



FACULTÉ
DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Contribution à l'étude de la Sphaeropsidine A et de ses dérivés pour combattre certains cancers agressifs et en particulier, les mélanomes

Thèse présentée par Aude INGELS

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences biomédicales et pharmaceutiques

Année académique 2019-2020

Sous la direction de la Professeure Véronique Mathieu, Promotrice
et du Professeur Karim Amighi, Co-promoteur

Jury de thèse :

Cédric DELPORTE (Université libre de Bruxelles, Président)

Hassan JIJAKLI (Université libre de Bruxelles, Secrétaire)

Ghanem E. GHANEM (Institut Bordet, Laboratoire d'oncologie et de chirurgie expérimentale)

Pierre DUEZ (UMons, Service de Chimie thérapeutique et Pharmacognosie)

Akeila BELLAHCENE (GIGA, Cancer-Metastases Research Laboratory, Département des sciences biomédicales et précliniques)

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	II
TABLE D'ABREVIATIONS	XVI
RESUME	XXII
INTRODUCTION	3
I. Le cancer: généralités.....	3
II. Le mélanome	7
2.1. Epidémiologie et facteurs de risque.....	7
2.2. La physiopathologie du mélanome	9
2.2.1. Les origines du mélanome.....	9
2.2.2. Les principales voies de signalisation impliquées dans le mélanome.....	13
2.2.2.1. La voie des MAP kinases.....	13
2.2.2.2. La voie de signalisation de PI3 kinase.....	17
2.2.3. Implication des gènes suppresseurs de tumeurs.....	19
2.3. Diagnostic, classification et traitements	23
2.3.1. Diagnostic et classification du mélanome cutané.....	23
2.3.2. Traitements des mélanomes.....	25
2.3.2.1. Les recommandations pour une prise en charge des mélanomes.....	25
2.3.2.2. Répertoire des médicaments dans le traitement des mélanomes	27
III. Les différentes voies de mort cellulaire	39
3.1. L'apoptose	39
3.1.1. Description du schéma séquentiel du processus apoptotique	39
3.1.1.1. La voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose	41
3.1.1.2. La voie extrinsèque de l'apoptose.....	45
3.1.1.3. L'Apoptosis volume decrease (AVD)	47
3.2. L'autophagie	49
3.2.1. Les mécanismes du processus autophagique	49
3.2.2. Relation entre l'autophagie et l'apoptose	51
3.3. Le stress du réticulum endoplasmique et les morts cellulaires	53
IV. Les mécanismes de résistance des cellules tumorales	61
4.1. Hétérogénéité des cellules tumorales.....	61
4.2. Réduction ou inactivation de la molécule anti-cancéreuse	63
4.3. Régulation des enzymes de réparation de l'ADN	65
4.4. Altérations des voies de signalisation pro-apoptotique et activation de la survie	67
4.5. Résistance à l'anoïkose.....	69

4.6. Résistance à la réponse immune de l'organisme	71
V. La sphaeropsidine A comme traitement potentiel contre le cancer	75
5.1. Le potentiel des produits naturels issus de champignons	75
5.2. La sphaeropsidine A.....	77
5.2.1. Origine de la sphaeropsidine A	77
5.2.2. Les activités potentielles de la sphaeropsidine A.....	79
5.2.3. L'activité anti-tumorale in vitro de la sphaeropsidine A	81
5.2.4. Hypothèse du mode d'action de la sphaeropsidine A	83
OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE ET EXPLICATIONS DES DIFFERENTES PARTIES.....	89
PARTIE I: Etude DE LA SPHAEROPSIDINE A	95
Partie I.a.: Potentialisation des effets des agents chimiothérapeutiques avec la sphaeropsidine A	95
I. Introduction.....	95
II. Objectifs.....	99
III. Stratégie de recherche	99
3.1. Choix des agents chimiothérapeutiques	99
3.2. Régimes d'administration.....	101
3.3. Modèles cellulaires.....	101
3.4. Méthodologie exploratoire des combinaisons.....	103
IV. Matériels et Méthodes.....	105
4.1. Composés chimiques.....	105
4.2. Cultures cellulaires	105
4.3. Test colorimétrique MTT	107
4.4. Détermination du domaine de concentrations d'analyse.....	111
4.5. Elaboration du modèle de prédiction.....	113
4.6. Test de viabilité par bleu trypan.....	117
4.7. Détermination de l'additivité, du synergisme ou l'antagonisme des effets	117
V. Résultats.....	121
5.1. Activité de la sphaeropsidine A sur différents modèles de mélanome.....	121
5.2. Etablissement du modèle de prédiction.....	121
5.2.1. Détermination du domaine d'analyse.....	121
5.2.2. Plan expérimental et modélisation de la réponse	123
5.3. Détermination des meilleures combinaisons.....	129
5.4. Validation du modèle de prédiction.....	131
VI. Discussion et conclusions de la partie I.a.....	135

Partie I.b.: Amélioration des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de la sphaeropsidine A par formulation	145
I. Introduction.....	145
1.1. Les molécules insolubles	145
1.1.1. Modification du pH et salification des molécules ionisables	145
1.1.2. L'inclusion dans des complexes.....	147
1.1.3. Amorphisation et cristallisation d'une molécule	149
1.1.4. Réduction de taille des particules et la nanonisation	149
1.1.5. L'utilisation des co-solvants	151
1.1.6. La nano-émulsion	153
1.2. Les systèmes complexes d'administration de médicaments anticancéreux.....	153
1.2.1. Les micelles polymériques.....	153
1.2.2. Les liposomes	155
1.2.3. Les nanoparticules lipidiques solides	155
1.2.4. Les polymères et les polymères conjugués aux médicaments	157
1.2.5. Les dendrimères	157
1.3. Viser une administration ciblée de médicaments anti-cancéreux.....	159
1.3.1. Le ciblage passif.....	159
1.3.2. Le ciblage actif	159
1.3.3. Le ciblage médié par des cellules	161
II. Objectifs.....	163
IV. Résultats de l'étude préliminaire d'orientation de formulation.....	167
4.1. Approche de la solubilité et de la stabilité de la sphaeropsidine A	167
4.2. Premières approches d'essais de formulation de la sphaeropsidine A.....	173
4.2.1. Les co-solvants	173
4.2.2. Les complexes.....	177
4.2.2.1. Complexation à base d'hydroxypropyl-beta-cyclodextrine	179
4.2.3.2. Complexation à base de curcubit[N]urils	183
4.2.3. Les nanoparticules lipidiques solides	189
4.2.4. Conclusion des essais préalables des formulations	191

PARTIE II: ETUDE DES DERIVES DE LA SPHAEROPSIDINE A ET COMPARAISON DU MECANISME D’ACTION DU DERIVE PY-1 AVEC LE PRODUIT-MERE.....	193
I. Introduction et objectifs.....	193
II. Matériels et Méthodes.....	197
2.1. Composés chimiques.....	197
2.2. Cultures cellulaires.....	197
2.3. Test de prolifération cellulaire (test MTT) pour la détermination de l’IC ₅₀	197
2.4. Observation microscopique de la morphologie cellulaire.....	199
2.4.1. La microscopie en champ clair.....	199
2.4.2. Test de réversibilité des effets induits par le PY-1.....	199
2.5. Techniques de microscopie à fluorescence.....	201
2.5.1. Marquages au ER-tracker Red, au MitoTracker® green FM, au LysoTracker® Red DND-99, à l’acridine orange et au CellLight ER-GFP.....	203
2.5.2. Marquage à l’anti-golgine-97.....	205
2.5.3. Distribution du PY-1.....	207
2.6. La microscopie électronique à transmission.....	207
2.7. La coloration au Diff Quick.....	211
2.8. Mesure des activités protéolytiques du protéasome.....	211
2.9. Viabilité cellulaire par le bleu trypan.....	213
2.10. Etude du cycle cellulaire à l’aide du marquage par l’iodure de propidium.....	215
2.11. Détection de l’apoptose par cytométrie en flux.....	217
2.12. Dosage de l’activité des caspases -3, -8 et -9 dans les cellules.....	219
2.13. Mesure de la pénétration du PY-1 par fluorimétrie.....	221
2.14. Détermination de logP de la Sph A et du PY-1.....	223
III. Résultats.....	225
3.1. Activité anti-cancéreuse in vitro et structure-activité des dérivés.....	225
3.2. Importance de la liaison Sph A/pyrène pour l’activité anti-tumorale.....	227
3.3. Analyse spécifique de l’activité anti-cancéreuse in vitro du PY-1.....	231
3.5. Etude comparative des effets cellulaires de la Sph A et du PY-1.....	235
3.5.1. Observations des effets cellulaires du PY-1 et de la Sph A.....	235
3.5.2. Identification des vacuoles.....	237
3.5.2.1. Coloration cytologique.....	241
3.5.2.2. Marqueurs fluorescents.....	241
3.5.3. Implication du protéasome.....	245
3.5.4. Microscopie électronique à transmission.....	247
3.5.4.1. Confirmation de l’origine des vacuoles.....	247

3.5.4.2. Observations additionnelles sur le traitement au PY-1.....	247
3.5.4.3. Observation de l'ultrastructure avec un traitement sphaeropsidine A	251
3.6. Pénétration du PY-1 et de la sphaeropsidine A à l'intérieur de la cellule	253
3.6.1. Distribution du PY-1 au sein de la cellule	253
3.6.2. Mesure de la pénétration du PY-1 à l'intérieur de la cellule.....	253
3.7. Détermination du processus de mort cellulaire impliqué.....	255
3.7.1. La viabilité cellulaire	255
3.7.2. Analyse du cycle cellulaire.....	257
3.7.3. Visualisation de l'apoptose: marquage à l'annexine V	257
3.7.4. Implication des caspases	261
IV. Discussion et conclusions de la partie II.....	265
4.1. Etude de la recherche sur le PY-1.....	265
4.2. Etude complémentaire du mode d'action de la sphaeropsidine A.....	273
DISCUSSION GENERALE	279
CONCLUSIONS GENERALES	293
PERSPECTIVES GENERALES.....	297
I. Perspectives de recherches pour la sphaeropsidine A.....	297
II. Perspectives de recherches pour le PY-1	301
REFERENCE.....	309
ANNEXE	337
Annexe 1 : Donnéesbrutes expérimentales de la survie cellulaire_Condition Sph A + Cisplatine en mode séquentiel et concomitant.....	337
Annexe 2 : Donnéesbrutes expérimentales de la survie cellulaire_Condition Sph A + TMZ en mode séquentiel et concomitant	338
Annexe 3 : Isobogramme des combinaisons Sph A/cisplatine et TMZ.....	339
Annexe 4: Listes des 10 meilleures combinaisons déterminées par le modèle.....	340
Annexe 5: Validation des combinaisons par MTT	341
Annexe 12: Courbes doses-réponses des dérivés du groupe A et B	350
Annexe 13: Courbes concentrations-réponses des dérivés de la Sph A, du PY-1, du pyrène, de la Sph B, du PY-3 et des combinaisons	351
Annexe 14: Courbes concentrations-réponses du PY-1, de la Sph A, du PY-6 et du PY-7.....	352
Annexe 15: Immuno-marquage à l'anti-golgine 97	353
Annexe 16: Article d'Ingels Aude (2017)	354