation magnétique ;
- L'extrait est filtré et le filtrat récupéré est centrifugé à 3500 t/min pendant 15min ;
- Le surnageant obtenu est conservé à -20C° jusqu'au dosage.

**Tableau 5. Conditions analytiques de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour le dosage du resvératrol**

<b>Phase stationnaire</b>	Colonne C18 (25 cm x 0,4cm), 5 µm particules
<b>Phase Mobile</b>	Solvant A: acide acétique glacial dans l'eau (52.6:900) (v/v) Solvant B : mélange 20% phase A + 80% d'acétonitrile.
<b>Elution</b>	0 min, 83.5% A, 16.5% B; 13 min, 82.0% A, 18.0% B; 17 min, 77.0% A, 23.0% B; 21 min, 75.0% A, 25.0% B; 27 min, 68.5% A, 31.5% B; 30 min, 100% A, 0% B
<b>Débit</b>	1 mL/min
<b>Limite de détection</b>	0,003 mg/L
<b>Limite de quantification</b>	0,01mg/L
<b>Température</b>	25°C
<b>Détection UV</b>	306nm
<b>Injection</b>	100µl

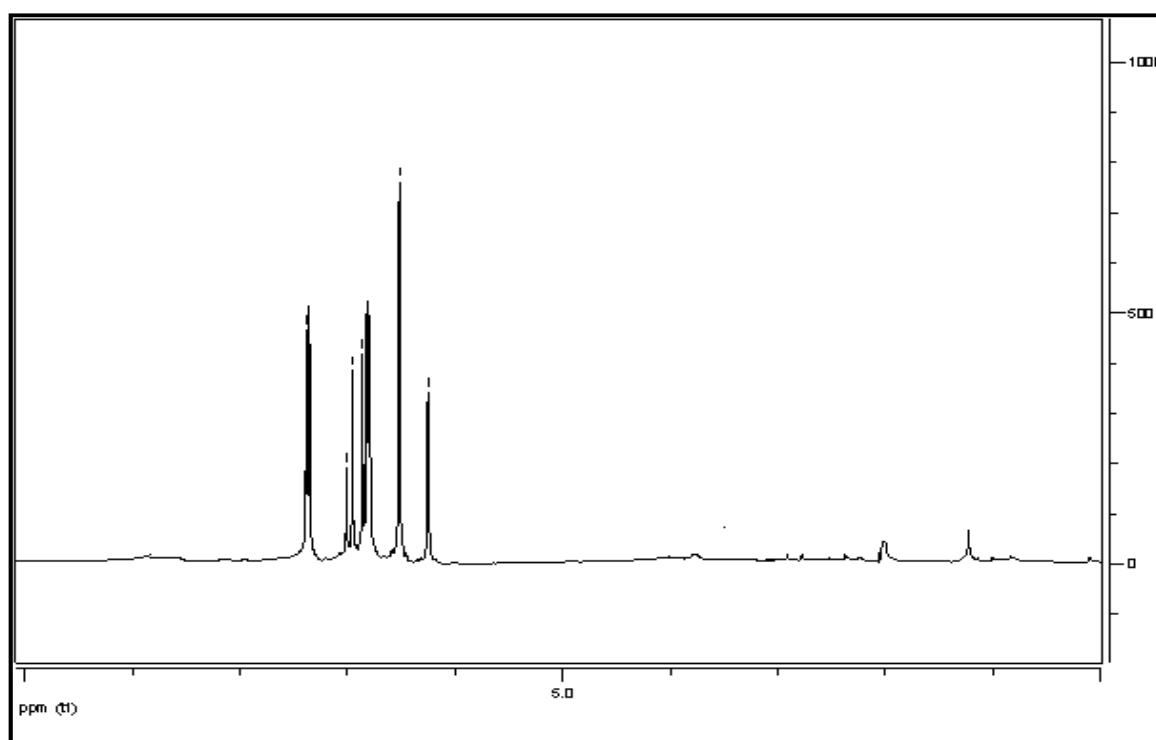


**Figure 45.** Chromatogramme HPLC obtenu à 306nm correspondant à l'extrait de la peau du raisin rouge

**I.4.2. Extraction du resvératrol à partir du produit commercial (espèce *Polygonum cuspidatum*)**

- Dans L'obscurité, 8 comprimés (2g de resvératrol) sont broyés manuellement dans 100ml d'éthanol pur; Agitation pendant 30min à 60°C;
- Filtration du solide et évaporation de l'extrait ;
- Le résidu obtenu est dissous dans l'éther ;
- Le filtrat est éliminé et le solide obtenu est soumis à une recristallisation dans un mélange éthanol/eau (v/v: 10/90) à 60°C pendant 30 min;
- Le filtrat récupéré est conservée à 4°C pendant 4 jours;

Le resvératrol se dépose sous forme d'une poudre beige. Rendement: 1,32g (66%); Point de fusion: 250°C;  $^1\text{H RMN}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 6,25 (t,  $J= 2\text{Hz}$ , 1H, Ar), 6,52 (d,  $J= 2\text{Hz}$ , 2H, Ar), 6,79 (d,  $J= 8,5\text{Hz}$ , 2H, Ar), 6,82 (d,  $J= 16,5\text{Hz}$ , 1H), 6,95 (d,  $J= 16,5\text{Hz}$ , 1H), 7,01 (d,  $J= 8,70\text{Hz}$ , 2H, Ar), 7,35 (s large, 2H), 7,38 (s large, 1H).



**Figure 46.** Spectre  $^1\text{H RMN}$  du resvératrol

## II. Partie « Biochimie »

Préparations des solutions, tampons et gels pour le test du Western Blot

### II.1. Tampons

#### II.1.1. Tampon de migration 1X

Matériel	Quantité
Tris	30,3g
Glycine	144g
SDS	10g
Volume final de 1 litre	

#### II.1.2. Tampon de charge 5X

Matériel	Quantité
Glycerol 5%	5ml
Tris- Hcl (PH=6,8	2,5ml
SDS	1g
Bromophenol blue	0,2% ou 0,5 ml
Compléter le volume à 10ml avec l'eau distillée	

#### II.1.3. Tampon de transfert

Matériel	Quantité
Tris	3,03g
Glycine 192mM	14,4g
Ethanol 20%	200ml
Volume final de 1 litre	

## II.2. Solutions

### II.2.1. Tris solutions

PH	Molarité	Quantité ajoutée	Volume final
Tris 8,8	1,5M	90,58g	500ml
Tris 6,8	0,6M	36,34g	500ml

### II.2.2. TBS-Tween solutions: tampon TBS PH =7,6 1X

Matériel	Quantité
Tris 20mM	2,42g
NaCl 137mM	8g
Volume final de 1litre	

### II.3.Composition du gel de concentration à 12%

Gels 12% 5ml	3gels
H <sub>2</sub> O	4,8ml
Tris-HCl pH 8,8	3,9 ml
Acryl - Bisacryl	6 ml
SDS 10%	150 µl
APS	135 µl
TEMED	18 µl

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. Bray, F.; Ren, J.S.; Masuyer, E.; Ferlay, J. *Int. J. Cancer*. **2012**, *10*, 1002.
2. Sondik, E.; J. *Cancer*.**1994**, *74*, 995.
3. Moss, S.M. *Cancer*. **1997**, *79*, 1.
4. Le Bail, J.C. ; Liagre, B. ; Vergne, P. ; Bertin, P. ; Beneytout, J.L. ; Habrioux, G. *Steroids*. **2001**, *66*, 749.
5. Moalic, S.; Liagre, B.; Corbière, C.; Bianchi, A.; Dauça, M.; Bordji, K.; Beneytout, J.L. *FEBS. Lett.* **2001**, *506*, 225.
6. Aggarwal, B.B.; Bhardwaj, A.; Aggarwal, R.S.; Seeram, N.P.; Shishodia, S.; Takada, Y. *Anticancer. Res.* **2004**, *24*, 2783.
7. Mgbonyebi, O.P.; Russo, J.; Russo, I.H. *Int. J. Oncol.* **1998**, *12*, 865.
8. Liu, X.; Zheng, X.; Wang Y. *Chin. Med. J.* **2009**, *122*, 168.
9. Banje, J.; Zwick, E.; Ullrich, A. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 548.
10. Diers, A.R.; Broniowska, K.A.; Chang, C.F.; Hogg, N. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 561.
11. Nakagawa, H.; Kiyozuka, Y.; Uemura, Y.; Senzaki, H.; Shikata, N.; Hioki, K.; Tsubura, A. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2001**, *127*, 258.
12. Damianaki, A.; Bakogeorgou, E.; Kampa, M.; Notas, G.; Hatzoglou, A.; Panagiotou, S.; Gemetzi, C.; Kouroumalis, E.; Martin, P.M.; Castanas, E. *J. Cell. Biochem.* **2000**, *78*, 429.
13. Kim, Y.A.; Choi, B.T.; Lee, Y.T.; Park, D.I.; Rhee, S.H.; Park, K.Y.; Choi, Y.H. *Oncol. Rep.*, **2004**, *11*, 441.
14. Scarlatti, F.; Sala, G.; Somenzi, G.; Signorelli, P.; Sacchi, N.; Ghidoni, R. *Faseb. J.* **2003**, *17*, 2339.
15. Halestrap, A.P.; Meredith, D. *Pflugers Arch.* **2004**, *447*, 619.
16. Halestrap, A.P.; Price, N.T. *Biochem. J.* **1999**, *343*, 281.
17. Abid, L. *African Journal of Cancer*. **2009**, *1*, 98.
18. Okahashi, N.; Koide, M. *Bone*. **1998**, *23*, 33.
19. Kameda, T.; Ishikawa, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *207*, 753.
20. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. *Br. J. Cancer*. **1972**, *26*, 239.
21. Krammer, P. H. *Nature*. **2000**, *407*, 789.
22. Roux, S.; Lambert-Comeau, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *333*, 42.
23. Bouillet, P.; Purton, J.F. *Nature*. **2002**, *415*, 922.
24. Gross, A.; McDonnell, J.M. *Genes. Dev.* **1999**, *13*, 1899.
25. Pantel, K.; Brakenhoff, R.H. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, *4*, 448.
26. Chambers, A. F.; Naumov, G.N. *Breast. Cancer. Res.* **2000**, *2*, 400.

27. Pasero, C.; Olive, D. *Bulletin du cancer*. **2008**, 95, 691.
28. Fulda, S. *Int. J. Cancer*. **2009**, 124, 511.
29. Gao, Y.; Hu, N.; Han, X. Y.; Ding, T. ; Giffen, C.; Goldstein, A.M.; Taylor P.R. *Cancer. Epidemiol.* **2011**, 35, 91.
30. Brady, L.W. *Cancer*. **1993**, 72, 3463.
31. Trimble, E. L. *Cancer*, **1993**, 72, 3515.
32. Israël, M.; Schwartz, L. *Cancer. Ed. John. Libbey. Eurotext*. **2005**.
33. Saglier, J.; Antoine, E.C. *Masson*. **1996**.
34. Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P.; Parkin, M.D. *IARC Press Lyon*. **2004**.
35. Zhang, X-D.; Varin, E. ; Lincet, H.; Allouche, S.; Paciencia, M.; Coquerel, A.; Poulain,
36. Morimoto, T.; Nagao, T.; Okazaki, K. *Breast. Cancer*. **2009**, 16, 2.
37. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E. *Cancer. J. Clin.* **2008**, 58, 71.
38. Nkondjock, A.; Ghadirian, P. *Med. Sci (Paris)*. **2005**, 21,175.
39. Key, T. J.; Verkasalo, P. K.; Banks E. *Lancet. Oncol.* **2001**, 2, 133.
40. Yoney, A.; Kucuk, A.; Unsal, M. *Cancer. Radiother.* **2009**, 13,103.
41. Kelsey, J. L.; Berkowitz, G. S. *Cancer. Res.* **1988**, 48, 5615.
42. Hill, C.; Doyon, F. *Cancer*. **2003**, 90, 207.
43. Ford, D.; Easton D. F.; Stratton M. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, 62, 676.
44. Wooster, R.; Weber, B. L. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 2339.
45. Berliner, J. L.; Fay, A. M. *J. Genet. Couns.* **2007**, 16, 241.
46. Ishikawa, Y.; Kameda, H. *Proc. of Fourth International Conference on Structural Safety and Reliability*. **1993**, 3, 2139.
47. Kroemer, G.; Reed, J.C. *Nat. Med.* **2000**, 6, 513.
48. Irigaray, P.; Newby, J. A.; Clapp, R. *Biomed. Pharmacother.* **2007**, 61, 640.
49. Seitz, H. K.; Becker, P. *Alcohol. Res. Health.* **2007**, 30, 38.
50. Nagata, C.; Mizoue, T.; Tanaka, K. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2006**, 36, 387.
51. Slattery, M. L.; Curtin, K.; Giuliano, A. R. *Breast. Cancer. Res. Treat.* **2008**, 109, 101.
52. Renehan, A. G.; Roberts D. L.; Dive C. *Arch. Physiol. Biochem.* **2008**, 114, 71.
53. Montazeri, A.; Sadighi, J.; Farzadi, F. *BMC. Cancer.* **2008**, 8, 278.
54. Thiebaut, A. C.; Kipnis V.; Chang S. C. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2007**, 99, 451.
55. Sieri, S.; Krogh, V.; Ferrari P. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, 88, 1304.

56. Moustafa, A. S.; Nicolson, G.L. *Oncol. Res.* **1997**, *9*, 505.
57. Levesque, M. A.; Yu, H. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 2641.
58. Rohan, T. E.; Hartwick, W. J. *Natl. Cancer. Inst.* **1998**, *90*, 1262.
59. Sullivan, A.; Yuille, M. *Oncogene*, **2002**, *21*, 1316.
60. Bosari, S.; Roncalli, M. *J. Pathol.* **1993**, *169*, 425.
61. Ottaviano, Y. L.; Issa, J. P. *Cancer .Res.* **1994**, *54*, 2552.
62. Barnes, D. M. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1993**, *17*, 132.
63. Jensen, R.; Thomson, M.E.; Jetton, T.L. *Nature. Genet.* **1996**, *13*, 269.
64. Kowalski, P. J.; Rubin, M.A. *Breast .Cancer. Res*, **2003**, *5*, 217.
65. Sies. *Academic Press : London.* **1991**, *15*, 22.
66. Saulnier, L.; Vigouroux, J.; Thibault, J.F. *Carbohydr. Res*, **1995**, *272*, 241.
67. Pincemail, J.; Meurisse, M.; Limet, R.; Defraigne, J.O. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* **1998**, *3*, 133.
68. Poulsen, H.E. *Eur. J. Cancer. Prev.* **1998**, *7*, 9.
69. Palmer, H.J. ; Paulson, K.E. *Nutr. Rev.* **1997**, *55*, 353.
70. Pincemail, J.; Meurisse, M.; Limet, R.; Defraigne, J.O. *Medi-Sphere.* **1999**, *97*, 29.
71. Diplock, A.T. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, *53*, 189.
72. Shklar, G. *Oral. Oncol.* **1998**, *34*, 24.
73. Croft, K.D. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1998**, *854*, 435.
74. Gamet-Payrastre, L.; Manenti, S.; Gratacap, M.P.; Tulliez, J.; Chap, H.; Payrastre, B. *Gen. Pharmacol.* **1999**, *32*, 279.
75. Plaumann, B.; Fritsche, M.; Rimpler, H.; Brandner G.; Hess, R.D. *Oncogene.* **1996**, *13*, 1605.
76. Wenzel, U.; Kuntz, S.; Brendel, M.D.; Daniel, H. *Cancer. Res.* **2000**, *60*, 3823.
77. Arichi, H. ; Kimura, Y.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arichi, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1766.
78. Pace-Asciak, C.R. *Clin. Chim. Acta.* **1995**, *235*, 207.
79. Jager, U.; Nguyen-Duong, H. *Arzneimittelforschung.* **1999**, *49*, 207.
80. Clark, G. *Disease of the breast.* **2000**, *2*, 489.
81. Das, S. *Vascul. Pharmacol.* **2005**, *42*, 281.
82. Cruz, M.N. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **2005**, *290*, 1969.
83. Yang, Y.B. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2003**, *24*, 703.
84. Culpitt, S.V. *Thorax.* **2003**, *58*, 592.

85. Chanvitayapongs, S. *Neuroreport*. **1997**, *8*, 1499.
86. Howitz, K.T. *Nature*. **2003**, *425*, 191.
87. Potter, G.A. *Br .J. Cancer*. **2002**, *86*, 774.
88. Nakagawa, H.; Kiyozuka, Y.; Uemura, Y.; Senzaki, H.; Shikata, N.; Hioki,K.; Tsubura, A. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **2001**, *127*, 258.
89. Hsieh, T.C.; Wu, J.M. *Exp. Cell. Res*. **1999**, *249*, 109.
90. Delmas, D.; Rebe, C.; Lacour, S.; Filomenko, R.; Athias, A.; Gambert, P.; Cherkaoui-Malki, M.; Jannin, B.; Dubrez-Daloz, L.; Latruffe, N.; Solary, E. *J. Biol. Chem*. **2003**, *278*, 41482.
91. Juan, E.; Wenzel, U.; Danniell, H.; Planas, J.M. *J. Agric. Food. Chem*, **2008**, *56*, 4813.
92. Weng, C.J.; Yang, Y.T.; Ho, C.T.; Yen, G.C. *J Agric Food Chem*, **2009**, *57*, 523.
93. Feng, Y.H.; Zhou, W.L.; Wu, Q.L.; Li, X.Y.; Zhao, W.M.; Zou, J.P. *Acta. Pharmacol. Sin*. **2002**, *23*, 893.
94. Cui, J.; Sun, R.; Yu, Y.; Gou, S.; Zhao, G.; Wang, C. *Phytother. Res*. **2010**, *24*, 1637.
95. Bhardwaj, A.; Sethi, G.; Vadhan-Raj, S.; Bueso-Ramos, C.; Takada, Y.; Gaur, U.; Nair, A.S .; Shishodia, S.; Aggarwal, BB. *Blood*. **2007**, *109*, 2293.
96. Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.; Harry, W.; Fong, H.S.; Norman, R. Farnsworth, A. *Douglas Kinghorn*. **1997**, *275*, 218.
97. Li, Y.J.; Zhang, K.; Li, X.V.; Zhao, X.; Mi, X.J. *Materials Science Forum*. **2009**, *822*, 610.
98. Cui, J.; Sun, R.; Yu, Y.; Gou, S.; Zhao, G.; Wang, C. *Phytother. Res*. **2010**, *24*, 1637.
99. Lin KH, Hsiao G, Shih CM, Chou DS, Sheu JR. *Cardiovasc. Res*. **2009**, *83*, 575.
100. Ciolino, H.P.; Yeh, G.C. *Mol. Pharmacol*. **1999**, *56*, 760.
101. Mgbonyebi, O.P.; Russo, J.; Russo, I.H. *Int. J. Oncol*. **1998**, *12*, 865.
102. Schneider, Y.; Vincent, F.; Duranton, B. *Cancer. Lett*. **2000**, *158*, 85.
103. Carbo, N.; Costelli, P.; Baccino, F.M.; Lopez-Soriano, F.J.; Argiles, J.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1999**, *254*, 739.
104. Warburg, O. *Science*. **1956**, *123*, 309.
105. Dang, C.V.; Hamaker, M.; Sun, P.; Le, A.; Gao, P. *J. Mol. Med*. **2011**, *89*, 205.
106. Sonveaux, P.; Vegran, F.; Schroeder, T.; Wergin, M.C.; Verrax, J.; Rabbani, Z.N. *J. Clin. Invest*. **2008**, *118*, 3930.
107. Cairns, R.A.; Harris I.S.; Mark, T.W. *Nat. Rev. Cancer*. **2011**, *11*, 85.

108. Geschwind, J.F.; Georgiades, C.S.; Ko, Y.H.; Pedersen, P.L. *Expert. Rev. Anticancer. Ther.* **2004**, *4*, 449.
109. Ko, Y.H.; Smith, B.L.; Wang, Y.; Pomper, M.G.; Rini, D.A.; Torbenson, M.S.; Hullihen, J.; Pedersen, P.L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 269.
110. Pedersen, P.L.; Mathupala, S.; Rempel, A.; Geschwind, J.F.; Ko, Y.H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1555*, 14.
111. Dania, N.N.; Gramm, C.F.; Scorrano, L.; Zhang, C.Y.; Krauss, S.; Ranger, A.M. *Nature*, **2003**, *424*, 952.
112. Pastorino, J.G.; Hoek, J.B. *J. Bioenerg. Biomembr. Review.* **2008**, *40*, 170.
113. Hatzivassiliou, G.; Andreadis, C.; Thompson, C.B. *Cancer energy metabolism.* **2005**, *2*,
114. Nelson, K. *Lancet. Oncol.* **2002**, *3*, 524.
115. Xu, R.H.; Pelicano, H.; Zhou, Y.; Carew, J.S.; Feng, L.; Bhalla, K.N.; Keating, M.J.; Huang, P. *Cancer. Res.* **2005**, *65*, 613.
116. Liu, X.H.; Zheng, X.F.; Wang, Y.L. *Chin. Med. J.* **2009**, *122*, 1681.
117. Colen, C.B.; Shen, Y.; Ghoddoussi, F.; Yu, P.; Francis, T.B.; Koch, B.J. *Neoplasia.* **2011**, *13*, 620.
118. Coss, R.A.; Storck, C.W.; Daskalakis, C.; Berd, D.; Wahl, M.L. *Mol. Cancer. Ther.* **2003**, *2*, 383.
119. Tanaka, M.; Nakamura, F.; Mizokawa, S.; Matsumura, A.; Matsumura, K.; Murata, T. *Neurosci. Res.* **2004**, *48*, 13.
120. Diers, A.R.; Broniowska, K.A.; Chang, C.F.; Hogg, N. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 561.
121. Kim, H.S.; Masko, E.M.; Poulton, S.L.; Kennedy, K.M.; Pizzo, S.V.; Dewhirst, M.W. *BJU. Int.* **2012**, *10*, 1464.
122. *SI Chemical Data Book* (4th ed.), Gordon Aylward and Tristan Findlay, Jacaranda Wiley
123. *Merck Index*, 11th Edition, 696.
124. Gokaraju, G.R.; Gottumukala, V.S.; Somepalli, V. *US Patent 7026518*, **2006**.
125. Del Prete, E.; Lutz, T.A.; Scharer, E. *Physiol. Behav.* **2004**, *80*, 489.
126. Boukerche, H.; Baril, P.; Tabone, E.; Bérard, F.; Sanhadji, K.; Balme, B.; Wolf, F.; Perrot, H.; Thomas, L. *Cancer. Res.* **2000**, *60*, 5848.
127. Filomeni, G.; Graziani, I.; Rotilio, G.; Ciriolo, M.R. *Genes. Nutr.* **2007**, *2*, 295.
128. Pozo-Guisado, E.; Merino, J.M.; Mulero-Navarro, S.; Lorenzo-Benayas, M.J.; Centeno, F.; Alvarez-Barrientos, A.; Fernandez-Salguero, P.M. *Int. J. Cancer.* **2005**, *115*, 74.
129. Spencer, T.L.; Lehninger, A.L. *Biochem. J.* **1976**, *154*, 405.

130. Lacroix, M.; Toillon, R.A.; Leclercq, G. *Endocr. Relat. Cancer*. **2006**, *13*, 293.
131. Kuwana, T.; Newmeyer, D.D. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2003**, *15*, 691.
132. Lanni, J.S.; Lowe, S.W.; Licitra, E.J.; Liu, J.O.; Jacks, T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *18*, 9679.
133. Marchini, S.; Ciro, M.; Broggin, M. *Apoptosis*. **1999**, *4*, 39.
134. Abeysinghe, R.D.; Greene, B.T.; Haynes, R.; Willingham, M.C.; Turner, J. *Carcinogenesis*. **2001**, *22*, 1607.
135. Petit, T.; Bearss, D.J.; Troyer, D.A.; Munoz, R.M.; Windle, J.J. *Mol. Cancer. Ther.* **2003**, *2*, 165.
136. Zoli, W.; Ulivi, P.; Tesi, A.; Fabbri, F.; Rosetti, M.; Maltoni, R.; Giunchi, D.C.; Ricotti, L.; Briadori, G.; Vannini, I.; Amadori, D. *Breast. Cancer. Res.* **2005**, *7*, 681.

# **ANNEXES**

## **Publication Internationale**



# Alpha Cyano-4-Hydroxy-3-Methoxycinnamic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells

Lamia Hamdan<sup>1,2</sup>, Zoheir Arrar<sup>2</sup>, Yacoub Al Muataz<sup>1</sup>, Lutfi Suleiman<sup>1</sup>, Claude Négrier<sup>1</sup>, Joseph Kajima Mulengi<sup>2</sup>, Habib Boukerche<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unité de Recherche Mixte EA4174, Université Claude Bernard Lyon1, INSERM, Lyon, France, <sup>2</sup> Department de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses, University de Tlemcen, Tlemcen, Algeria

## Abstract

t

This study investigated the underlying mechanism of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ACCA), on the growth of breast cancer cells and normal immortal epithelial cells, and compared their cytotoxic effects responses. Treatment of breast cancer cells (MCF-7, T47D, and MDA-231) with ACCA resulted in dose- and time-dependent decrease of cell proliferation, viability in colony formation assay, and programmed cell death (apoptosis) with minimal effects on non-tumoral cells. The ability of ACCA to suppress growth in cancer cells not expressing or containing defects in p53 gene indicates a lack of involvement of this critical tumor suppressor element in mediating ACCA-induced growth inhibition. Induction of apoptosis correlated with an increase in Bax protein, an established inducer of programmed cell death, and the ratio of Bax to Bcl-2, an established inhibitor of apoptosis. We also documented the ability of ACCA to inhibit the migration and invasion of MDA-231 cells with ACCA in vitro. Additionally, tumor growth of MDA-231 breast cancer cells in vivo was dramatically affected with ACCA. On the basis of its selective anticancer inhibitory activity on tumor cells, ACCA may represent a promising therapeutic drug that should be further evaluated as a chemotherapeutic agent for human breast cancer.

Citation: Hamdan L, Arrar Z, Al Muataz Y, Suleiman L, Négrier C, et al. (2013) Alpha Cyano-4-Hydroxy-3-Methoxycinnamic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. PLoS ONE 8(9): e72953. doi:10.1371/journal.pone.0072953

Editor: Irina V. Lebedeva, Enzo Life Sciences, Inc., United States of America

Received February 26, 2013; Accepted July 15, 2013; Published September 5, 2013

Copyright: © 2013 Hamdan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This was supported by grants from the General Directorate for Scientific Research and Technological Development (GDSR Ministry of Higher Education and Scientific Research/Algeria), and the Ligue nationale contre le Cancer. LH was supported by a salary support from GSDR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: Habib.boukerche@sante.univ-lyon1.fr

## Introduction

Breast cancer is one of the most devastating malignant neoplasm's. Patients frequently already have clinical evidence of tumor dissemination at diagnosis, and many more show local distant recurrent disease shortly after surgical excision of the primary tumor [1]. Curative therapy is not available for these patients and the vast majority of will succumb to disease progression [2,3]. Given this bleak picture, it is vital to develop new, efficacious, and rationally designed treatment strategies to, ideally, prevent or effectively treat metastasis.

The so called "Warburg effect" describes cancer cells increased use of anaerobic pathways to back up their energetic survival as compared to normal cells [4,5]. Indeed, 62% of all known cancers show an increased expression of the genes involved in the glycolysis pathway [6]. In this context, targeting metabolic pathways is of particular interest, as drugs that target more specific metabolic points of glycolysis in tumor cells might represent a potentially novel strategy for cancer treatment [7]. The monocarboxylate transporters (MCTs), a conserved protein family that transports lactate and pyruvate through cell membranes [8] has been shown to play an important role in tumor progression [9]. These data suggest that therapeutic strategies that target MCTs may block proliferation and spread of tumor cells. Among

inhibitors of MCTs is the  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid which inhibit tumor growth in vitro through its ability to block lactate efflux [10–12]. Recent surveys revealed that  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid significantly induces necrosis in multiple cancers including, glioblastoma, and tumor of the prostate by increasing lactic acid production and inhibiting plasma membrane MCT activity [13–15]. Further studies have shown that MCT inhibitors decreases the size of tumors and sensitizes hypoxic tumor regions to radiotherapy [16]. However, despite evidences suggesting that MCTs inhibitors that target energetic metabolism pathways represent strong candidates for cancer treatment [7], little is known how they affect cancer cell proliferation and viability, thereby causing inhibition of cancer development and progression. In this study, we investigated the cytotoxicity and anti-proliferation activity of ACCA on breast cancer cells. We document that treatment of breast cancer cells with ACCA inhibited growth and induced apoptosis. We also find that ACCA ca potentially decrease the migration and invasion of MDA-231 cells in vitro and dramatically impaired their capacity to form tumors in vivo. Our results suggest that the mechanism of action of ACCA includes direct induction of pro- and anti-apoptotic genes that occurs independent of p53 status in breast cancer cells. Based on these results, we suggest that ACCA may be a candidate fo

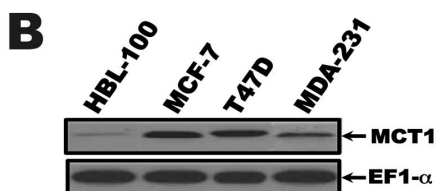
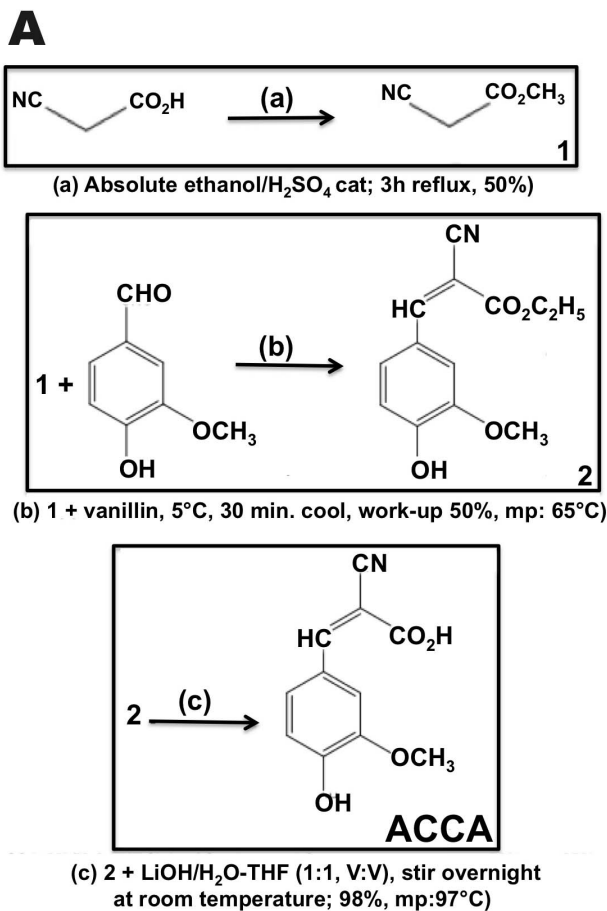


Figure 1. Structure, scheme synthesis of  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-3-Methoxycinnamic Acid (ACCA) and expression of MCTs in immortal human epithelial cells and human breast cancer cells. (A) Structure and scheme of ACCA synthesis. (B) Expression of MCT1 in immortal normal human breast epithelial cell line, HBL100, and breast cancer cell lines MCF-7, T47D, and MDA-231. Lysates of the indicated cell type were analyzed by western blotting and stained with MCT1 antibody as described in «materials and method». Membranes were reprobated with EF-1 $\alpha$  antibody to confirm equal loading. doi:10.1371/journal.pone.0072953.g001

further evaluation as a chemotherapeutic agent for human breast cancer.

## Materials and Methods

### Cell Lines, Reagents, and Culture Media

Immortal human breast epithelial cells line HBL100, and MCF-7, T47D and MDA/MB 231 (MDA-231) human breast adenocarcinoma cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). HBL-100 and MCF-7 (harbor-

ing wt p53), T47D (harboring mutant p53), and MDA-231 (harboring mutant p53) [17], were respectively grown in DMEM, MEM and RPMI-1640 medium. They were supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 1% penicillin-Streptomycin. MEM medium was supplemented with 0.1 mM non-essential amino acid (NEAA) and 10 mg/ml insulin. All media and supplements were obtained from Life Technologies (Saint Aubin, France). MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) and annexin V-PI staining kit were purchased from Calbiochem (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

### 2. The Synthesis of $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-methoxycinnamic Acid (ACCA)

ACCA was prepared as follow (Fig. 1A)

a) Synthesis of ethyl cyanoacetate (solution#1). Cyanoacetic acid (20.4 g, 0.24moles) was dissolved in 27 ml of absolute ethanol. Then, 0.5 ml of  $H_2SO_4$  was slowly added. The resulting solution was refluxed for 3h. Excess alcohol and water was removed at 50°C under diminished pressure. The residue was cooled at room temperature and neutralized with a concentrated aqueous solution of  $Na_2CO_3$ . The aqueous phase was extracted three times with 40 ml of ether and the combined organic extracts were dried over anhydrous magnesium sulfate. Ether was thoroughly removed under diminished pressure to leave a colorless liquid that was purified by distillation (97–98°C). Yield: 48%.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 4.16 (d,  $J = 1Hz$ , 2H), 3.43 (d,  $J = 0.94Hz$ , 2H), 1.21 (s, 3H).

b) Synthesis of ethyl  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-methoxycinnamate (solution#2). In a dry three-necked flask containing 50 ml of dry ethanol were successively introduced ethyl cyanoacetate (7.4 g, 65 mmol), clear sodium (1 g, 44 mmol) and vanillin (67 g, 44 mmol), keeping the temperature at 5°C. The mixture was stirred until dissolution of sodium was complete. After stirring for further 30 min, 5 ml of glacial acetic acid was added and the reaction was kept overnight at room temperature. Then, 10 ml of distilled water was then carefully added to the cooled solution. The aqueous layer was extracted with 25 ml of ethyl acetate, and the organic extract was dried over  $MgSO_4$  and concentrated. A yellow solid was obtained. Yield: 61%. Mp: 53°C.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): 1.27(t,  $J = 7Hz$ , 3H), 4.21(q,  $J = 7Hz$ , 2H), 3.80(s, 3H), 5.31(s broad, 1H), 6.67(d,  $J = 1.8Hz$ , 1H), 7.59(d,  $J = 1.8Hz$ , 1H) 7.75(s, 1H), 8.23(s, 1H).

c) Alpha-cyano-4-hydroxy-3-methoxy-cinnamic acid (ACCA) (solution#3). To solution #2 (10.9 g, 44 mmol) containing 30 ml methanol was carefully added a solution of LiOH (1.1 g, 44 mmol/ $H_2O$ ) at 0°C. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed and the aqueous layer was extracted with 30 ml of ethyl acetate. Then, the extract was washed with an aqueous solution of HCl (pH #2) and further extracted three times with 40 ml of ethyl acetate. The combined organic extracts were washed once with brine and then dried over  $Mg_2SO_4$ . Removal of solvent left a yellow solid that was recrystallized in water/ethanol (9:1 v/v). Yield: 98%. Mp: 97°C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 3.99(s, 3H), 5.75(s, 1H), 6.67(d,  $J = 1.8Hz$ , 1H), 7.60(d,  $J = 1.8Hz$ , 1H), 7.85 (d,  $J = 1.8Hz$ , 1H), 8.16 (d,  $J = 1.8Hz$ , 1H), 9.82(s, 1H).

A 2 mM stock solution of ACCA ( $\alpha$  cyano-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at 220°C. ACCA was added to cells at the indicated concentrations. The DMSO control concentration was less than 0.1% (v/v). All solutions were filter sterilized using 0.22- $\mu m$  syringe-filter units. The stock solution was then diluted to the required final concentration in serum-free medium

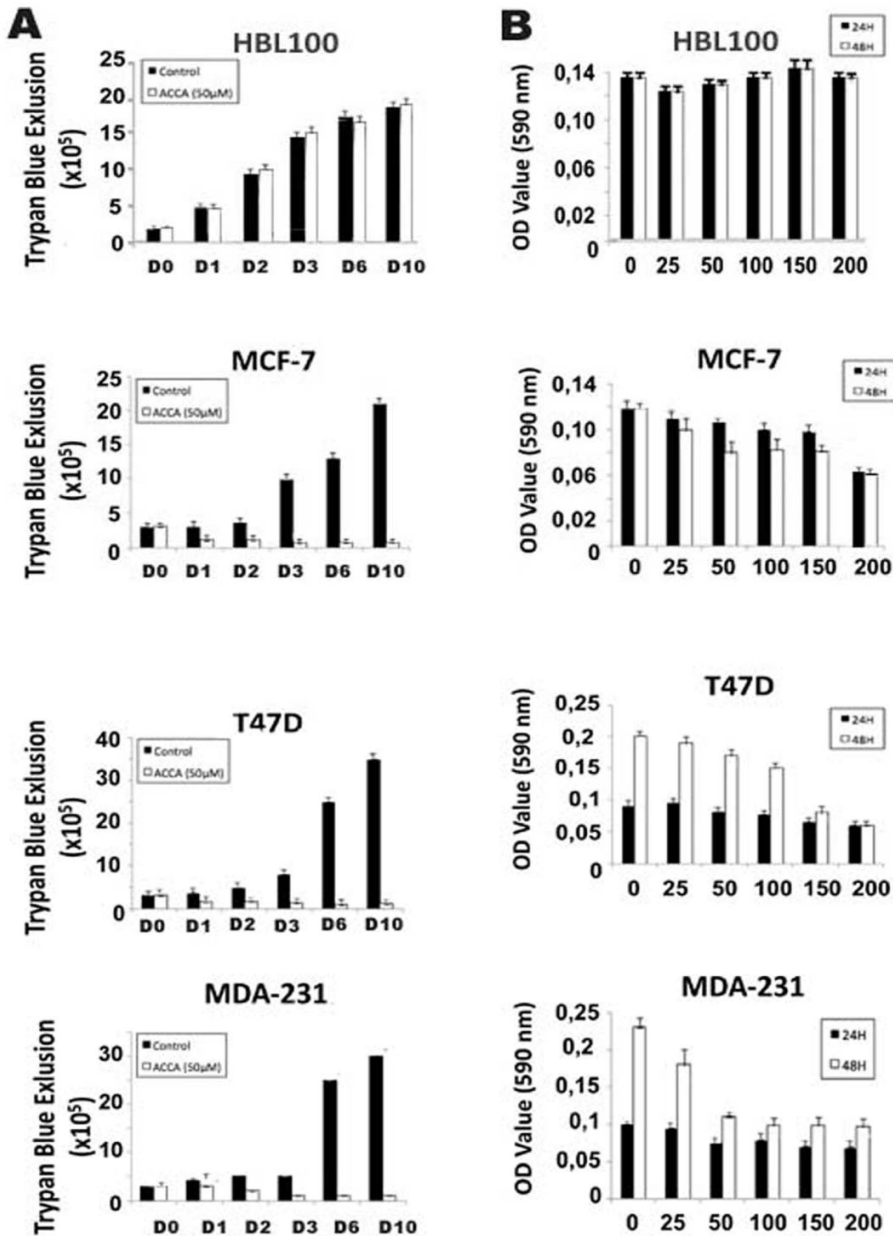


Figure 2. Effect of ACCA on the in vitro growth and proliferation rate of immortal human epithelial cells and human breast cancer cells. (A) The indicated cell type were either untreated (control) or treated with 50 μM of ACCA and cell growth was assessed for 1, 2, 3, 6, and 10 days. The trypan blue exclusion test is used to determine the number of viable cells. Values represent number of cells  $\times 10^5$ . (B) The indicated cell type either untreated or treated with different doses of ACCA were seeded in 96 wells, and a standard MTT viability test was performed 24h and 48h posttreatment as described in «materials and methods». Columns, mean  $\pm$  SD, n = 3. doi:10.1371/journal.pone.0072953.g002

**MTT Assay and Assessment of Cell Growth and Viability.** The MTT assay is based on the enzymatic reduction of the tetrazolium salt MTT in living, metabolically active cells and was performed as described [18]. MTT Briefly, cells ( $1 \times 10^4$ /well) were plated in 96-well plates for 24h. At the end of incubation, cells were treated with ACCA at the indicated concentrations for 24 and 48h at 37°C, under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Control cells were treated with 0.1% DMSO. At the end of the incubation, MTT was

added to the cells for 3h. at 37°C. Then, 100 μl of SDS 10% was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured at 540 nm using a THERMO max microplate reader. Each assay was performed in duplicate. Cell viability was evaluated by assessing trypan blue inclusion/exclusion of isolated cells under light microscope and scoring the percentage of cells exhibiting blue staining. Cells ( $3 \times 10^5$ ) were seeded into a six-well plate for 24 h. and then treated with 50 mM of ACCA. After 1, 2, 3, 6, and 10

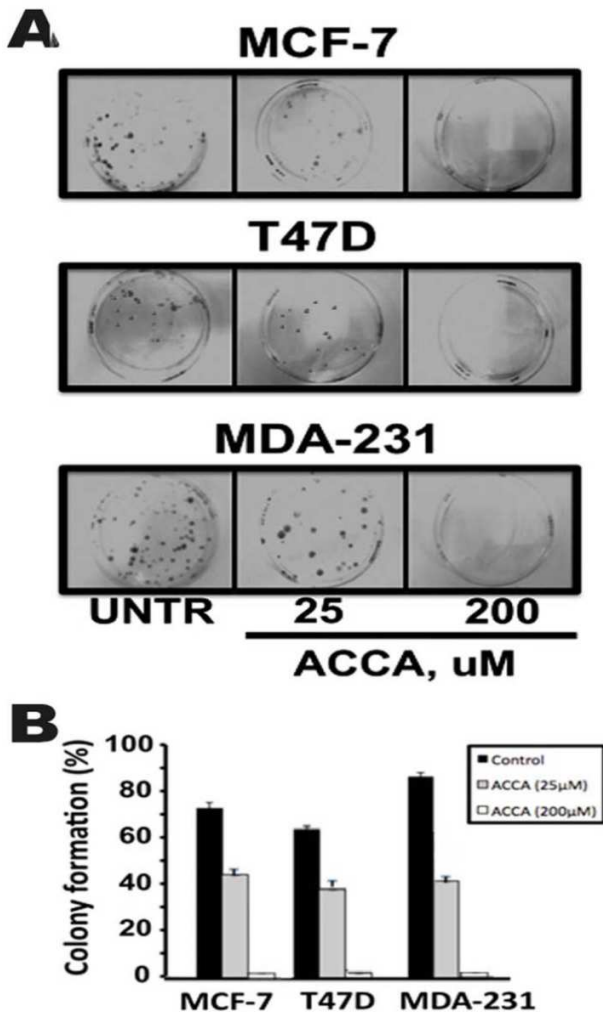


Figure 3. Effect of ACCA on colony formation of human breast cancer cells. The indicated cell type either untreated (UNTR) or treated with 25 or 200 uM of ACCA were allowed to grow for 3–4 weeks and the number of colonies formed was measured as «described in materials and methods». (A) Representative images of the cloning wells (A) and quantification (B) are shown. Columns, mean  $\pm$ SD, n = 3. doi:10.1371/journal.pone.0072953.g003

days treatment, floating and attached cells were isolated by trypsination, recovered by centrifugation and mixed with 1:1 with trypan blue reagent. Cells ( $\approx$  400) were counted in all four fields of a hemocytometer under a standard slide microscope.

### Colony Formation Assay

Cells growing in log phase were seeded at a density of 1000–2000 cells/well into 60 mm dishes in complete medium. After allowing the cells to adhere for 24 h, medium was replaced with complete medium containing ACCA at the indicated concentrations. Cells were allowed to grow for 3–4 weeks, with a medium change containing ACCA in complete medium, performed every fourth or fifth day. Colonies were then fixed and stained with Methylene blue-50% ethanol and counted. Individual assays were performed in triplicate with a total of three plates per data point.

### Apoptosis Analysis by Flow Cytometry

Tumor cells ( $10^6$  cells per 60 mm dish) were treated with the indicated concentrations of ACCA for 48h à 37uC. Cells were trypsinized and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and collected by centrifugation at 1000 rpm for 5 minutes at room temperature. Aliquots of cells ( $5 \times 10^5$ /ml) were resuspended in complete media (0.5 ml) and then stained with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin-V kit according to the manufacturer's instructions. PI (1 mg/ml) was added to the samples after staining with Annexin-V kit to exclude late apoptotic and necrotic cells. Flow cytometry was performed immediately after staining.

### Western Blot Analysis

After treatments, ice-cold PBS solution was used two times to rinse cells. Cells were then lysed with cell lysis buffer [Tris (pH 7.5), 50 mM; EGTA 5 mM; NaCl 120 mM; a-glycerophosphate 20 mM; Nonidet P-40 1%; Na pyrophosphate 15 mM; Na fluoride 50 mM; Na orthovanadate 10 mM; phenylmethylsulfonyl fluoride 0.5 mM; aprotinin 10 mg/ml; leupeptin 10 mg/ml; glycerol 20%] and dishes incubated for 10–30 min at 4uC. Cells were scraped into lysis buffer, and lysates were clarified by centrifugation (12,000 rpm, 15 min at 4uC). Protein concentrations was determined using a kit from Bio-Rad and western blot analyses were performed as previously described [19]. Aliquots (50 ug) were solubilized in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked 2 hours at 4uC in TBST (5% nonfat milk in 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, and 0.1% Tween-20, pH 7.6). Membranes were exposed to the primary antibodies, followed by washing (3  $\times$  15 min. with TBST), and antibody bound proteins

Table 1. Effect of ACCA on the induction of apoptosis and necrosis in breast cancer cells.

ACCA concentrations (mM)		% of Cells			
		Viable	Early apoptosis	Late apoptosis	Necrosis
MCF-7 <sup>b</sup>	C <sup>a</sup>	87,4	0,3	0,3	11,9
	200	1,2	1,3	84,5	13
T47D <sup>b</sup>	C <sup>a</sup>	94,4	1,5	0,6	3,5
	200	1,4	1,3	64,6	31,8
MDA-231 <sup>b</sup>	C <sup>a</sup>	87,9	0,4	0,4	11,3
	200	1,1	1,3	76,3	21,6

<sup>a</sup>C = control group.

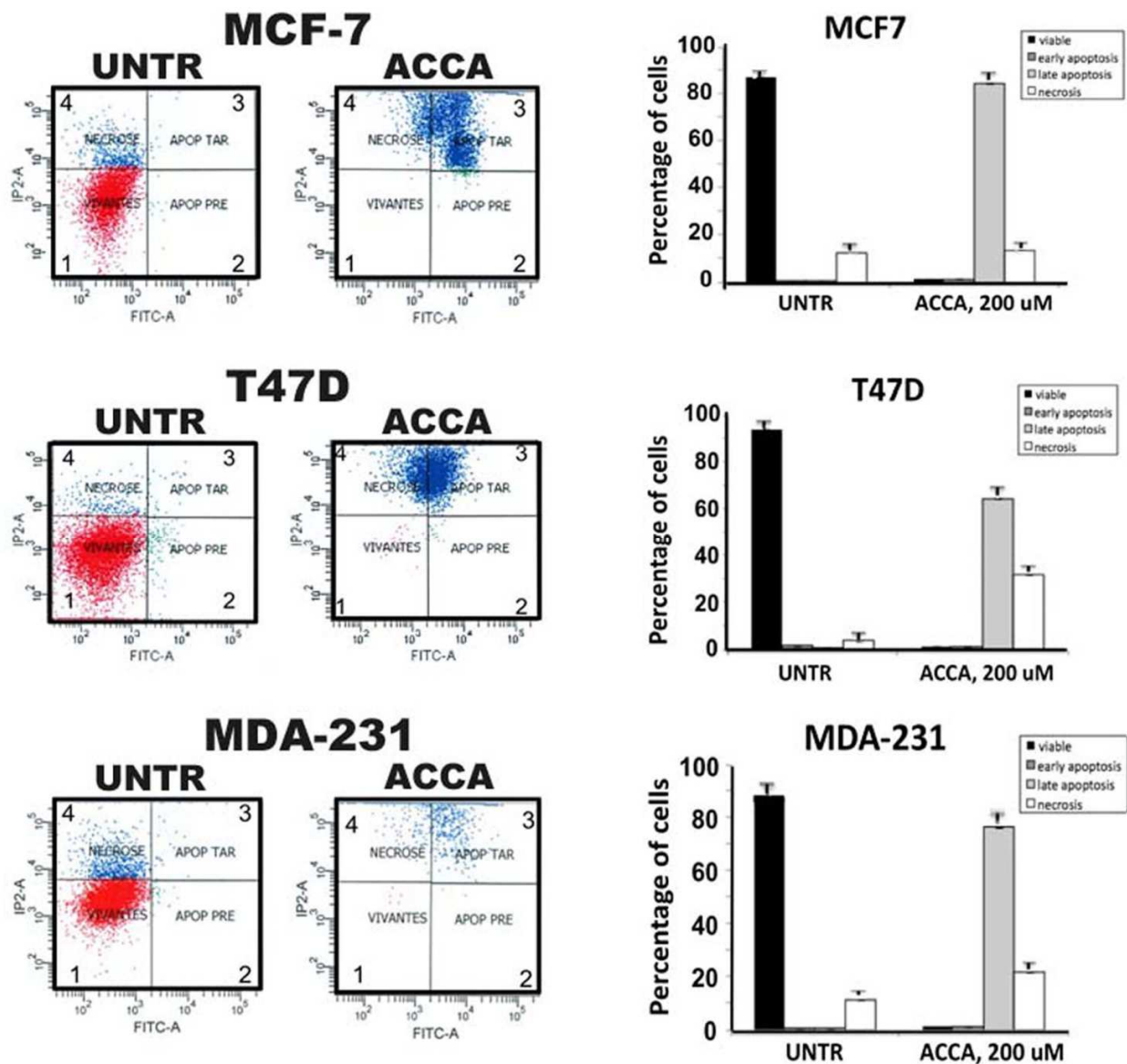


Figure 4. Effect of ACCA in breast cancer cells. The indicated cell type either untreated (UNTR) or treated with 200  $\mu$ M of ACCA for 48h. were stained with FITC-labeled Annexin-V and propidium iodide (PI) and immediately analysed by flow cytometry. (A) Data from a representative of four experiments are shown. Cells in the bottom left quadrant 1 represent viable cells (low Annexin V and PI staining, AnV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>); cells in the bottom right quadrant 2 represent early apoptotic cells (high annexin V staining but low PI staining, AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>); cells in the top right quadrant 3 represent late apoptotic cells (low annexin V and high PI staining, AnV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>); and cells in the top left quadrant 4 represent necrotic cells (high annexin V and PI staining, AnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Shown are representative data from one of three independent experiments with samples in triplicate. (B) The percentage of early apoptotic cells (only Annexin-V stained), late apoptotic and necrotic cells was calculated using the CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Columns, mean  $\pm$ SD, n = 3.

doi:10.1371/journal.pone.0072953.g004

were detected by enhanced chemiluminescence reagents (Pierce), according to the manufacturer's protocol. The following antibodies were used: rabbit anti-MCT1, mouse anti-Bax, rabbit anti-Bcl-2 (Santa-Cruz Biotechnologies, CA), and anti-EF-1a (Millipore, Billerica, MA).

### Cell Invasion, Migration and in Vivo Tumorigenicity Assays

Transwell invasion and migration assays were performed as described [19] in a modified Boyden chamber (BD Bioscience, Bedford, MA, USA). Briefly, the Matrigel was allowed to

rehydrate for 2 h at room temperature by adding warm, serum-free DMEM. The wells of the lower chamber were filled with DMEM containing 10% NuSerum, and the chambers were each assembled by placing the uncoated membrane between the lower and upper compartments according to the manufacturer's instructions. MDA-231 cells ( $10^5$ ) were seeded in the upper compartment in serum-free DMEM containing 0.1% BSA. ACCA was then added at the indicated concentrations to the upper chambers and incubated for 48 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. For migration, cells ( $5 \times 10^4$ ) were added to the upper compartments of the BioCoat chambers supplemented with

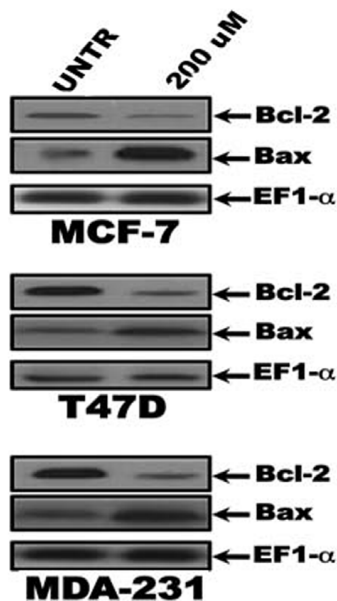


Figure 5. Effect of ACCA on the levels of Bcl-2 family proteins in breast cancer cells. Lysates of the indicated cell type either untreated (UNTR) or treated with 200  $\mu$ M of ACCA for 48h. were analyzed by western blotting and stained with Bcl-2 and Bax antibodies as described in «materials and method». Membranes were reprobed with EF-1 $\alpha$  antibody to confirm equal loading. doi:10.1371/journal.pone.0072953.g005

indicated concentrations of ACCA. The wells of the lower chamber were filled with RPMI 1640 containing 10% NuSerum, and the chambers were each assembled similarly to the method described above for migration assay. The migration assay was carried out at 37°C for 15–18 h at 37°C. Cells that invaded the Matrigel or migrated to the underside of the coated membrane were fixed, stained with the RAL 555 staining kit. Stained cells were counted and normalized relative to the number of seeded cells. Experiments were assayed in triplicate, and at least 10 fields were counted in each experiment. In vivo tumorigenicity assay was performed as described [19]. Briefly, exponentially growing cells MDA-231 cells were suspended in PBS and mixed in a 1:1 ration with Matrigel. Then, 100 hundred  $\mu$ l of cells ( $2 \times 10^6$ ) were inoculated s.c. on the right flank of each nude mouse above the hind limb. One week after tumor inoculation, the mice were treated with vehicle or ACCA (25 mmol in 200 ml; ref. [21]) five times/week beginning one week after subcutaneous tumor cell injection. Tumor growth rate was determined as described [20].

### Data Analysis

For cell proliferation/MTT assays, data are expressed as a mean  $\pm$  SEM of multiple experiments, with each experiment including three to six determinations, or alternatively data are presented as mean  $\pm$  SEM of OD. Statistical significance was determined using Student's t test.

## Results

### ACCA Inhibits Proliferation of Human Breast Cancer Cells in a Dose and Time-Dependent Manner

Because ACCA is a known inhibitor of monocarboxylate transporters (MCTs) with about a tenfold higher efficacy for MCT1 as compared with others MCTs [8], we first determined by

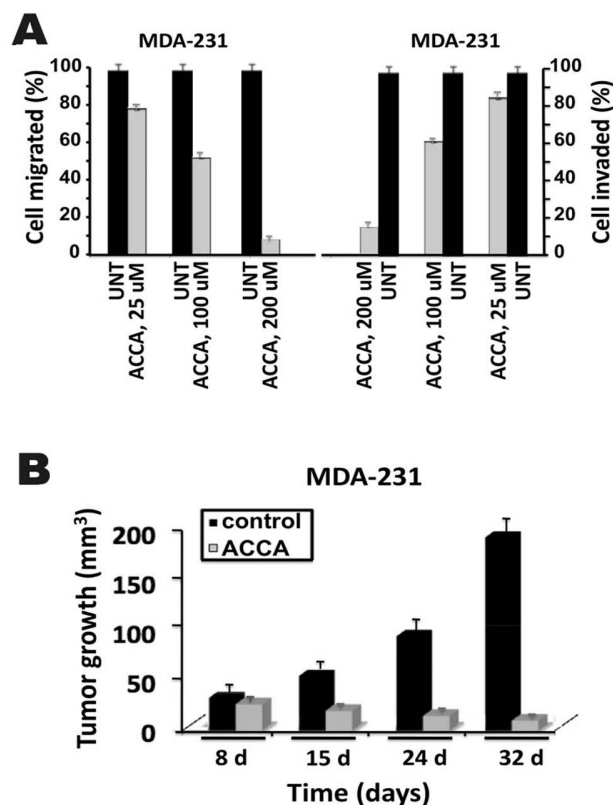


Figure 6. Effect of ACCA migration and invasion in vitro, and breast cancer tumor growth in vivo. (A) For invasion, MDA-231 cells ( $10^5$ ) were seeded in the upper compartment of a Matrigel chamber in serum-free DMEM containing 0.1% BSA and allowed to invade for 48 h at 37°C in the presence of the indicated concentrations of ACCA. The lower compartment contained 0.5 ml of DMEM and 10% NuSerum. For migration, MDA-231 cells ( $5 \times 10^4$ ) were seeded in the upper compartment in serum-free DMEM containing 0.1% BSA and allowed to migrate for 15–18 h at 37°C in the presence of the indicated concentrations of ACCA. The lower compartment contained 0.5 ml of DMEM and 10% NuSerum. At the end of the invasion and migration assays, the filters were removed, fixed, and stained as indicated in «Materials and Methods.» Invasion and migration were determined by counting of the cells that had migrated to the lower side of the filter with a microscope. Ten fields/cell line were counted. Bars, SD of triplicate samples from three independent experiments. The migration and invasion of control cells was used as a positive control (set at 100%). «UNT» refers to untreated cells. (B) MDA-231 cells ( $2 \times 10^6$ ) mixed in a 1:1 ration with Matrigel were inoculated s.c. on the right flank of each nude mouse above the hind limb. One week after tumor inoculation, the mice were treated five times/week beginning one week after subcutaneous tumor cell injection with vehicle (control) or ACCA (25 mmol in 200 ml). Tumor sizes at different times are expressed as the mean of the sum of two perpendicular diameters. Bars, SD of tumor volumes from five mice. doi:10.1371/journal.pone.0072953.g006

western blot analysis the expression of the MCT1 protein in immortal normal human breast epithelial cells, HBL100, and breast cancer lines, including MCF-7, MDA-231, and T47D. Consistent with previous studies [22], we found that MCT1 protein is elevated in all three breast cell lines compared to HBL-100 immortal breast cell line (Fig. 1B). We next investigated the effect of ACCA on cell viability. MCF-7, MDA-231, and T47D breast cancer cells were treated with vehicle or 50 mM of ACCA

for different time intervals and cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion method. As shown in Fig. 2A, ACCA exhibited a significant reduction in cell viability across MCF-7, MDA-231 and T47D cell lines treated with 50 mM of ACCA for 1, 2, 3, 6 or 10 days as compared to control cells. In contrast to malignant breast tumor cells, treatment of immortal normal human breast epithelial cells, HBL-100, with vehicle or the same concentration of ACCA did not influence the cell growth of HBL-100 cells (Fig. 2A). To confirm these data, MCF-7, MDA-231, and T47D breast cancer cells were treated with various concentrations of ACCA, ranging from 25 to 200 mmol/L for 24 and 48h. and cell growth was evaluated by MTT reduction assay. As shown in Fig. 2B, there is no significant difference in growth inhibition in all tumor cell lines treated with a 25 mM ACCA for 24h compared with untreated cells. However, and consistent with the data obtained above, on treatment of cells for 48 h. with increasing concentrations of ACCA (25, 50, 100, 150 and 200 mM), tumor cell growth was strongly inhibited in a dose-dependent manner (Fig. 2B). This suppressive effect of ACCA on tumor cells was most remarkable at the concentration of 200 mM, 150 mM and 50 mM for MCF-7 (54.47%;  $P > 0.005$ ), T47D (77.47%;  $P > 0.005$ ), and MDA-231 (64.67%;  $P > 0.005$ ) cells, respectively. In contrast, treatment of HBL100 immortal breast cell line, with increasing concentrations of ACCA (25, 50, 100, 150 and 200 mM), do not affect the growth of MDA-231, T47D and MCF-7 cells (Fig. 2B). In total, these results suggest that ACCA acting through MCT1 selectively inhibits the growth of breast cancer cells in vitro.

We next questioned whether the growth-inhibitory effect of breast cancer cell proliferation persists on removal of ACCA. MDA-231 cells were treated with medium alone or containing 50 mM of ACCA for 48 h., and proliferation was assessed by MTT assay (d0). Our data show that, consistent with our previous results, ACCA significantly inhibited tumor cell proliferation (d0, OD control, 0.235; OD ACCA, 0.084, 62.38% inhibition,  $P > 0.001$ ). Plating medium was removed and replaced with growth medium containing 10% of FBS, and cell growth was monitored for a further 4 days. Our data show that the suppressive effects of ACCA at day 4 (d4) were similar to that observed at d0, (d0, OD control, 1.775; OD ACCA, 0.580, 67.33% inhibition,  $P > 0.001$ ). These results clearly demonstrate that the inhibitory effect of ACCA on cell proliferation persists, even on removal of the drug.

### ACCA Blocks the Clonogenic Ability of Breast Cancer Cells

We next investigated whether ACCA had any effect on the ability of breast cancer cells to form colonies. Cells were seeded (1000–2000 cells/well) in complete medium in six-well plates and allowed to adhere for 24 h. The medium was then replaced with complete medium containing ACCA (0–25–200 mM), and the ability of MCF-7, T47D and MDA-231 cells to form colonies was monitored over the next 21 days. Our results show that in the absence of any ACCA, MCF-7, T47D and MDA-231 cells have a robust ability to form colonies and that ACCA inhibits this in a dose-dependent manner in all three tumor cell lines (Fig. 3A and 3B). A significant inhibitory effect of ACCA on breast cancer cells colony formation is apparent at even 25 mM doses of ACCA and with a 200 mM dose, the ability of breast cancer cells to form colonies is completely blocked. These results extend our previous observations indicating that that ACCA caused inhibition of cell death at a concentration greater than 25 mM and suggest that ACCA is a potent suppressor of cell growth.

### Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines Correlates with an Elevation in Bax Levels

We next determined whether ACCA decreases cell viability of breast cancer cells through the induction of apoptosis. Thus, cells were treated for 48h with 200 uM of ACCA and phosphatidylserine translocation was measured by flow cytometry and annexin V labeled with FITC. Annexin V, a  $Ca^{2+}$ -dependent phosphatidylserine binding protein, detects phosphatidylserine translocation onto the outer plasma membrane leaflet. Propidium iodide (PI) staining was used in conjunction with Annexin V-FITC for the detection of necrotic cells.

Annexin V-negative/PI-negative, Annexin V positive/PI-negative, Annexin V positive/PIpositive, AnnexinV-negative/PI-positive cells represent the viable cells, the cells in early apoptosis, late apoptosis, and necrosis, respectively. As shown in Fig. 4, ACCA induced early and late apoptosis in 85.8, 77.6 and 65.9% of the cell population of MCF-7, MDA/MB 231 and T47D respectively at dose of 200 mmol/L for 48 h. compared to untreated cells. We also found that ACCA induces necrosis in 21.6, 13, 31.8% of the cell population of MCF-7, MDA/MB 231 and T47D respectively, suggesting that ACCA might also cause significant cellular injury and increased apoptotic cell death (Table 1). We next define potential target genes associated with apoptosis that might be regulated by ACCA, thereby resulting in apoptosis in breast cancer cells. Because of the importance of Bcl-2 family proteins in the regulation of apoptosis, we monitored the levels of expression of antiapoptotic proteins (Bcl-2) and the proapoptotic proteins (Bax) in breast cancer cells. As shown in Fig. 5, ACCA decreased Bcl-2 protein level (1.8-, 2.4-, and 2.6-fold, respectively) whereas Bax protein expression were elevated (3.4-, 2.4, and 3.2-fold, respectively) in MCF-7, T47D and MDA- 231 breast cancer cells, respectively. In contrast, the levels of the various pro- and antiapoptotic proteins did not change significantly in HBL-100 cells following treatment with.

ACCA (data not shown). These studies suggest that ACCA increases the ratio of of pro- to antiapoptotic proteins, thereby tipping the balance of cancer cells from survival to programmed cell death.

### ACCA Treatment Decreases Cell Motility, Invasion and in Vivo Tumor Growth of MDA-231 Human Breast Cancer Cells

To investigate whether ACCA can affect important biological properties of breast cancer cells, we first used in vitro cell migration and invasion assays. As shown in Fig. 6A, the migratory and invasive ability of MDA-231 cells was significantly affected in a concentration-dependent manner by ACCA. At the highest concentration of 200 uM, ACCA causes an up to  $> 90$  and 85% reduction in cell migration and invasion, respectively, as compared to untreated cells. We also determine the effect of multiple i.p. injections of ACCA on growth of MDA-231 cells subcutaneously implanted in nude mice. The ACCA concentrations delivered as a treatment protocol in the present study are within the range used in previous animal studies [21]. As shown in Fig. 6B, the average tumor volume in mice treated with ACCA was significantly lower compared to vehicle-treated control mice. At 32 days after tumor cell injection, MDA-231 cells gave rise to small tumors as compared to vehicle-treated control mice ( $195 \pm 12 \text{ mm}^3$  vs  $1262 \text{ mm}^3$ ) indicating that ACCA reduced tumour growth by  $> 94\%$ . Although, treatment of mice receiving MDA-231 cells with ACCA at 8 days resulted in a less dramatic decrease in tumor growth, the difference was still evident (Fig. 6B). Of note, animals remained well throughout the entire experiment and no weight

loss was observed upon treatment, suggesting that ACCA was well tolerated at this dose regimen (data not shown).

## Discussion

Although treatment of breast cancer has improved considerably, curative therapy is not available for these patients. Unfortunately, the treatments in use today, such as surgery, radiation and chemotherapy, are exhaustive to the patients [2,3]. There's therefore great need to focus on new treatments that are effective in fighting specifically the tumors. Breast cancer, as almost malignant tumors, harbors aberrant metabolic pathways which support rapid cell proliferation and provide a growth advantage over normal cells [5]. Previous finding suggest that lactate, the end of product of glycolysis, is produced in large amount in tumors and is more effective than glucose in the tumor cell energy metabolism under aerobic conditions [11,12,14,23]. The mechanism set forward involves a competition between lactate and glucose metabolism for the intracellular  $\text{NAD}^+$  pool [24]. In this context, it was shown that the main mechanism underlying this metabolic change include important cytotoxic and cytostatic effects on several human tumors including breast carcinomas [25,26]. Additionally, the loss of the reserve capacity of the mitochondrial function in breast cancer cells often leads to cell death via mitochondrial apoptotic signaling pathways [27]. Because MCTs are key players in this process, disruption or alteration of the metabolism of tumor cells via inhibition of MCTs function represent promising therapeutic perspectives for the development of targeted therapies in breast cancer [9].

In this study, we document the antibreast carcinoma and apoptosis-promoting properties of ACCA. On the basis of the previously confirmed genetic defects in the human tumor cell lines analyzed, including mutations p53 [28], it is evident that the antineoplastic effect of ACCA, acting through MCT1, does not depend on the action of this tumor suppressor gene that is frequently altered in human cancers. The capacity of ACCA to efficiently inhibit the growth of wild-type and mutant p53 breast carcinoma cells, supports the possibility that ACCA may prove efficacious in the treatment of human breast and other cancers. Additionally, it is important to note that the cell viability and proliferation in immortal normal human breast epithelial cells were not significantly altered by ACCA at concentrations ranging from 25 to 200  $\mu\text{M}$ , which significantly induced cell death in breast carcinoma cells. Furthermore, our results showed that ACCA significantly inhibited both migration, invasion and in vivo tumor growth of MDA-231 cells. These data together with previous studies demonstrating similar anti-proliferative effects of *a*-cyano-4-hydroxycinnamate through inhibition of lactate trans-

porters in other cellular contexts [13–15], suggest that ACCA may possess potential therapeutic activity against breast cancer cells, without significantly affecting viability of normal cells.

The Bcl-2 gene family members are important genetic elements in maintaining homeostasis between survival and cell death [29]. Bcl-2 and Bcl-XL bind to the outer membrane of mitochondria and block cytochrome C efflux. In contrast, following induction of apoptosis, Bax translocates from the cytosol to the mitochondria where it enhances release of cytochrome C through the outer membrane of mitochondria. A number of cytotoxic anticancer drugs or apoptotic stimuli has been shown to trigger cytochrome C release through down-regulation of Bcl-2/Bcl-XL and/or up-regulation of Bax [30]. The present study demonstrates that ACCA is capable of inducing apoptosis in breast cancer cells. Cell death triggered by ACCA is accompanied by up-regulation of the proapoptotic protein Bax whereas levels of Bcl-2 significantly decreased. Although previous reports have shown induction of apoptosis in several cancer cell lines [13–16], our data are the first to highlight mechanisms by which ACCA induces apoptosis in breast cancer cells. Our investigation also revealed that although Bax expression is regulated positively by wild-type p53 [31], ACCA is able to induce Bax irrespective of p53 status in breast cancer cells, suggesting that alternative pathways can be involved in Bax up-regulation after treatment with ACCA. Our results add to the growing evidence that has been accumulated over the past few years supporting the existence of p53-independent cell death induced by chemotherapeutic drugs [32–35]. At present, it unknown whether ACCA directly or indirectly induces Bax expression in breast cancer cells.

In summary, our study demonstrates that ACCA inhibits both breast cancer cell migration/invasion and tumors in vivo, and induces growth suppression and apoptosis in human breast cancer cell lines containing both normal and mutated p53. The cytotoxicity of this compound is highly related to the expression of apoptotic regulator molecules, such as Bcl-2 and Bax. Of potential importance and warranting expanded studies is the finding that ACCA is more growth inhibitory toward breast cancer and than normal cells. In this context, ACCA may have a great potential to selectively compromise tumor cell viability and to improve the effectiveness of chemotherapeutic agents against breast cancer.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JKM HB. Performed the experiments: LH ZA YAM. Analyzed the data: LH YAM JKM LS ZA HB. Contributed reagents/materials/analysis tools: ZA JKM LS CN. Wrote the paper: HB JKM LH.

## References

1. Anderson BQ, Yip CH, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, et al. (2008) Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit. *Cancer* 113: 2221–2243.
2. Banje J, Zwick E, Ullrich A (2003) Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 7: 548–552.
3. Wong H, Bendayan R, Rauth AM, Li YW (2007) Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles 59: 491–504.
4. Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314.
5. Cairns RA, Harris IS, Mark TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85–95.
6. Altenberg B, Greulich KO (2004) Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84: 1014–1020.
7. Dang CV, Hamaker M, Sun P, Le A, Gao P (2011) Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med* 89: 205–212.
8. Halestrap AP (2012) The monocarboxylate transporter family: Structure and functional characterization. *IUBMB Life* 64: 1–9.
9. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, et al. (2012) Role of monocarboxylate transporters in human cancers; state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 44: 127–139.
10. Frenzel J, Richter J and Eschrich K (2005) Pyruvate protects glucose-deprived Müller cells from nitric oxide-induced oxidative stress by radical scavenging. *Glia* 52: 276–288.
11. Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, Matsumara A, Matsumara K, et al. (2004) Role of lactate in the brain energy metabolism: revealed by bioreadiography. *Neurosci Res* 48: 13–20.
12. Diers AR, Broniowska KA, Chang CF, Hogg N (2012) Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochem J* 444: 561–571.
13. Sonveaux P, Vergran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, et al. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118: 3930–3942.
14. Kim HS, Masko EM, Poulton SL, Kennedy KM, Pizzo SV, et al (2012) Carbohydrate restriction and lactate transporter inhibition in a mouse xenograft model of human prostate cancer. *BJU Int* 110: 1062–1069



15. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, Yu P, Francis TB, et al. (2011) Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. *Neoplasia* 13: 620–632.
16. Colen CB, Seraji-Bozorgzad N, Marples B, Galloway MP, Sloan AE, et al. (2006) Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy : an in vitro study. *Neurosurgery* 59: 1313–1323.
17. Wosikowski K, Regis JT, Robey RW, Alvarez M, Buters JT (1995) Normal p53 status and function despite the development of drug resistance in human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 6: 1395–1403.
18. Lebedeva IV, Pande P, Patton WF (2011). Sensitive and specific fluorescent probes analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. *PLoS One* 6: e22429.
19. Boukerche H, Su ZZ, Emdad L, Baril P, Balme B, et al. (2005) MDA-9/syntenin : A positive regulator of metastasis. *Cancer Res* 65: 10901–10911.
20. Boukerche H., Baril P, Tabone E, Bérard F, Sanhadji K, et al. (2000) A new Mr 55,000 surface protein implicated in melanoma progression : association with metastatic phenotype. *Cancer Res* 60: 5848–5856.
21. Del Prete, E, Lutz TA, Scharrer E (2004) Inhibition of glucose oxidation by alpha-cyano-4 hydroxycinnamic acid stimulates feeding in rats. *Physiol Behav* 80: 489–498.
22. Harris T, Eliyahu G, Frydman L, Degani H (2009). Kinetics of hyperpolarized 13C1-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18131–18136.
23. Cross RA, Storck CW, Daskalakis C, Berd D, Wahl ML (2003) Intracellular acidification abrogates the heat shock response and compromises survival of human melanoma cells. *Mol Cancer* 2: 383–388.
24. Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, et al. (2006) Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res* 26: 3561–3566.
25. Young CD, Anderson SM (2008) Sugar and fat - that's where it's at : metabolic changes in tumors. *Breast. Cancer Res* 10: 202.
26. Spencer T, Lehninger AL (1976) L-lactate transport in Ehrlich ascites-tumour cells. *Biochem J* 154: 405–414.
27. Diers AR, Higdon AN, Ricart KC, Johnson MS, Agarwal A, et al. (2010) Mitochondrial targeting of the electrophilic lipid 15-deoxy-Delta 12, 14- prostaglandin J2 increase apoptotic efficacy via redox cell signaling mechanisms. *Biochem J* 426: 31–41.
28. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G (2006) p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 13: 293–325.
29. Kuwana T, Newmeyer DD (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15: 691–699.
30. Scorrano L, Korsmeyer SJ (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 437–444.
31. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, et al. (1996) The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 10: 461–477.
32. Lanni JS, Lowe SW, Licitra EJ, Liu JO, Jacks T (1997) p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9679–9683.
33. Marchini S, Ciro' M, Brogini M (1999) p53-independent caspase-mediated apoptosis in human leukemia cells is induced by a DNA minor groove binder with antineoplastic activity. *Apoptosis* 4: 39–45.
34. Abeysinghe RD, Greene BT, Haynes R, Willingham MC, Turner J, et al. (2001) p53-independent apoptosis mediated by tachphyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis* 22: 1607–1614.
35. Petit T, Bearss DJ, Troyer DA, Munoz RM, Windle JJ (2003) p53-independent response to cisplatin and oxaliplatin in MMTV-ras mouse salivary tumors. *Mol Cancer Ther* 2: 165–171.

## **Communications orales**

- **L Hamdan, Z Arrar, J.M. Kajima, H. Boukerche.** Alpha Cyano-4-Hydroxy-3-Methoxycinnamic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *International Symposium of Chemistry for Life (ISCL)*, March **2013**, Tlemcen, Algeria.
- **L Hamdan, M Bost, BB Xuan, A Tabib, Q Timour.** Rôle du Sélénium dans la protection cardiovasculaire. Congrès de Pharmacologie, mai 2012, Rabat, Maroc.

## Liste des réactifs

Réactifs	Référence	Fournisseur
Trypsine	15090-046	Gibco-Life Technologies (France)
PS Pénicilline /Streptomycine	15140-122	Gibco-Life Technologies (France)
Glutamine	25030-024	Gibco-Life Technologies (France)
PBS Phosphate Buffered Saline	70011-044	Gibco-Invitrogen (France)
MEM	10370-047	Gibco-Invitrogen (France)
DMEM	31885-023	Gibco-Invitrogen (France)
RPMI-1640	31870-025	Gibco-Invitrogen (France)
Insulin human recombinant	12585-014	Gibco-Invitrogen (France)
Horse serum	16050-130	Gibco-Invitrogen (France)
EGF	PHG0311L	Gibco-Invitrogen (France)
Sodium-Pyruvate	11360-039	Gibco-Invitrogen (France)
DMSO Diméthylsulfoxyde	D2650	Sigma (France)
Bleu de méthylène	M-9140	Sigma (France)
NaCl	231-598-3	Sigma (France)
SDS	811030	ICN Biomedicals
TEMED Tétraméthylènediamine	110-18-9	ICN Biomedicals
Glycine	07132391	Biosolve chimie (France)
Tris	20032391	Biosolve chimie (France)
MTT	475989	Calbiochem (Germany)
Kit Apoptose Annexin FITC PI	CBA059	Calbiochem (Germany)
SVF Sérum de veau fœtal	CVF-SVF00-01	Eurobio (France)
Ethanol	603-002-00-5	Merck (Germany)

<b>Réactifs</b>	<b>Référence</b>	<b>Fournisseur</b>
Anticorps anti-Bax	SC-6236	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Anticorps anti-Bcl-2	SC-130308	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Immun-Star™ Chemiluminescence Kit	HRP 170-5070	Biorad (France)
Protein Assay Reagent A	500-0114	Biorad (France)
Protein Assay Reagent B	500-0113	Biorad (France)
Lignée MDA-MB-231	HTB-26	ATCC (distribué par LGC Promochem, France)
Lignée T47D	HTB-133	ATCC (LGC Promochem, France)
Lignée MCF-7	HTB-22	ATCC (LGC Promochem, France)
Lignée Hela	CCL-2	ATCC (LGC Promochem, France)
Lignée HepG2	CRL-10741	ATCC ( Promochem, France)
APS Ammonium persulfate	9592	Carl Roth (Karlsruhe)
RESVERATROL 250mg	1967	Biovea (France)
DOXORUBICINE 50mg/25ml	00703-5046-01	TEVA (France)
FLUOROURACILE 500mg/10ml	10139-0063-11	BioNiche (France)
CYCLOPHOSPHAMIDE 500mg	10019-0955-01	Baxter (France)

**Liste du matériel**

<b>Appareils</b>	<b>Fournisseurs</b>
Lecteur spectrométrique de microplaques THERMO-max	Molecular Devices
Cytomètre en flux FACScan	Becton Dickinson
Système de migration de gels EPS 250	C.B.S Scientific companie
Centrifugeuse Jouan E96	S.A.V Jouan
Microscope optique TELAVAL 31	Carl Zeiss
Balance MEHLER M51AR	Sofranie
Congélateur	LieBHERR Comfort
Hotte à flux laminaire BHA48	Faster
Système de transfert Power-Pac 3000	Biorad
Etuve à 5% CO <sub>2</sub>	Revco

## Données chiffrées des graphiques

**Figure 10. Effet inhibiteur du resvératrol (RES) 100 $\mu$ M et du 3-BrPA 25 $\mu$ g/ml sur la croissance des lignées MDA-MB 231**

	Moyenne	SEM	p values
<b>RES 24H</b>	0,07	0,01	0,000
<b>RES 48H</b>	0,05	0,0	0,001
<b>3-BrPA 24H</b>	0,095	0,0	0,06
<b>3-BrPA 48H</b>	0,09	0,0	0,082

**Figure 11. Effet inhibiteur du resvératrol (RES) 100 $\mu$ M et du 3-BrPA 25 $\mu$ g/ml sur la croissance des lignées MCF-7**

	Moyenne	SEM	p values
<b>RES 24H</b>	0,06	0,0	0,000
<b>RES 48H</b>	0,07	0,0	0,001
<b>3-BrPA 24H</b>	0,1	0,0	0,06
<b>3-BrPA 48H</b>	0,14	0,0	0,071

**Figure 19. l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des lignées cancéreuses MDA-MB 231**

ACCA ( $\mu$ M)	24H			48H		
	Moyenne	SEM	p values	Moyenne	SEM	p value
<b>25</b>	0,094	0,001	0,091	0,18	0,02	0,000
<b>50</b>	0,075	0,001	0,037	0,11	0,001	0,000
<b>100</b>	0,078	0,001	0,037	0,098	0,01	0,000
<b>150</b>	0,07	0,001	0,019	0,099	0,01	0,000
<b>200</b>	0,069	0,001	0,01	0,097	0,01	0,000

Figure 20. l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des lignées cancéreuses MCF-7

ACCA ( $\mu$ M)	24H			48H		
	Moyenne	SEM	p values	Moyenne	SEM	p value
25	0,095	0,001	0,088	0,18	0,001	0,063
50	0,081	0,001	0,000	0,16	0,02	0,01
100	0,077	0,001	0,000	0,15	0,01	0,001
150	0,065	0,001	0,023	0,08	0,01	0,001
200	0,06	0,001	0,008	0,06	0,01	0,002

Figure 21. l'effet inhibiteur de l'ACCA sur la croissance des lignées cancéreuses T47D

ACCA ( $\mu$ M)	24H			48H		
	Moyenne	SEM	p values	Moyenne	SEM	p value
25	0,11	0,001	0,113	0,1	0,01	0,197
50	0,11	0,001	0,04	0,08	0,01	0,000
100	0,1	0,001	0,001	0,082	0,01	0,002
150	0,099	0,001	0,001	0,081	0,001	0,001
200	0,072	0,001	0,001	0,07	0,001	0,000

Figure 29 : Effet inhibiteur des dérivés D1 et D2 à 100 $\mu$ M sur la lignée MDA-MB 231

	Moyenne	SEM	p values
OD D1 24H	0,05	0,0	0,000
OD D1 48H	0,05	0,0	0,000
OD D2 24H	0,05	0,02	0,000
OD D2 48H	0,05	0,0	0,000



Figure 30 : Effet inhibiteur des dérivés D1 et D2 à 100µM sur la lignée MCF-7

	Moyenne	SEM	P values
OD D1 24H	0,05	0,0	0,000
OD D1 48H	0,05	0,01	0,000
OD D2 24H	0,05	0,0	0,000
OD D2 48H	0,05	0,0	0,000

Figure 31 et 32 : Effet inhibiteur du RES à 100µM, 3-BrPA à 25µg/ml, ACCA à 200µM, D1 et D2 à 100µM sur la lignée MDA/MB 231 à 24 et 48h

	C	RES	3-BrPA	ACCA	D1	D2
OD 24 H	0,11±0,0	0,07±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,05±0,0	0,06±0,0
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
OD 48 H	0,10±0,0	0,05±0,01	0,06±0,01	0,09±0,01	0,05±0,0	0,05±0,0
	<i>p</i>	0,002	0,80	0,001	0,000	0,000

Figure 33 et 34 : Effet inhibiteur du RES à 100µM, 3-BrPA à 25µg/ml, ACCA à 200µM, D1 et D2 à 100µM sur la lignée MCF-7 à 24 et 48h

	C	RES	3-BrPA	ACCA	D1	D2
OD 24H	0,1±0,0	0,05±0,0	0,08±0,01	0,06±0,0	0,05±0,0	0,05±0,0
	<i>p<sup>a</sup></i>	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000
OD 48H	0,15±0,0	0,06±0,0	0,09±0,0	0,06±0,0	0,06±0,0	0,05±0,0
	<i>p<sup>a</sup></i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

# **LEXIQUE**

**Adénocarcinome :** tumeur maligne qui se développe aux dépens de tissus (ensemble de cellules) glandulaires

**Alopécie :** chute totale ou partielle des cheveux ou des poils.

**Angiogenèse :** formation de nouveaux vaisseaux sanguins, à partir de vaisseaux préexistants, qui permettent d'irriguer notamment les tumeurs cancéreuses.

**Apoptose :** ensemble des mécanismes survenant au sein de la cellule et aboutissant à la mort de celle-ci physiologiquement.

**Carcinome :** respect par le malade d'une prescription ou d'un régime.

**Compliance :** rapport entre le volume du réservoir élastique et la pression du fluide qu'il contient.

**Cytochrome C :** classe de transporteur des électrons au cours de la respiration cellulaire mitochondriale.

**Dénaturation des protéines :** désorganisation de la structure spatiale sans rupture des liaisons covalentes. La chaîne polypeptidique est alors partiellement ou totalement dépliée.

**Etiopathogénie :** étude des causes d'une maladie et des processus par lesquels ces causes agissent.

**Epigénétique :** étude des changements d'expression des gènes survenant en l'absence de mutations de l'ADN.

**Ganglion lymphatique :** les ganglions lymphatiques, dont l'inflammation chronique est appelée adénopathie, sont le point de rencontre des vaisseaux lymphatiques.

**Métastases :** processus par lequel des cellules tumorales prolifèrent et se disséminent dans l'organisme pour atteindre d'autres organes.

**Mutation somatique :** mutation survenant dans une cellule non germinale.

**Néoplasme :** tumeur, bénigne ou maligne, résultant d'un processus de transformation aboutissant à une structure morbide (pathologique).

**Oncogenèse :** ensemble des facteurs et des mécanismes à l'origine des cancers ou tumeurs malignes.

**Phase G0 :** phase de repos de la cellule.

**Phase S :** phase de la réplication de l'ADN.

**Phosphatidylsérine :** phospholipide principalement présent sur la face intracellulaire de la membrane plasmique.

**Tératogénicité:** capacité de certaines substances à provoquer ou à induire des anomalies et/ou des déformations fœtales.

**Tumeur bénigne:** néoformation tissulaire très proche des tissus normaux par sa structure, à croissance lente, et dont l'évolution spontanée, strictement locale, n'aboutit pas à la mort du sujet, sauf complications mécaniques ou métaboliques. Une tumeur bénigne ne donne jamais de métastase.

**Tumeur maligne:** maladie provenant d'une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules cancéreuses, pouvant aboutir à des métastases.

## RESUME

Le cancer du sein est la première cause de mortalité féminine dans le monde, constituant un véritable souci de santé publique. Les axes principaux de ce travail consistent à étudier, *in-vitro*, les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques du resvératrol, 3-BrPA, ACCA ainsi que de leurs dérivés ciblés, sur des lignées cancéreuses humaines mammaires, notamment MDA-MB 231, MCF-7 et T47D. Les résultats des tests du MTT ont révélé une baisse significative de la croissance cellulaire à des concentrations respectives de 100µM pour le resvératrol et ses dérivés, et de 50 à 200µM pour l'ACCA, par comparaison avec le contrôle. En revanche, une synergie antiproliférative significative a été observée, uniquement lors de l'association du 3-BrPA (25µg/ml) au traitement anticancéreux conventionnel (5µg/ml Dox+ 25µg/ml 5-FU+ 500µg/ml CPA). De plus, les tests de clonogénicité et de cytométrie en flux, consécutifs au traitement avec l'ACCA, ont démontré une diminution de la viabilité cellulaire et une induction à l'apoptose avec un effet moindre sur les cellules humaines non-cancéreuses HBL100. La stimulation des cellules cancéreuses mammaires avec l'ACCA augmenterait l'expression des protéines Bax et du ratio Bax/ Bcl-2, un processus largement impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée. Par ailleurs, nous avons démontré la capacité de l'ACCA à inhiber la migration et l'invasion des cellules MDA-MB 231 *in-vitro*. Aussi, la croissance tumorale des MDA-MB231 a été affectée de manière significative par l'ACCA *in-vivo*. De ce fait, ces résultats montrent que nos produits de synthèse et plus précisément l'ACCA seraient une cible thérapeutique très prometteuse dans le traitement du cancer du sein.

**Mots clés :** resvératrol, acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique, acide 3-bromopyruvique, cancer du sein, stress oxydatif, métabolisme énergétique, prolifération, apoptose.

## ABSTRACT

Breast cancer is the first feminine death-causing factor in the world and is an utmost concern for public health. In this context, the present work has examined the *in vitro* anti-proliferative and pro-apoptotic effects of resveratrol, 3-BrPA, ACCA as well as their targeted derivatives, on human breast cancer cell lines, namely MDA/MB 231, MCF-7 and T47D. The results of the MTT assay revealed a significant reduction of cellular growth at 100µM concentrations for resveratrol and its derivatives, and in the range of 50-200µM for ACCA, compared with the control. However, a significant anti-proliferative synergy was observed only during the association of 3-BrPA (25µg/ml) in the conventional anticancer treatment (5µg/ml Dox + 25µg/ml 5-FU + 500µg/ml CPA). Colony formation and flow cytometry assays, consecutive to treatment with ACCA, demonstrated a significant decrease of cell viability and an induction of apoptosis with minimal effects on normal cells. The stimulation of breast cancer cells versus apoptosis with ACCA would increase the expression of Bax proteins and the ratio of Bax to Bcl-2, a process widely involved in the stimulation of the programmed cellular death. Besides, we have demonstrated the *in vitro* ability of ACCA to inhibit the migration and invasion of MDA-MB231 cells with ACCA. Additionally, tumor growth of MDA-MB231 breast cancer cells was dramatically affected *in vivo* by ACCA. Therefore, these results show that our products, mainly ACCA, might be very promising therapeutic targets in the treatment of breast cancer.

**Key words:** resveratrol,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, 3-bromopyruvic acid, breast cancer, oxidative stress, energy metabolism, proliferation, apoptosis.

## ملخص

يعتبر سرطان الثدي السبب الأول في وفيات النساء في العالم، وهو يشكل مصدر قلق حقيقي في مجال الصحة العمومية. تتمثل المحاور الأساسية لهذا العمل في دراسة مخبرية لآثار الحادة من الانتشار لعقار ACCA، 3-BrPA وكذا مشتقاتها المستهدفة، على الأجيال المتتالية لخلايا سرطان الثدي لدى البشر، ولأسيما MDA/MB231، MCF-7 و T47D. لقد كشفت نتائج اختبار MTT انخفاض ملحوظ في نمو الخلايا بتركيزات معتبرة بلغت على التوالي 100µm فيما يخص عقار ريسفيراترول ومشتقاته من 50 إلى 200µm فيما يخص عقار ACCA مقارنة مع المراقبة. إلا أنه لوحظ في المقابل وجود تآزر معتبر مضاد للانتشار عند إشراك عقار خلال اجتماع 3-BrPA (25µg/ml) فقط في العلاج المتعارف المضاد للسرطان (5µg/ml Dox+25µg/ml 5-FU+500µg/ml CPA). زيادة على ذلك، فإن تجارب الاستنساخ الجيني والقياس الخلوي عند التدفق نتيجة للعلاج بعقار ACCA قد بينت انخفاضا في حيوية الخلايا وعلاقة بموت الخلايا المبرمج بأثر أقل على الخلايا البشرية غير السرطانية HBL100. ويبدو من ذلك أن تحفيز الخلايا السرطانية بواسطة عقار ACCA قد يزيد من وجود بروتينات Bax ومن نسبة Bax/Bcl-2 وهو أسلوب يدخل بنسبة كبيرة في بداية موت الخلية المبرمج. من جهة أخرى، برهنا على قدرة عقار ACCA في منع هجرة وغزو خلايا MDA-MB 231 في المختبر. وعليه، فإن نمو ورم MDA-MB 231 قد تضرر بكيفية معبرة بعقار ACCA في المختبر. ومن هنا، تبين النتائج بأن منتجاتنا الاصطناعية المركبة ومنها عقار ACCA على وجه التحديد قد يمثل دريئة علاجية واعدة في علاج سرطان الثدي.

**الكلمات المفتاحية:** ريسفيراترول - حمض  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-3-méthoxycinnamique - حمض 3-bromopyruvique - سرطان الثدي - قلق الأكسدة - الأبيض الطاقوي - الانتشار - موت الخلايا المبرمج.