

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DE BLIDA 1



FACULTÉ DE MÉDECINE
DÉPARTEMENT DE PHARMACIE

Digoxine : Essais précliniques en tant
qu'anticancereux : étude bibliographique
comparative

Thèse d'exercice de fin d'études

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Session JUILLET 2023

Soutenue par:

- **GHELAL Nadir**
- **ZAOUI Sara**

Promotrice : Dr. Lydia LACEB Maître-assistante en chimie thérapeutique.

Président : Dr. S. DJELLOULI Maître-assistant en pharmacologie.

Examinatrice : Dr. S. MELIANI Maître-assistante en pharmacognosie

Année universitaire : 2022-2023

REMERCIEMENTS

*Nous commençons par remercier **ALLAH** notre seigneur pour nous avoir donné la sante et la puissance durant tous nos parcours, afin d'accomplir ce modeste travail.*

Nous remercions également notre encadreur :

***Dr. Lydia LACEB** qui a fait preuve d'une grande patience et était d'un grand apport pour la réalisation de ce travail, ses conseils, ses orientations, sa disponibilité, ainsi que son soutien moral et scientifique qui nous a permis de mener à terme de projet.*

Nous exprimons également nos sincères remerciements aux membres du jury :

*Au **Dr. S. DJELLOULI** pour avoir accepté de présider le jury de notre thèse.*

*Au **Dr. S. MELIANI** pour avoir accepté d'examiner ce travail et apporté leurs précieux conseils.*

A toute les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet de fin d'étude.

Dédicace

Je didie ce travail :

A ma très chère mère et mon père de leur soutien permanent durent tous mes années d'études leur sacrifice illimité, eux qui ont consenti tante d'effort pour mon éducation et pour me voit attendre cette étape de ma vie.

A mon frère qui est mon soutien dans cette vie, et a ces deux filles, mayar et sidra

A ce que j'appelle ma fille, Fereil

A ma sœur, mon âme sœur Chahra

A mes soeur, dont le soutien ne me quitte pas ,Sohila, Hizya, Amel

A mes nouveaux, mes petits poussins, Zino, Sifo, Mayson, Ndjmo, Anas, badis, Arwa

A mes amies et mes camarade

A Aghilesse khelifi

Sara ...

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.

A mes sœurs

A mes familles et mes amies

Nadir...

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Chapitre I: Généralités sur le cancer

I. Définitions	5
I.1. Cancer	6
I.2. Tumeur	6
I.3. Métastase	6
I.4. Cancérogenèse	6
II. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse	6
III. Classification et stades des cancers	8
IV. Causes	10
V. Symptômes	13
VI. Diagnostic	13
VII. Épidémiologie	15
VIII. Traitements	16

Chapitre II : Généralités sur les Glucosides cardiotonique

Glucosides cardiotoniques : Digoxine et digitoxine	30
I. Définition et découvert	33
II. Caractéristiques chimiques	33
III. Propriété pharmacocinétique et métabolisme	35
IV. Relation structure/activité	38
IV. Mode d'action digoxine et digitoxine	38
IVI. Plantes contenant digoxine et digitoxine.....	41
VII. Indications	43
VIII. Surdosage, intoxication, seuils toxicité	43
IX. Effet anticancéreux : digoxine et digitoxine	45
IX.1. Mécanisme d'action	45

IX.1.1. Digoxine	45
IX.1.2. Digitoxine	46

Chapitre III : Les essais précliniques

I. définition et historique.....	49
II. Recherches précliniques	50
II.1. In vitro	50
II.2. In vivo chez les animaux	51
III. Recherches anticancéreuses	52
IV. Essais précliniques sur le cancer	53
IV.1. Généralité	53
IV.2. Définitions des méthodes	55
IV.2.1. Méthodes de marquage de la prolifération cellulaire	55
IV.2.2. Western blot	56
IV.2.3. RT-PCR en temps réel	56
IV.2.4. FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)	57
IV.2.5. Cytométrie en flux	57
IV.2.6. ImmunoHistoChemistry (IHC)	58
IV.2.7. Monodansylcadaverine(MDC).....	60
V. Intérêt	61

IV. Partie pratique

Etude bibliographiques comparatif	63
I. Problématique et objectifs	63
II. PARTIE 01 : Inhibition de hif-1α par la digoxine	63
II.1. Matériel	63
II.2. Méthode	65
II.2.1. Choix du matériel	65
II.2.2. Etude comparative in vivo	74
II.2.3. Comparaison entre les résultats des deux articles 01 et 03	80
II.3.4. Des études in vitro 1 et 2	80

II.3. Résultats et discussion	89
III. Partie 2: Blocage de l'enzyme PI3K/Ait par la digoxine et comparaison avec combinaison du médicament G SK2606414	91
III.1. Matériel	91
III.2. Méthode	91
III.2.1. Points communs	91
III.2.2. Points différents	103
III.3. Résultats et discussion	110
Conclusion	115
Bibliographie	116
Annexes	127
Résumé	

Liste des abréviations

2D :	Bi Dimensionnelles .
ADME :	Absorption D istribution M étabolisme et E xcrétion.
ADN :	Acide D ésoxyribo N ucléique.
Ag :	Antigène.
Akt:	P rotéine k inase.
AMM :	Autorisation de M ise sur le M arché.
ARN_m :	Acide R ibo N ucléique m essenger.
ATP	A dénosine T riphos P hate.
BRCA 1 :	B reast cancer 1.
BRCA 2 :	B reast C ancer 2
BrdU :	B romo- D esoxy- U ridine
CA :	C arbohydrate A ntigen
CA125 :	C arbohydrate A ntigen 125.
Ca²⁺ :	C alcium.
CA27-29:	C ancer A ntigen 27-29.
CAR :	R écepteur d' A ntigène C himérique.
CAR-T :	T hérapie cellulaire par R écepteur d' A ntigène C himérique.
CD :	C luster of D ifferentiation.
Chx :	<i>Cyclo</i> H eximide.
CIRC :	C entre I nternational de R echerche sur le C ancer.
CMF :	La C yto M étrie en F lux.
CMH :	C omplexe M ajeur d' H istocompatibilité.
CO2 :	D ioxyde de C arbone.
CoClz :	<i>Chlorure de</i> C obalt.
DCFH-DA :	2', 7'-D iChloro F luorescein D iacetate.
DDR :	R éparation des D ommages à l' A DN.
DFX :	<i>Des</i> F errio X amine.
Dig :	<i>Digoxine.</i>
DMOG :	<i>Di</i> M éthyl ox alyl g lycine.
DMSO :	D iméthyl S ulf O xide.
DU145:	H uman P rostate C ancer C ell line.
ECG :	É lectro C ardio G raphie.
ERK:	E xtracellular signal- R egulated kinase.
FA:	F ibrillation A uriculaire.
Fab :	F ragments d' A nticorps.
FACS :	F luorescence- A ctivated C ell S orting.
FC:	F réquence C ardiaque.
FDA U.S:	F ood and D rug A dmistration.
GLUT1 :	T ransporteur de glucose de classe I.
HCG:	H uman C horionic G onadotropin.
Hep3B:	H epatoma cell line.
HER2:	H uman E pidermal G rowth F actor R eceptor-2.

HIF:	F acteurs I nduits par l' H ypoxie.
HIF-1α:	H ypoxia- I nducible F actor 1- \alpha .
HK1:	H exokinase 1.
HK2:	H exokinase 2.
HRP:	H orseradish P eroxydase.
IC:	I nsuffisance C ardiaque.
IHC :	I mmuno H isto C hemistry.
IRM:	I magerie par R ésonnance M agnétique.
K⁺ :	P otassium.
LLC :	leucémie L ymphoïde C hronique.
LNCAP:	L ymph N ode C arcinoma of the P rostate.
MAPK :	M itogen- A ctivated P rotein K inase.
MDC :	catégories cliniques m ajeures.
MDH :	M aladie de H odgkin.
mTOR:	m echanistic T arget O f R apamycin.
NCEs:	N ational C entrer for E ducation S tatistics
NDRG1:	N -myc D ownstream- R egulated G ene 1.
N-Myc :	F acteur de T ranscription.
NSCLC:	N on S mall C ell L ung C ancer.
OMC :	O bservatoire M ondial du C ancer.
ORL :	O to- R hino- L aryngologie.
PAMPA :	P erméabilité sur des M embranes A rtificielles en P arallèle.
PC3 :	<i>Human Prostate Cancer Cell.</i>
PCR :	R éaction de P olymérase en C haîne.
PI3K :	P hosphatidyl- I nositol-3- k inase.
PK :	P yruvate k inase.
PLC :	P hospho L ipase C .
PSA :	P rostate S pecific A ntigen.
RPS6 :	R ibosomal P rotein S 6.
SC :	S ous- C utanée.
SCFv :	S ingle- C hain V ariable F ragment.
SCID :	I mmuno D éficiência S évère C ombinée.
SRC :	C oactivateurs des R écepteurs S téroïdiens.
TCD :	T hérapie par C ellules D endritiques.
TCR :	R écepteur de C ellule T .
TDM :	T omodensitométrie.
TME :	T est de M aintien d' E veil.
TNM :	tumeur, ganglion, métastase (T umor, N ode, M etastasis).
TTF1 :	T hyroïde T ranscription F acteur -1.
VEGF :	F acteur de croissance de l' E ndothélium vasculaire.

Liste des Figures

Fig.1: Les six caractéristiques d'un cancer.....	8
Fig. 2: Cibles des principaux anticancéreux cytotoxiques.....	18
Fig. 3 : Activité de la topoisomérase I et de la topoisomérase.....	20
Fig.4 : Composants structurels de CAR (à gauche) et de la thérapie par cellules CAR-T modifiées par gène (à droite)	25
Fig. 5: Les différents niveaux de blocage des thérapies ciblées	27
Fig.6 : Structure bidimensionnelle de la digoxigénine associée aux sucres D -digitoxose	33
Fig. 7: Relation structure activité.....	37
Fig. 8: Structure et régulation de la Na,K-ATPase.....	38
Fig. 9 : La structure de la pompe à sodium. Représentation de surface de la structure de l'isoforme alpha1 liée à la digoxine chez le porc.....	40
Fig. 10 : Digitale laineuse	41
Fig. 11: Digitalis purpurea L.....	41
Fig. 12: Signe de la « cupule » digitalique	44
Fig. 13 : Effets de la digitoxine sur la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase à des concentrations micromolaires et nanomolaires.	47
Fig. 14 : Effet de la digoxine sur l'expression de HIF-1a et la croissance des xénogreffes tumorales...	75
Fig. 15 : Prolifération des cellules tumorales C4-2 et effets de la digoxine.....	76
Fig. 16 : Prétraitement des PC3 et traitement retardé des xénogreffes Pa93-Myc par la digoxine.. ..	77
Fig. 17 : Expression de HIF-1a dans la tumeur xénogreffée C4-2 régulée par la digoxine.. ..	78
Fig. 18 : Les cellules PC3 ayant une expression renforcée d'HIF-1a sont résistantes à la digoxine.....	79
Fig. 19 : Inhibition de HIF-1a et HIF-2a par les glycosides cardiaques.	81
Fig. 20 : Les glycosides cardiaques inhibent l'expression des gènes cibles de HIF-1 induite par l'hypoxie.....	82
Fig. 21: Les glycosides cardiaques inhibent la synthèse de la protéine HIF-1a.....	83
Fig. 22 : Digoxin atténue l'expression d'ARNm et des protéines de VEGF et NDRG1 dans les cellules A549 sous conditions hypoxiques.	85
Fig. 23 : Le digoxin supprime l'expression d'ARNm et de la protéine HIF-1a, et réduit le complexe HIF-1/DNA dans les cellules A549 sous conditions hypoxiques.	86
Fig. 24 : L'inhibition de HIF-1 par la digoxine est indépendante de mTOR et de la sous-unité Na ATPase	88
Fig. 25 : Mécanisme de régulation de l'expression du facteur inductible à l'hypoxie (HIF-1). La stimulation du facteur de croissance induit la synthèse de la sous-unité HIF-1	90
Fig. 26 : Effets de la digoxine sur la viabilité des cellules leucémiques.....	93
Fig. 27 : Effet inhibiteur de la digoxine sur la croissance des cellules cancéreuses du poumon non petites et des cellules mononucléaires du sang périphérique	94
Fig. 28: La digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules leucémiques. A : La cytométrie en flux montre que le traitement à la digoxine stimule de manière significative l'apoptose des cellules leucémiques K562 et THP-1.	96
Fig. 29: La digoxine induit l'apoptose des cellules A549.....	97
Fig. 30: La digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules leucémiques.	99
Fig. 31: La digoxine induit un arrêt des phases G1 et G2/M dans les cellules A549 et H1299, respectivement.....	100

Fig. 32: La digoxine inhibe la voie Akt d'une manière dépendante de la concentration dans les cellules leucémiques.....	101
Fig. 33 : La digoxine inhibe la voie Akt d'une manière temps dépendante dans les cellules leucémiques.....	102
Fig. 34 : La digoxine bloque la voie PI3K/Akt/mTOR dans les cellules A549 et H1299.	102
Fig. 35 : La digoxine active la voie UPR dans les cellules leucémiques	104
Fig. 36: La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de l'UPR inhibe de manière significative les cellules leucémiques.....	105
Fig. 37 : La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de l'UPR inhibe de manière significative les cellules leucémiques.....	106
Fig. 38 : Le traitement combiné de la digoxine et de l'inhibiteur de l'UPR supprime de manière plus significative la croissance tumorale de la leucémie dans le modèle de xéno greffe	107
Fig. 39 : La digoxine inhibe la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules A549 et H1299	109
Fig. 40: La digoxine induit l'autophagie des cellules A549 et H1299	110

Liste des Tableaux

Tableau .1 : Agents favorisant le développement d'un cancer.....	11
Tableau 2 : les médicaments antimétabolites existants	21
Tableau 3: la différence de la structure chimique entre la digoxine et digitoxine.....	34
Tableau 4 : les différentes propriétés physico-chimique de la digoxine et digitoxine	35
Tableau 5: tableau illustre des informations des articles 1,2 et 3	63
Tableau 6: Comparaison entre les matériels	65
Tableau7: tableau illustre des informations des articles 4 et 5	91

Introduction générale

Les plantes contenant des hétérosides cardiotoniques sont connues depuis l'Antiquité pour leurs propriétés thérapeutiques.

La digoxine, obtenu à partir des feuilles de la digitale laineuse (*Digitalis lanata*, est un glycoside cardiotonique qui est utilisée dans le traitement de diverses affections du cœur, mais son indication tend à se restreindre malgré qu'elle fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé .

L'oncologie connaît des avancées spectaculaires qui ont permis, au cours des deux dernières décennies, de faire émerger de nouveaux traitements *anticancéreux* tels que les thérapies ciblées et l'immunothérapie.

Les études de cancérogenèse qui se font chez la souris et le rat et doivent être poursuivies tout au long de leur vie (environ deux ans). Par contre, La biologie moléculaire permet, à la fois pour diminuer la durée de souffrance des animaux et le coût très élevé des recherches, des souris possédant un gène (*myc*) qui les rend plus rapidement sensibles aux produits cancérogènes .Depuis quelques années, les études concernent le devenir du médicament dans l'organisme (pharmacocinétique), son action au niveau des divers organes (pharmacodynamie) et sa toxicité.

Suite à différents travaux et recherche, un effet anticancéreux de la digoxine a été mis en avant, et les résultats des essais précliniques *in vivo* et *in vitro* ont été publié par différents laboratoire.

Notre travail vise à comparer, évaluer et discuter des articles scientifiques liés aux études de la molécule de digoxine en tant qu'agent anticancéreux afin d'analyser deux théories sur les factures HIF1A et PI3K.

Pour atteindre nos objectifs ; nous devons examiner un point essentiel suivant :

Quelles sont les méthodes précliniques *in vivo* et *in vitro* pour évaluer les activités de substance digoxine contre les tumeurs

Est-ce que la digoxine sera-t-elle adoptée comme médicament anticancéreuse à l' avenir ??

Ce manuscrit est divisé en deux parties. La première partie est composée de trois chapitres. Le premier chapitre généralité sur le cancer et anticancéreux Le deuxième chapitre étude des glycoside cardiotoniques .Enfin, le troisième et dernier chapitre généralités sur les essais précliniques.

La seconde partie de ce manuscrit se focalise sur une étude bibliographique comparative qui consiste en une étude d'articles publiés récemment concernant la l'effet anticancéreux de la digoxine.

Partie
théorique

Chapitre I :
Généralités sur le cancer

I. Définitions

I.1. Cancer

Le cancer est une maladie due à une prolifération cellulaire anarchique. Ces cellules forment des amas, les tumeurs, qui envahissent les tissus sains. Elles peuvent également se disséminer dans le reste du corps où elles forment d'autres tumeurs, les métastases. [1], [2]

Le cancer est la conséquence d'une dérégulation des mécanismes de prolifération, de survie et de différenciation cellulaires, le développement de cellules potentiellement cancéreuses est inhérent à l'existence même de la vie. Il est donc vraisemblable que l'éradication complète des cancers est illusoire. Cependant, la comparaison des caryotypes de cellules cancéreuses à leur équivalent normal révèle de multiples anomalies, et c'est l'un des reflets des modifications génétiques de tous ordres qui caractérisent les cellules cancéreuses. Ces anomalies s'accumulent au cours d'un long processus qui permet successivement la transition d'une cellule normale à une cellule « potentiellement » cancéreuse ou précancéreuse, la formation d'une tumeur primitive localisée, l'invasion tissulaire et enfin le détachement de cellules cancéreuses de la tumeur primitive et leur intravasation, ce qui permet leur migration puis la formation de métastases à distance. [3]

I.2. Tumeur

Une tumeur est une masse plus ou moins volumineuse due à une multiplication anormale de cellules. La cellule est l'unité de base dont sont constitués tous les tissus des organismes vivants. Il en existe dans le corps plus de deux cents types différents : les cellules musculaires, nerveuses, osseuses, etc. Chaque cellule a un rôle précis et une durée de vie limitée. En permanence, les cellules vieillissent, meurent et sont remplacées par d'autres. Pour des raisons encore inconnues, il arrive que certaines cellules se modifient et continuent à se multiplier au lieu de disparaître naturellement. Elles se multiplient alors jusqu'à former une tumeur. D'une manière générale, il existe trois types de tumeurs:

- Les tumeurs non cancéreuses, appelées tumeurs bénignes. Elles se développent lentement et restent localisées. Une fois traitées, elles ne récidivent généralement pas.
- Les tumeurs intermédiaires dites « atypiques » ou « évolutives ». Bénignes au début, elles peuvent se transformer en cancer dans un laps de temps variable.
- Les tumeurs cancéreuses, appelées tumeurs malignes. Elles se développent plus rapidement et ont tendance à envahir d'autres zones que celles où elles sont apparues au départ. Elles peuvent développer alors de nouvelles tumeurs appelées métastases. [4]

I.3. Métastase

Les métastases cancéreuses, processus impliquant la dissémination de cellules cancéreuses d'une lésion primaire vers des organes distaux, sont la principale cause de létalité du cancer. La dissémination des cellules à partir d'une tumeur primaire implique une variété de mécanismes cellulaires. Ceux-ci il s'agit notamment d'envahir le stroma ou de s'y associer, d'échapper à la surveillance immunitaire en inhibant ou en cooptant les processus

antitumoraux, d'échapper au microenvironnement tissulaire et de le moduler, et de développer une résistance aux interventions thérapeutiques. [5]

La métastase est un processus en plusieurs étapes comprenant :

1. l'infiltration locale de cellules tumorales dans les tissus adjacents
2. la migration transendothéliale des cellules cancéreuses dans les vaisseaux appelée intravasation
3. la survie dans le système circulatoire
4. l'extravasation
5. la prolifération ultérieure dans les organes compétents conduisant à la colonisation.

Mais elle est connue comme un processus très inefficace, car une chorégraphie coordonnée des multiples événements est nécessaire pour éviter l'échec du processus complexe. [6]

Finalement, Les métastases sont la principale cause de décès liés au cancer ; la prévention et le traitement des métastases sont donc essentiels pour améliorer les résultats cliniques. [7]

I.4. Cancérogenèse

La cancérogenèse est l'ensemble de phénomènes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse, la formation d'un cancer étant elle-même l'aboutissement d'événements résultant de la prolifération incontrôlée de cellules malignes sous l'effet cumulatif de multiples modifications génétiques. Il est habituel de distinguer plusieurs étapes clés dans la cancérogenèse. [8]

II. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

Pour devenir cancéreuse, une cellule doit accumuler certaines altérations précises de sa physiologie qui se résume en six caractéristiques (Fig. 1):

Ils sont séparées en groupes : celles qui évoluent à l'intérieur de la cellule, celles qui jouent un rôle de « facilitation » en permettant au cancer de croître et celles qui agissent dans le microenvironnement tumoral (à l'extérieur de la tumeur elle-même).

II.1. À l'intérieur de la cellule

II.1.1. Maintien des signaux de prolifération cellulaire

Dans les tissus sains, certaines protéines de signalisation appelées « facteurs de croissance » régulent la prolifération cellulaire. Le cancer est souvent qualifié de « maladie à prolifération massive » parce qu'il implique des cellules qui se divisent et prolifèrent de façon incontrôlée. Les signaux provenant des facteurs de croissance deviennent dérégulés, et les cellules cancéreuses produisent des molécules qui stimulent leur propre prolifération. De nombreux facteurs, y compris des gènes ayant muté connus sous le nom d'« oncogènes », contribuent à ce processus que les chercheurs tentent toujours de comprendre. [9]

II.1.2. Échappement aux suppresseurs de croissance

De nombreux gènes qualifiés de « suppresseurs de tumeur » agissent pour empêcher ou inhiber la prolifération de cellules; leur fonction est à l'opposé de celle des facteurs de croissance. Cependant, les cellules cancéreuses échappent à ces gènes suppresseurs de tumeur ou les inactivent, ce qui leur permet de continuer à se diviser de façon incontrôlée. [9]

II.1.3. Résistance à la mort cellulaire

L'apoptose est le mécanisme de défense naturelle du corps contre le cancer. En général, les cellules qui deviennent endommagées à cause de rayonnements, d'un traumatisme ou de dommages oxydatifs – qui provoquent souvent le type de mutations de l'ADN qui mènent au cancer – déclencheront le processus d'apoptose de façon préventive. En revanche, les cellules cancéreuses restreignent ou parfois passent outre ce mécanisme de protection. Pour survivre, il est essentiel que les cellules cancéreuses échappent à l'apoptose. Près de la moitié des cancers humains comportent des mutations du gène p53, une protéine essentielle de la voie apoptotique qualifiée de « gardien du génome ». [9]

II.1.4. Favorisation de l'immortalité répllicative

À mesure que les cellules normales vieillissent, les extrémités de leurs chromosomes (appelées « télomères ») commencent à se dégrader et à raccourcir, ce qui signale à la cellule de mourir. Cela semble faire partie du processus normal de vieillissement des cellules. Toutefois, les cellules cancéreuses ont élaboré un moyen de se diviser indéfiniment – les rendant pratiquement immortelles – en maintenant la longueur des télomères au-dessus d'un seuil critique. Les cellules cancéreuses ont diverses façons d'enrayer la dégradation des télomères, mais la plus courante consiste à activer une enzyme appelée « télomérase », qui protège les extrémités des chromosomes. La longue vie des cellules cancéreuses est un des éléments qui leur permet de proliférer et de se propager partout dans le corps. [9]

II.2. Microenvironnement tumoral (à l'extérieur de la tumeur)

II.2.1. Induction de l'angiogenèse

Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'avoir accès à leurs propres apports de sang et de vaisseaux sanguins par l'intermédiaire d'un processus appelé « angiogenèse tumorale ». En déclenchant le développement d'un réseau de vaisseaux sanguins pour fournir à une tumeur des éléments nutritifs et de l'oxygène et éliminer les déchets, une masse localisée de cellules tumorales devient invasive et métastatique. [9]

II.2.2. Activation de l'invasion et des métastases

Les cellules cancéreuses corrompent les fonctions normales de développement et d'homéostasie en les détournant à leurs propres fins. Les tumeurs sont composées d'une variété de cellules corrompues et recrutées pour fonctionner dans un microenvironnement complexe. Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'envahir d'autres tissus et de coloniser d'autres organes. Elles peuvent se propager dans tout l'organisme et perturber le

fonctionnement de tissus et d'organes normaux. C'est cette caractéristique distinctive qui rend le cancer si difficile à traiter avec succès. [9]

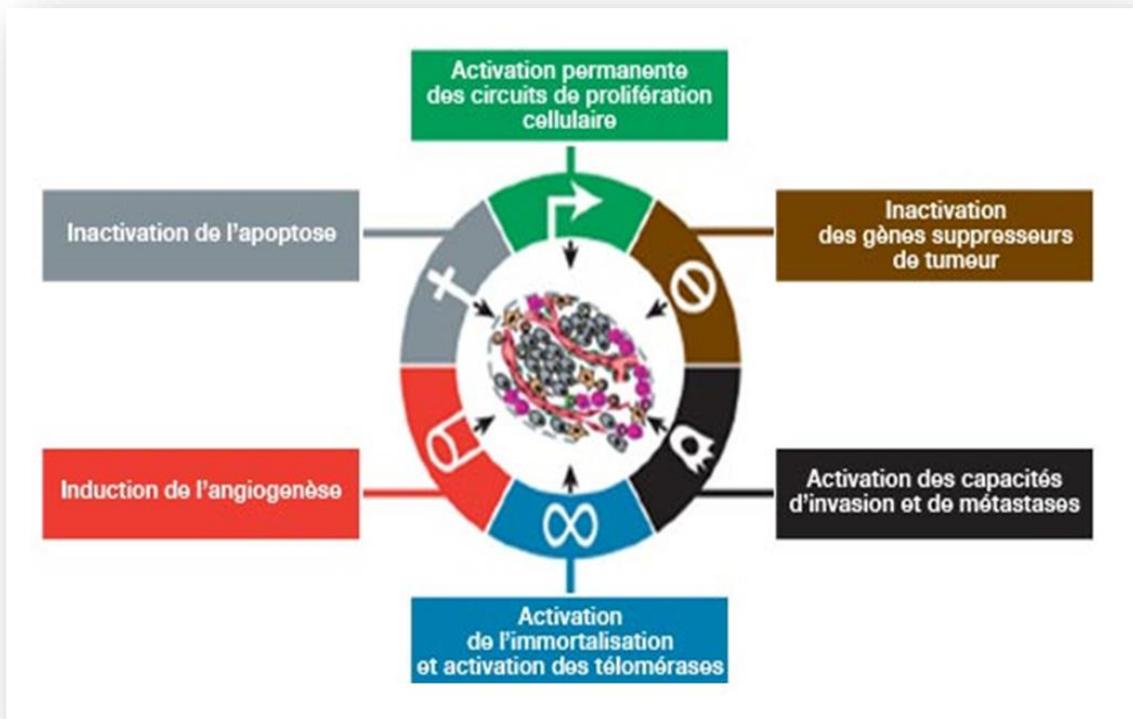


Fig.1: Les six caractéristiques d'un cancer. [10]

III. Classification et stades des cancers

III.1. classification par les types histologie

Le développement d'un cancer est différent selon qu'il s'agit d'une tumeur solide (carcinome ou sarcome) ou d'un cancer hématopoïétique. Au moment du diagnostic, en plus d'identifier le type de cancer, les médecins définissent le degré d'extension de la maladie (reposant sur l'étendue et le volume de la tumeur), c'est-à-dire son stade. Pour cela, ils utilisent des systèmes de classification.

Ainsi, on distingue :

III.1.1. Carcinome

Le carcinome est le type de cancer le plus courant, représentant 80 à 90% de tous les diagnostics de cancer. Le carcinome se forme dans le tissu épithélial qui est le tissu qui tapisse les organes, les passages internes dans le corps et la peau. Le carcinome apparaît sous la forme de tumeurs qui peuvent se former sur la peau ou dans les poumons, les seins, la prostate, le côlon, les reins, le pancréas, etc. [11]

III.1.2. Sarcomes

Les sarcomes sont un groupe hétérogène de néoplasmes malins issus de cellules mésenchymateuses. Ils peuvent être divisés en dizaines de catégories histologiques et peuvent apparaître dans pratiquement n'importe quel site anatomique. Cela donne lieu à un grand nombre de combinaisons possibles d'histologie et de site primaire qui ont une importance clinique. [12]

III.1.3. Cancers hématopoïétiques ou hématologiques

Les cancers "hématologiques" sont les cancers développés à partir de cellules du sang : globules blancs, globules rouges et plaquettes. Ils sont dus à des altérations de ces cellules survenant à différents stades de leur maturation et qui favorisent leur prolifération.

On distingue 3 grandes familles de cancers du sang :

- les leucémies, caractérisées le plus souvent par la présence de cellules anormales circulant dans le sang.
- les myélomes, qui se manifestent notamment par des lésions osseuses.
- et les lymphomes, qui touchent principalement les ganglions. [13]

III.2. Classification des tumeurs solides

Pour déterminer le stade du cancer, les médecins s'appuient le plus souvent sur un **système international de classification** appelé **TNM** (Tumor, Node, Mestastasis), fondé sur :

- La taille de la tumeur (T).
- L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques par des cellules cancéreuses (N, de l'anglais Node qui signifie ganglion).
- La présence ou non de métastases dans d'autres parties du corps (M).

Il existe 5 stades différents, numérotés de 0 à IV. La détermination des stades varie selon le type de cancer

Elle distingue cinq stades :

- Le stade 0 qui correspond à une tumeur dite in situ.
- Le stade 1 qui correspond à une tumeur unique et de petite taille.
- le stade 2 qui correspond à un volume local plus important.
- le stade 3 qui correspond à un envahissement des ganglions lymphatiques ou des tissus avoisinants.

- le stade 4 qui correspond à une extension plus large dans l'organisme sous forme de métastases. [14]

III.2. 1. Cancers «liquides» ou sanguins

On distingue 2 types de cancers dits liquides:

- les *leucémies* sont des cancers du sang et de la moelle osseuse. Les leucémies sont liées à la multiplication anarchique de cellules précurseurs (cellules immatures qui donneront naissance à des cellules «adultes») des globules blancs dans la moelle osseuse. Ces cellules vont ensuite envahir le sang.
- les *lymphomes* sont des cancers du système lymphatique: ganglions, mais aussi rate, foie, etc. Les lymphomes affectent les lymphocytes, un type de globules blancs. Il existe 2 grands types de lymphome, hodgkinien et non hodgkinien, dont les traitements et le pronostic sont différents.

III.2.2. Cancers «métastatiques» ou disséminés

Un cancer métastatique ou disséminé signifie que les cellules cancéreuses ont migré à travers le corps, par la voie des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et ont colonisé un ou plusieurs autre(s) tissu(s), loin de la tumeur d'origine. Différents organes peuvent être colonisés par ces métastases: os, foie, cerveau, poumon, etc. Mais la nature d'un cancer reste toujours déterminée par son point de départ.

III.2. 3. Cancers secondaires

Il arrive que certains traitements anti-cancer, indispensables pour guérir la maladie, puissent eux-mêmes provoquer l'apparition ultérieure de nouvelles cellules cancéreuses. Ce sont les cancers secondaires, consécutifs à un traitement.

Le type de cancer, sa localisation, son degré d'agressivité, ses manifestations cliniques et l'état de santé du patient déterminent la façon dont le cancer est traité. [15]

IV. Causes

La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse peut être induite par de nombreux facteurs liés aux modes de vie, à l'environnement ou encore à notre patrimoine génétique. L'étude des mécanismes biologiques qui sont à l'origine des cancers (ou cancérogenèse) a permis d'identifier un certain nombre de facteurs qui augmentent le risque de cancer.

Généralement les facteurs de risque dissocient en deux groupes :

1. les facteurs évitables : sont des éléments relatifs à notre comportement ou habitudes de vie (tableau 01) : [16]

* Les cancérogènes physiques : tels que les ultraviolets et les rayonnements ionisants.

* les cancérogènes chimiques : tels que l'amiante, composants de la fumée de tabac, Aflatoxines (contaminants alimentaires) ou arsenic (contaminants de l'eau).

* Les cancérogènes biologiques : tels que certains virus, bactéries ou parasites. [17]

2. les facteurs non évitables (sont, quant à eux, liés à notre âge, notre sexe, notre patrimoine génétique...) : [16]

* **Le vieillissement** : est un autre facteur fondamental du développement du cancer. On observe en fait que le taux d'incidence augmente fortement avec l'âge en raison de l'accumulation d'un risque de cancer spécifique au cours d'une vie, plus le fait que le mécanisme de réparation perd généralement de son efficacité. [17]

* **Les Facteurs génétiques**: la connaissance de facteurs génétiques, qu'il s'agisse de vrais gènes de prédisposition (par exemple BRCA 1, BRCA 2 pour le cancer du sein) ou l'existence de polymorphismes génétiques peut permettre d'envisager un dépistage de populations à risque dans un cadre de prévention secondaire voire dans certains cas des actions de prévention primaire (chimio-prévention, chirurgie prophylactique).

Les cancers héréditaires les plus fréquents comprennent certaines formes de cancer du côlon, de cancer du sein, de cancer de l'ovaire, de cancer de la prostate, de cancers médullaires de la thyroïde et de rétinoblastomes. [18]

* **Les maladies inflammatoires ou auto-immunes** : Dans le cas de certaines maladies chroniques comme les maladies inflammatoires ou auto-immunes, les déficits immunitaires sont associés à un risque augmenté de cancer ou de lymphome. [16]

Tableau .1 : Agents favorisant le développement d'un cancer. [18]

Facteurs de risque	Cancers associés
Agents physiques Rayons X UV	Leucémies, lymphomes Mélanomes

Radionucléides	Cancer de la thyroïde Leucémies
Agents chimiques	
Tabac	Cancer du poumon Cancer ORL Cancer de la vessie
Amiante	Mésothéliome Cancer du poumon
Goudron	Cancer des testicules
Sciure de bois	Cancer des fosses nasales
Agents biologiques	
Virus	
Virus de papillome humain	Cancer du col de l'utérus Cancer ORL Cancer du rectum, cancer du vagin
Virus des hépatites B et C	Cancer du foie
Virus d'Epstein-Barr	Lymphomes
Virus Herpès humain de type 8	Sarcome de Kaposi
Virus lymphotrope T humain de type 1	Lymphomes T
Bactéries	
Helicobacter pylori	Cancer de l'estomac
Salmonella typhi	Cancer de la vésicule biliaire
Chlamydia pneumoniae	Cancer du poumon
Parasites	
Schistosoma haematobium	Cancer de la vessie
Opisthorchis viverrini	Cholangiocarcinome hépatique

V. Symptômes

Chaque maladie cancéreuse présente des symptômes spécifiques, mais aussi un certain nombre de symptômes banals, liés à la dégradation de l'état général. S'ils persistent, il est conseillé de consulter un médecin pour en déterminer l'origine :

- **fatigue ou douleur persistante**, amaigrissement prolongé sans raison
- **sang dans les selles** (ou selles noires), constipation ou alternance constipation-diarrhée
- **saignements vaginaux** après les rapports sexuels ou entre les règles
- **sang dans l'urine** ou dans le sperme, difficultés à uriner
- **enrouement persistant**, modification de la voix, lésions dans la bouche, toux persistante
- **apparition d'une grosseur**, rougeur, modification de la forme d'un sein, écoulement coloré (sang) par le mamelon
- **apparition d'un ganglion** dans la région cervicale, sous le bras, dans l'aîne
- **nævus (grain de beauté)** qui évolue, plaie ou tache sur la peau qui ne guérit pas
- **grosseur dans un testicule**. [19]

VI. Diagnostic

Le diagnostic du cancer peut être suspecté sur l'interrogatoire et l'examen clinique. Il nécessite une confirmation par une biopsie associée à un examen histopathologique. Parfois, la première indication est un résultat d'examen biologique anormal (par exemple : anémie résultant d'un cancer du côlon).

Une anamnèse et un examen clinique complet peuvent révéler des indices inattendus d'un cancer précoce.

VI.1. Anamnèse

Le médecin doit être conscient des facteurs prédisposants et doit interroger spécifiquement sur l'existence de tumeurs familiales, l'exposition environnementale (tabagisme) et les maladies antérieures (p. ex., maladies auto-immunes, traitement immunosuppresseurs antérieurs, hépatites B et C, infection par le VIH, test de Papanicolaou anormal ou infection par un papillomavirus humain).

Les symptômes évoquant un cancer occulte peuvent comprendre :

- Fatigue, perte de poids, fièvres, sueurs nocturnes, toux.

- Hémoptysie, hématomèse, hématochézie, modification du transit, douleur persistante.

D'autres symptômes peuvent être présents selon le site du cancer (p. ex., enrouement dans le cancer du larynx ou saignement vaginal anormal dans le cancer de l'utérus).

VI.2. Examen clinique

L'examen clinique doit accorder une attention particulière à la peau, aux ganglions, aux poumons, aux seins, à l'abdomen et aux testicules. Le toucher rectal et vaginal et l'examen de la prostate sont également importants. Les signes permettent de diriger d'autres tests, y compris les rx et les biopsies.

VI.3. Examens complémentaires

Les tests comprennent des tests d'imagerie, des biomarqueurs et des biopsies; un ou plusieurs peuvent être indiqués en cas d'antécédents évocateurs ou de signes cliniques ou biologiques.

- **L'imagerie médicale** : comprend des rx sans préparation, des échographies, la TDM, la PET et l'IRM. Ces examens aident à identifier les anomalies, à déterminer la nature de la masse (solide ou kystique), à la mesurer et à établir les relations avec les structures voisines, ce qui peut être important si une chirurgie ou une biopsie est envisagée.
- **Les biomarqueurs** : peuvent apporter des éléments de preuve concordants en cas de signes évocateurs d'un cancer spécifique. La plupart ne sont pas utilisés comme des tests de dépistage systématiques, sauf chez le patient à haut risque. Ci-dessous certains exemples :
 - ✓ Alpha-Fœtoprotéine (carcinome hépatocellulaire, cancer du testicule).
 - ✓ Ag carcino-embryonnaire (cancer du côlon).
 - ✓ Bêta-HCG (human chorionic gonadotropin) (choriocarcinome, carcinome testiculaire).
 - ✓ Immunoglobulines sériques (myélome multiple).
 - ✓ Tests moléculaires (cancers divers).
 - ✓ CA125 (cancer de l'ovaire).
 - ✓ CA27-29 (cancer du sein).
 - ✓ PSA (Prostate specific antigen) (cancer de la prostate).
 - ✓ Certains de ces biomarqueurs peuvent être plus utiles pour surveiller la réponse au traitement que pour la détection des tumeurs.

- **La biopsie** : pour confirmer le diagnostic et le tissu d'origine est presque toujours nécessaire lorsqu'un cancer est suspecté. Le choix du site de la biopsie est habituellement déterminé par la facilité de l'accès et le degré de l'extension tumorale. En cas d'adénopathie, la biopsie à l'aiguille fine ou au trocart permettent de diagnostiquer le type de cancer. Les biopsies à cœur ou l'excision des ganglions lymphatiques sont recommandées pour le diagnostic des lymphomes, car la préservation de l'architecture nodale est importante pour un diagnostic histologique précis. Parfois une biopsie à ciel ouvert est nécessaire. D'autres voies de biopsies comprennent la bronchoscopie ou la médiastinoscopie pour les tumeurs médiastinales, pulmonaires ou centrales facilement accessibles, la biopsie hépatique percutanée en cas de lésions hépatiques et la biopsie sous contrôle TDM ou échographique des masses pulmonaires ou des tissus mous.
- **Le grade de la tumeur** : est une mesure de l'agressivité histologique du cancer et fournit d'importantes informations pronostiques. Il est déterminé par l'examen morphologique d'échantillon de tissu. Le grade est basé sur l'aspect morphologique des cellules cancéreuses, notamment l'aspect des noyaux, du cytoplasme, et des nucléoles; la fréquence des mitoses; et la quantité de nécrose. Pour de nombreux cancers, des classifications ont été développées.
- **Les tests moléculaires** : tels que les analyses chromosomiques, la fluorescence par hybridation in situ (FISH), la PCR et les antigènes de surface cellulaire (p. ex., dans les lymphomes, les leucémies, les cancers du poumon et digestifs) permettent de déterminer l'origine des cancers métastatiques, en particulier dans le cas des cancers dont l'origine du primitif est inconnue, ce qui peut être utile pour choisir le traitement. [20]

VII. Épidémiologie

En 2020, au niveau mondial, le cancer compterait 19,3 millions de nouveaux cas et serait à l'origine de 10 millions de décès d'après GLOBOCAN de l'Observatoire Mondial du Cancer (OMC) [21]. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) estime qu'un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et qu'un homme sur huit et une femme sur sept mourront de cette maladie. Un certain nombre de facteurs semblent être à l'origine de cette augmentation, en particulier l'accroissement et le vieillissement de la population mondiale et l'augmentation de l'exposition aux facteurs de

risque de cancer liés au développement social et économique. Pour les économies à croissance rapide, les données suggèrent un passage des cancers liés à la pauvreté ou aux infections à ceux associés à des modes de vie plus typiques des pays industrialisés. [22]

En Algérie, le cancer représente la deuxième cause de mortalité (après les maladies cardiovasculaires) avec un pourcentage de 21%. Le nombre de cancéreux en :

- 50.000 nouveaux cas de cancer sont recensés chaque année en Algérie, dont 1.500 enfants (soit une moyenne de 5 nouveaux cas par heure enregistrés chez les adultes, et 4 nouveaux cas par jour chez les enfants).
- Plus de 12.000 malades meurent chaque année faute de prise en charge adéquate.
- 70% des traitements effectués aux patients ne sont entamés qu'au stade avancé de la maladie. [23]

VIII. Traitements

La prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer est multidisciplinaire. Elle fait appel à différentes spécialités dont les plus connues sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Depuis quelques années, l'arsenal thérapeutique à la disposition du praticien s'est enrichi de l'hormonothérapie, de l'immunothérapie et des thérapies ciblées. Le projet thérapeutique ainsi élaboré est personnalisé et peut-être modulé en fonction de l'évolution tumorale. [24]

L'arsenal thérapeutique comprend :

- La chirurgie
- La radiothérapie
- Les traitements anticancéreux médicamenteux

VIII.1. Chirurgie

Elle est d'autant plus efficace lorsqu'elle est précoce et quand la tumeur n'est pas encore métastasée.

La chirurgie carcinologique est restée pendant de nombreuses années le seul traitement anticancéreux disponible, actuellement, elle s'intègre dans un projet thérapeutique. Sa mise en

oeuvre nécessite une discussion collégiale pluridisciplinaire. Elle doit être planifiée et impose la connaissance au préalable de la nature histologique de la tumeur. Cela nécessite la réalisation de biopsies ou de résections endoscopiques. Il convient, quand la preuve de la nature cancéreuse de la lésion est faite, de réaliser un bilan d'extension afin de discuter de l'opportunité d'un traitement néo-adjuvant. Enfin, il est important de connaître les limites du

geste chirurgical qui ne traite pas la maladie micro-métastatique. Cette dernière requiert l'instauration d'un traitement adjuvant comme la chimiothérapie. La chirurgie carcinologique s'intègre donc dans une stratégie thérapeutique même si elle reste, dans plus de 80% des cas, le recours thérapeutique majeur. Elle peut être palliative dans des cancers à des stades avancés en situation d'urgence. [25]

VIII.2. Radiothérapie

La radiothérapie ; comme les autres traitements anticancéreux, s'inscrit dans un projet thérapeutique, elle apparaît cependant quasi incontournable puisqu'elle est programmée dans les 2/3 des schémas thérapeutiques. Les protocoles de radiothérapie sont définis principalement en fonction du type de la tumeur, de sa localisation, de sa taille, de son extension et de son grade. [26]

Il existe différents types de radiothérapie :

VIII.2.1. Radiothérapie externe

Utilise plusieurs types de rayonnement :

- Des photons : qui sont capables de pénétrer profondément dans le corps tout en épargnant la peau, utilisés pour les tumeurs profondes (exemple : cancer du côlon).
- Des électrons : qu'il faut administrer en doses élevées jusqu'à quelques centimètres de la surface de la peau et une petite dose au-delà, utilisé pour les traitements superficiels, par exemple les cancers de la peau.
- Des protons : l'énergie de dépôt nécessite une extrême précision, ce qui limite donc la dose non désirée. Ils sont utilisés pour les cancers pédiatriques, les cancers du crâne et certaines tumeurs de la colonne vertébrale. [27]

VIII.2.2. Radiothérapie métabolique

Elle repose sur l'administration par voie orale ou intraveineuse d'éléments radiopharmaceutiques qui vont se fixer sur les cellules cancéreuses et les détruire, utilisée dans le cancer de la thyroïde ou les métastases osseuses. [28]

VIII.3. Traitements anticancéreux médicamenteux

Les traitements médicamenteux peuvent être utilisés dans plusieurs situation :

- **En préopératoire** : afin de réduire le volume d'une tumeur et d'en faciliter l'exérèse chirurgicale : traitement néoadjuvant.

- **En postopératoire** : afin de compléter le geste chirurgical et d'éviter les récives : traitement adjuvant.
- **En association a la radiothérapie** : afin d'augmenter la sensibilité de la tumeur a cette dernière : traitement chimio-radio concomitant.
- En situation de cancers disséminés ou métastatique.

Dans cette dernière situation ; les traitements médicamenteux anti-cancéreux sont utilisés suivant différentes lignes de traitement :

- Première lignée : traitement utilisable en première intention.
- Deuxième lignée : traitement utilisable en cas d'échec ou d'intolérance à la première lignée de traitement.
- Troisième lignée : traitement utilisable en cas d'échec ou d'intolérance à la deuxième lignée de traitement. [29]

VIII.3.1. Médicament cytotoxique

La classification des agents anticancéreux cytotoxiques se fait actuellement en fonction de leur mécanisme d'action sur le cycle cellulaire et leur appartenance à des familles chimiques (Fig. 2).

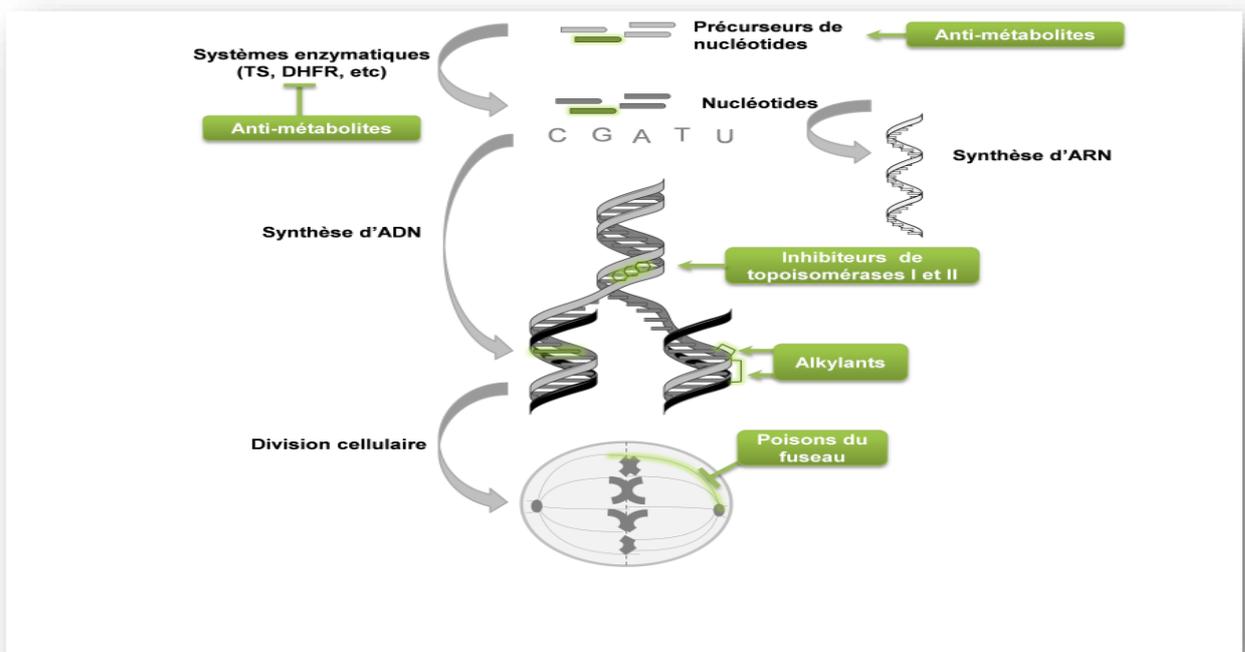


Fig. 2: Cibles des principaux anticancéreux cytotoxiques. [30]

On distingue :

VII.3.1.1. Agents alkylants**VIII.3.1.1.1. Mode d'action**

Leur mode d'action suppose que les cellules normales sont capables de réparer les erreurs induites par les alkylants alors que les cellules tumorales, du fait de leur défaut dans les protéines de réparation de l'ADN, ne peuvent le faire efficacement. [31]

Exemple : Le chlorméthine agit par formation d'un ion carbonium extrêmement réactif qui se fixe surtout sur les résidus guanine de l'ADN, en position N-7 (site nucléophile) en donnant des liaisons très stables. [32]

VIII.3.1.1.2. Médicaments existants**VIII.3.1.1.2.1. Moutardes à l'azote (chimiquement liées au gaz moutarde)**

- Cyclophosphamide

- Ifosfamide

-Estramustine - *moutarde azotée combinée à l'estradiol*

VIII.3.1.1.2.2. Nitroso-urées

-Bendamustine

-Fotemustine

-Lomustine

VIII.3.1.1.2.3. Dérivés du platine

-Cisplatine

-Carboplatine

-Oxaliplatine

VIII.3.1.1.2.4. Alkylants divers - non classés

-Mitomycine C

-Busulfan

-Procarbazine [31]

VIII.3.1.2. Inhibiteurs de Topoisomérase

VIII.3.1.2.1. Mode d'action

Les topoisomérase sont des enzymes assurant la condensation / décondensation de l'ADN après avoir créé des coupures transitoires de l'un (topoisomérase I) ou des deux (topoisomérase II) brins, puis leur ligation, permettant une relaxation des forces de torsion générées au moment de la réplication.

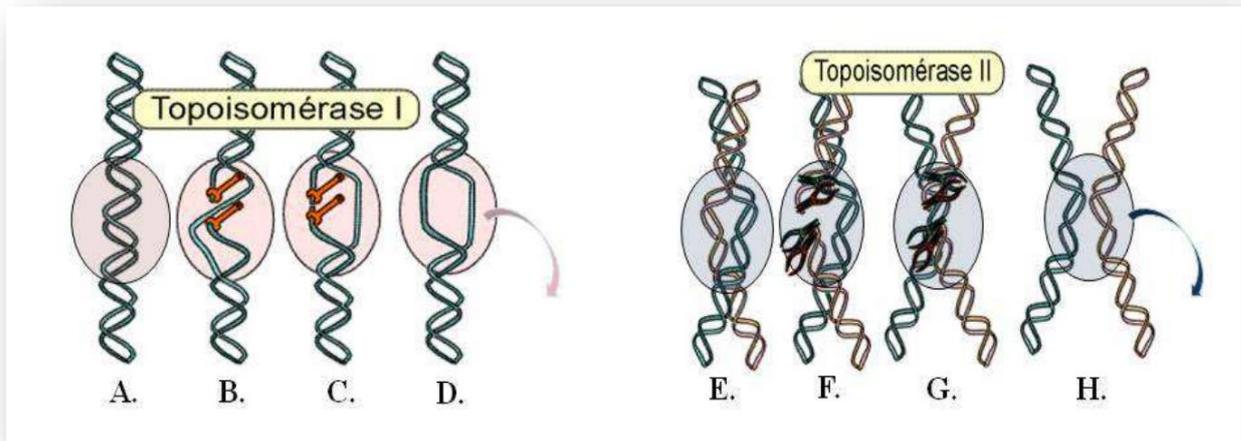


Fig. 3 : Activité de la topoisomérase I et de la topoisomérase II.

(A) Liaison non covalente de la topoisomérase I à l'ADN. (B) Clivage d'un brin et liaison covalente de l'enzyme à l'extrémité 3' de ce brin. (C) Relaxation de l'ADN et religation. (D) Libération de la topoisomérase I. (E) Fixation du dimère topoisomérase II. (F) Hydrolyse d'ATP et coupure des brins. (G) Hydrolyse d'ATP et séparation des brins du premier ADN par rapport aux brins non coupés du deuxième ADN. (H) Religation et hydrolyse d'ATP suivie d'une libération de la topoisomérase II. [33]

VIII.3.1.2.2. Médicaments existants

- Les inhibiteurs des ADN topoisomérase I (irinotecan et le topotecan) ou de topoisomérase II (telle que l'aclarubicine qui inhibe la fixation à l'ADN et la novobiocine qui inhibe la fixation de l'ATP) ne s'intercalent pas dans l'ADN mais bloquent le site catalytique.
- L'etoposide agit comme un poison en stabilisant le complexe de clivage [ADN/topoisomérase II] et en empêchant l'étape de religation, ce qui provoque une coupure définitive des brins d'ADN.
- Certains intercalants peuvent aussi empêcher le recrutement de la topoisomérase II, mais aussi de la topoisomérase I comme par exemple le composé Hoechst 33342. [33]

VIII.3.1.3. Antimétabolites

VIII.3.1.3.1. Mode d'action

Les antimétabolites sont des médicaments anticancéreux qui inhibent la synthèse des acides nucléiques, indispensables pour la multiplication cellulaire. Leur structure moléculaire est voisine de celle des composés naturels que les cellules utilisent pour synthétiser les bases azotées, précurseurs des acides nucléiques. Les antimétabolites bloquent le fonctionnement de certaines enzymes qui interviennent dans le métabolisme cellulaire. Ce sont des produits de synthèse, ayant subi des modifications de structure qui en font une « fausse clé » bloquant la « serrure » de l'activité cellulaire.

Ils sont répartis en deux classes :

1. Les inhibiteurs d'enzymes indispensables au métabolisme de l'acide folique (vitamine B9), dont le chef de file est le méthotrexate. Il inhibe la dihydrofolate-réductase et bloque la transformation de l'acide dihydrofolique (premier métabolite de l'acide folique) en acide tétrahydrofolique nécessaire à la synthèse des acides nucléiques.
2. Les médicaments qui interfèrent avec les bases puriques (médicaments qui vont ressembler à la guanine ou à l'adénine [34]) ou pyrimidiques (médicaments qui vont ressembler à la cytosine, à la thymine ou à l'uracile). Leur structure chimique est semblable aux bases naturelles et sont acceptées comme substrats. Ils inhibent ainsi la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines indispensables pour la division cellulaire. [35]

VIII.3.1.3.2. Médicaments existants

Parmi les antimétabolites couramment utilisés dans le traitement du cancer, on peut citer :

Tableau 2 : les médicaments antimétabolites existants [36]

Antifoliques	Antipuriques	Antipyrimidiques
Méthotrexate Pemetrexed Raltitrexed	Cladribine Fludarabine 6-mercaptopurine Nelarabine Pentostatine 6-thioguanine	Capécitabine Cytarabine 5-Fluorouracile Gemcitabine

Finalement, les antimétabolites sont le plus souvent utilisés pour traiter les leucémies et les cancers du sein, de l'ovaire et du tractus intestinal. Mais comme ces médicaments ralentissent la croissance de tout type de cellule se divisant rapidement, ils peuvent également être utilisés pour traiter d'autres cancers. [34]

VIII.3.1.4. Poisons du fuseau mitotique

VIII.3.1.4.1. Mode d'action

Les poisons du fuseau ont en commun de se lier à la tubuline qui entre dans la composition du fuseau mitotique et qui joue un rôle important dans le maintien du cytosquelette. Ils vont ainsi désorganiser la ségrégation des chromosomes au moment de la mitose et entraîner la mort de la cellule. On distingue plusieurs types de poisons du fuseau (on parle aussi d'agents tubulo-affines) en fonction de leur structure, de leur origine (souvent naturelle) et de leur site de liaison sur la tubuline ayant des conséquences diverses sur les microtubules.

VIII.3.1.4.2. Médicaments existants

VIII.3.1.4.2.1. Alcaloïdes de la Pervenche ou vinca-alcaloïdes

Empêchent la polymérisation des microtubules et les déstabilisent, on l'on distingue :

Vinblastine

Vincristine

vindésine

VIII.3.1.4.2.2. Taxanes

Sont, à l'inverse, des stabilisateurs du fuseau car ils empêchent sa dépolymérisation et stimule sa polymérisation :

- Paclitaxel, dérivé de l'If du Pacifique *Taxus brevifolia*
- Docétaxel
- Cabazitaxel

VIII.3.1.4.2.3. Eribuline

Est un analogue de synthèse de l'halichondrine B qui provient d'une éponge marine *Halichondria okadai*. Elle inhibe la croissance des microtubules sans altérer la phase de raccourcissement, la tubuline étant piégée dans des agrégats non productifs. [37]

VIII.4. Immunothérapie

Le terme générique « immunothérapie » englobe tous les traitements qui encouragent les défenses immunitaires du patient à attaquer le cancer. Contrairement à la chimiothérapie et à la radiothérapie, l'immunothérapie ne cible donc pas directement les cellules cancéreuses mais collabore avec le système immunitaire afin de les éliminer. [38]

L'immunothérapie du cancer est la quatrième stratégie la plus prometteuse pour la thérapie standard du cancer, après les opérations, la chimiothérapie et la radiothérapie. L'immunothérapie anticancéreuse a intrinsèquement des réponses de mémoire à long terme médiées par des réponses immunitaires adaptatives, ce qui contraste avec les opérations, la radiothérapie ou la chimiothérapie. [39]

L'utilisation de ces médicaments repose sur le postulat selon lequel l'organisme est capable de détecter la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses et de les éliminer. Il existe différents types d'immunothérapie dont nous mentionnons:

VIII.4.1. Immunothérapies non spécifiques

Les immunothérapies non spécifiques, également appelées agents immunomodulateurs non spécifiques, aident votre système immunitaire à détruire les cellules cancéreuses. Il existe plusieurs types d'immunothérapies non spécifiques qui agissent de différentes manières.

Les cytokines, Les cytokines font partie du système immunitaire. Ce sont des protéines qui envoient des messages entre les cellules pour activer le système immunitaire. Deux types de cytokines sont utilisés pour traiter le cancer : [40]

- ✓ **Interférons** : sont des cytokines produites par les macrophages et les lymphocytes non T, non B et ayant 3 actions principales : une action immuno-modulatrice portant sur l'immunité cellulaire, une action anti prolifératrice et une action antivirale. Les interférons alpha-2a et alpha-2b possèdent des indications dans le traitement de certaines leucémies, lymphomes et autres pathologies cancéreuses.
- **Interleukine-2** : c'est un facteur de croissance de lymphocytes T permettant la prolifération et l'activation de ces cellules. Elle est utilisée dans le traitement de certaines formes métastatiques du cancer rénal et de mélanome malin. [41]

VIII.4.2. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont conçus en laboratoire. Tout comme pour les anticorps que votre système immunitaire fabrique, leur travail est de déclencher une réaction du système immunitaire. Certains anticorps monoclonaux trouvent un antigène spécifique, comme une protéine, sur une cellule cancéreuse et s'y lient. Le système immunitaire sait alors qu'il doit attaquer et détruire ces cellules. Un exemple de ce type d'anticorps monoclonal est le rituximab (Rituxan). On se sert du rituximab pour traiter certains types de lymphome non hodgkinien ainsi que la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Les anticorps monoclonaux sont aussi un traitement ciblé puisqu'ils bloquent ou ciblent un gène anormal ou une protéine à l'intérieur d'une cellule cancéreuse. Ils ont d'autres fonctions :

- Bloquer les signaux de croissance et les récepteurs qui font croître le cancer.
- Administrer la radiothérapie ou la chimiothérapie aux cellules cancéreuses. [42]

VIII.4.3. Thérapie cellulaire T par récepteur d'antigène chimérique (CAR)

En tant que l'une des immunothérapies les plus populaires actuellement, la thérapie CAR-T montre sa force en renforçant le système immunitaire des patients pour détruire le cancer. Y compris la thérapie cellulaire T des récepteurs de cellules T (TCR), la thérapie cellulaire CAR-T, la thérapie cellulaire CAR-macrophage, la thérapie cellulaire CAR-NK, Les récepteurs antigéniques chimériques (CAR) sont des constructions de récepteurs recombinants qui sont composés d'un fragment variable extracellulaire à chaîne unique (scFv) dérivé d'un anticorps identifié spécifique du néoantigène tumoral, joint à un peptide charnière ou espaceur et à un domaine transmembranaire, qui est en outre lié aux domaines de signalisation des lymphocytes T intracellulaires du récepteur des lymphocytes T. Combinant la spécificité d'un anticorps avec les fonctions cytotoxiques et de mémoire des cellules T, la thérapie cellulaire CAR-T montre des fonctions thérapeutiques puissantes et prometteuses pour le traitement du cancer en haute affinité sans exigence dépendante du CMH.

La thérapie cellulaire CAR-T a été considérée comme l'avancée thérapeutique la plus importante depuis une génération. Toutes les étapes préalables aux essais cliniques sont illustrées dans la (Fig. 4). [43]

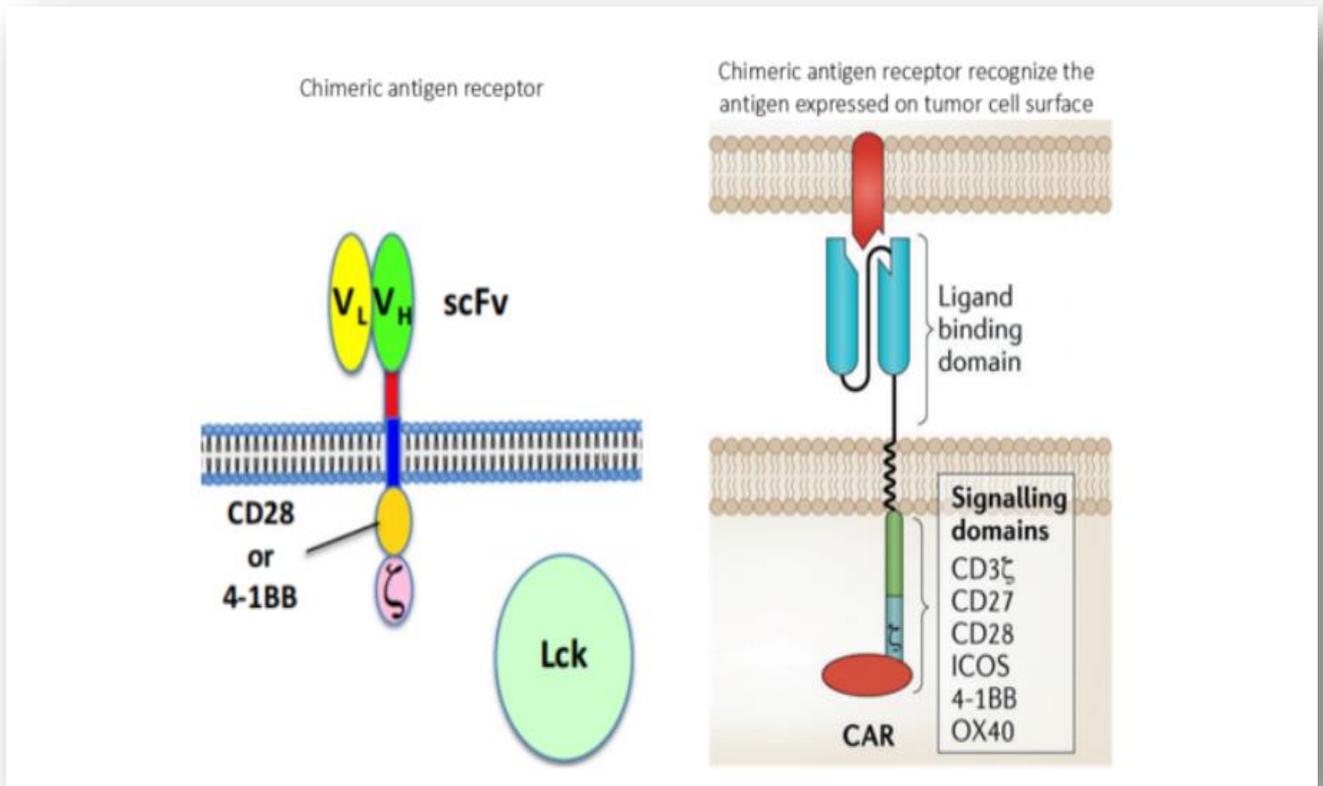


Fig.4 : Composants structurels de CAR (à gauche) et de la thérapie par cellules CAR-T modifiées par gène (à droite)

Les CAR-T, Parmi les différentes stratégies d’immunothérapie la plus récente, consiste à concevoir un traitement unique pour chaque patient à partir de ses propres lymphocytes T. [44]

VIII.4.4. Thérapie par cellules dendritiques

La thérapie par cellules dendritiques (TCD) est la thérapie immunitaire la plus naturelle contre le cancer. Elle active les cellules immunitaires de l’organisme et aide ce dernier à vaincre le cancer par ses propres moyens.

VIII.4.4.1. Mécanisme d’action

La thérapie par cellules dendritiques aide le corps à combattre lui-même le cancer.

- Elle réduit la charge tumorale jusqu’à 65 %.
- Est 4 à 6 fois plus efficace pour prévenir la possibilité de métastases.
- Forme une mémoire immunologique et peut ainsi prévenir les rechutes et les récives.
- Augmente de 2 à 3 fois l’efficacité d’autres traitements tels que la chimio, la radio

- Est sûr et bien toléré.
- Est facile à administrer- les cellules sont injectées sous la peau.

Les résultats du traitement peuvent déjà être attendus dans les 3 mois. Le plein effet de la thérapie par cellules dendritiques est visible après 6 à 9 mois.

VIII.4.4. Avantage

- Le principal avantage de la thérapie par cellules dendritiques, par rapport aux autres méthodes de traitement du cancer, est sa grande efficacité avec peu ou pas d'effets secondaires.
- La thérapie cellulaire dendritique convient à tous les types de cancer, à l'exception du cancer du sang (leucémie). [45]

VIII.4.5. Vaccins anticancéreux thérapeutiques

Les vaccins contre le cancer impliquent généralement l'administration exogène d'antigènes tumoraux sélectionnés combinés à des adjuvants qui activent les CD ou même les CD elles-mêmes. Les vaccins thérapeutiques contre le cancer ont pour but de stimuler le système immunitaire adaptatif du patient contre des antigènes tumoraux spécifiques afin de reprendre le contrôle de la croissance tumorale, induire la régression des tumeurs établies et éradiquer la maladie résiduelle minimale. Les principes de base nécessaires à la réussite d'une vaccination thérapeutique contre les tumeurs comprennent la délivrance de grandes quantités d'un antigène de haute qualité aux CD, l'activation optimale des CD, l'induction d'une forte CD4+ et des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), l'infiltration de la TME et la durabilité et le maintien de la réponse.[46]

VIII.5. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées anticancéreuses sont des médicaments qui visent à bloquer la croissance et/ou la propagation des cellules tumorales en s'attaquant spécifiquement à certaines de leurs. [47]

VIII.5.1. Mécanisme d'action

Contrairement aux chimiothérapies qui ont pour but de détruire les cellules cancéreuses, les thérapies ciblées visent à inhiber les processus à l'origine de la formation et de la prolifération cellulaire des cancers, par deux mécanismes : [48]

VIII.5.1.1. Agir sur les cellules tumorales pour bloquer leur prolifération

Certaines thérapies ciblées sont capables de s'attaquer précisément à ces perturbations. Leur action consiste à bloquer la transmission de certaines informations au sein des cellules qui les conduisent à se diviser et à proliférer de façon anarchique. Les thérapies ciblées peuvent agir à différents niveaux de la cellule : [49]

- sur les facteurs de croissance (qui sont des messagers déclenchant la transmission d'informations au sein d'une cellule).
- sur leurs récepteurs (qui permettent le transfert de l'information à l'intérieur de la cellule).
- sur des éléments à l'intérieur des cellules.

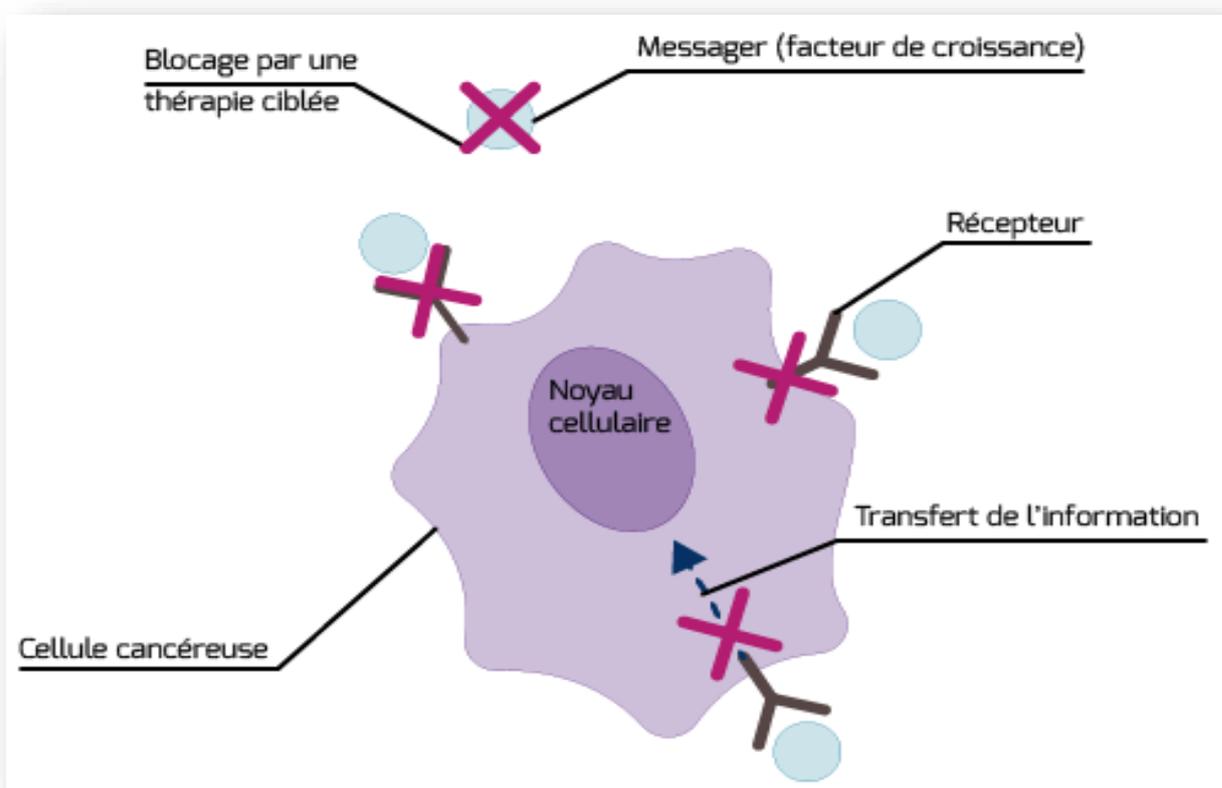


Fig. 5: Les différents niveaux de blocage des thérapies ciblées [49]

VIII.5.1.2. Empêcher la tumeur de fabriquer de nouveaux vaisseaux sanguins

Lorsqu'une tumeur atteint une certaine taille, le réseau sanguin déjà existant n'est plus suffisant pour l'alimenter en nutriments et en oxygène. La tumeur va alors mettre en place de nouveaux vaisseaux sanguins, qui diffèrent des vaisseaux normaux, pour s'assurer une bonne irrigation et permettre sa survie et sa croissance. Il s'agit de la néo-angiogenèse. Ces nouveaux vaisseaux peuvent également servir de porte d'entrée à la diffusion de métastases vers d'autres organes.

Des thérapies ciblées, appelées antiangiogéniques, ont donc été développées pour empêcher la tumeur de former de nouveaux vaisseaux sanguins et ainsi limiter son développement. [48]

VIII.5.2. Quelques exemples de thérapie ciblée

On cite:

VIII.5.2.1. Anti-angiogéniques

L'angiogenèse, c'est-à-dire le développement de nouveaux vaisseaux par prolifération et par ramification à partir de vaisseaux sanguins préexistants, est fortement impliquée dans la croissance et le processus métastatique des tumeurs malignes. Le principal régulateur des processus angiogéniques est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) pouvant se lier à trois types de récepteur : VEGF-R1, R2 et R3. C'est l'interaction du VEGF-A avec le VEGF-R2 exprimé à la surface des cellules endothéliales qui représente la principale cible des traitements anti-angiogéniques. Là encore, deux stratégies d'inhibition, extracellulaire ou intracellulaire, peuvent s'opposer aux effets induits par le VEGF.

VIII.5.2.2. Inhibiteurs d'EGFR

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF), appelé selon les nomenclatures EGFR, Erb-B1 ou HER, est un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué de façon majeure dans l'oncogenèse de nombreux types de cancers d'origine épithéliale (sein, côlon, poumon, otho-rhino-laryngologique, pancréas, glioblastome, etc.). En thérapeutique, deux cibles principales ont conduit au développement des anti-EGFR et des antiHER2 selon deux stratégies : inhibiteurs de kinase à action intracellulaire ou anticorps monoclonaux à action extracellulaire. [49]

Au final, les thérapies ciblées ont avantage, contrairement aux chimiothérapies standards, de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses sans agir sur les cellules saines, ce qui permet de diminuer les effets secondaires de façon importante. [50]

VIII.6. Hormonothérapie

Le traitement par hormonothérapie consiste à inhiber l'action ou la production d'hormones susceptibles de stimuler la croissance d'une tumeur. Il s'agit d'un traitement systémique, visant les tumeurs dites **hormonosensibles**, qui expriment des récepteurs hormonaux. [51]

Il existe 2 types d'hormonothérapies :

- **Hormonothérapie suppressive** : consiste à faire disparaître certaines hormones du corps du malade (par exemple l'ovariectomie ou l'irradiation ovarienne).
- **Hormonothérapie additive** : par l'utilisation des molécules présente une action compétitive sur les récepteurs cellulaires de l'hormone stimulant du cancer (annihiler leur effet).

L'aspect commun aux deux types de traitements est l'effet bloquant qui s'exerce sur la stimulation hormonale de la prolifération cancéreuse, dans l'adjonction comme la suppression. [52]

L'hormonothérapie est utilisée pour deux raisons principales.

- **Traiter le cancer.** L'hormonothérapie peut arrêter ou ralentir la croissance du cancer et réduire le risque qu'il réapparaisse.
- **Soulager les symptômes du cancer.** L'hormonothérapie peut être utilisée pour réduire ou prévenir les symptômes chez les hommes atteints d'un cancer de la prostate qui ne peuvent pas subir de chirurgie ou de radiothérapie. [53]

VIII.6.1. Indications d'une hormonothérapie

Dans la plupart des cas, l'hormonothérapie est prescrite en annexe de l'intervention chirurgicale et/ou de la radiothérapie, durant plusieurs années. Cette stratégie thérapeutique, dite hormonothérapie adjuvante, est indiquée pour les cancers infiltrants ou non métastatiques quand le risque de récurrence est présent. Dans d'autres cas, elle est prescrite avant la chirurgie pour diminuer la taille d'une tumeur afin de faciliter l'opération (cancer inflammatoire, désir d'une chirurgie conservatrice). Si le cancer est métastasé, il est question d'hormonothérapie

palliative : elle est utilisée en association à d'autres traitements afin de stabiliser l'évolution métastatique. [54]

VIII.6.2. Exemples

Les 3 cancers hormonaux dépendants : principalement les cancers du sein et de la prostate, mais également de l'endomètre. [55]

VIII.6.2.1. Cancer du sein

VIII.6.2.1.1. Les traitements à base de médicaments

Il existe trois types de médicaments, administrables en comprimés par voie orale ou sous forme liquide en injection intramusculaire ou sous-cutanée. On distingue :

- Les anti-œstrogènes qui empêchent les œstrogènes de stimuler les cellules cancéreuses en prenant leur place au niveau des récepteurs hormonaux des cellules ou en abîmant ces récepteurs. L'anti-œstrogènes utilisé pour le cancer du sein est le tamoxifène.
- Les anti-aromatases (ou inhibiteurs de l'aromatase) qui empêchent la fabrication des œstrogènes chez la femme ménopausée.
- Les analogues de la LH-RH qui suppriment la production des hormones féminines par les ovaires chez la femme non ménopausée.

VIII.6.2.1.2. LES TRAITEMENTS NON MÉDICAMENTEUX

Ils consistent à stopper la production d'œstrogènes par les ovaires, par chirurgie (ovariectomie) ou par irradiation des ovaires (radiothérapie). [56]

VIII.6.2.2. cancer de la prostate

Les types d'hormonothérapie les plus fréquemment utilisés dans le traitement du cancer de la prostate sont:

- Les Anti-androgènes :

Les anti-androgènes agissent en bloquant les effets de la testostérone sur vos cellules cancéreuses de la prostate. Le médicament se fixe aux récepteurs des androgènes situés sur les cellules cancéreuses de votre prostate et les empêche ainsi d'utiliser la testostérone présente dans votre circulation sanguine. On distingue : bicalutamide, flutamide, acétate de cyprotérone

- Les Œstrogènes :

Les œstrogènes sont des hormones femelles qui baissent le taux d'androgènes. Ils ne sont plus utilisés à cause des problèmes cardiovasculaires qu'ils provoquaient.

- L'Orchidectomie :

L'orchidectomie est une forme d'hormonothérapie qui consiste à enlever les testicules. Il s'agit d'un traitement radical puisque la concentration en testostérone peut baisser de 90 à 95%. Cette intervention est aussi connue comme une « castration chirurgicale ». Cette intervention se fait sous anesthésie régionale dans le cadre d'une chirurgie d'un jour. [57]

Chapitre II :
Généralités sur les Glucosides
cardiotoniques

Glucosides cardiotoniques : Digoxine et digitoxine

I. Définition et découvert

Les glycosides cardiaques ont joué un rôle important dans la thérapie de l'insuffisance cardiaque congestive depuis que William Withering a codifié leur utilisation dans sa monographie classique sur l'efficacité des feuilles de la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*) en 1785.1 Néanmoins, tout au long de ce siècle, une controverse a existé sur la question de savoir si les risques des préparations à base de digitaline l'emportent sur leurs avantages, en particulier chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque en rythme sinusal. [58] Les digitaliques sont des substances d'origine végétale, appartenant au groupe des tonicardiaques ou glycosides cardiaques. [59] Pour beaucoup, la digitale est une plante ornementale aux couleurs éclatantes mais dont la haute toxicité nécessite une mise en garde, le poison dépendant de la dose. La digitale produit des glucosides, une forme de sucres complexes, dont l'efficacité pour le cœur est connue de longue date en phytothérapie traditionnelle. La digoxine est par exemple un glycoside cardiotonique issu de la digitale laineuse (*digitalis lanata*) alors que la digitoxine provient de la digitale pourpre (*digitalis purpurea*).

Actuellement, ces plantes sont largement utilisées en partie ou entières comme médicaments mais les glycosides sont extraits de la plante puis purifiés. Ainsi, les différences de teneur en glycosides d'une plante à l'autre sont lissées. Le médecin peut en revanche prescrire la dose exacte de glycosides sous leur forme pure. Les propriétés des digitaliques peuvent en outre être chimiquement améliorées : l'absorption intestinale est alors meilleure que sous la forme d'origine. [60]

II. Caractéristiques chimiques

II.1. La structure chimique

Les cardiotoniques les plus utilisés sont les digitaliques ou glucosides cardiotoniques. Ils possèdent une structure chimique de base, constituée :

- **Partie génine ou aglycone** : c'est la fraction déférente ente eux, elle se constitue d'un cycle lactone insaturé et noyaux stéroïde, porteuse de l'activité pharmacologique.
- **Partie glucidique** : c'est la fraction commune entre eux, comportant un ou plusieurs oses en liaison ester en C3 β de la génine. [61]

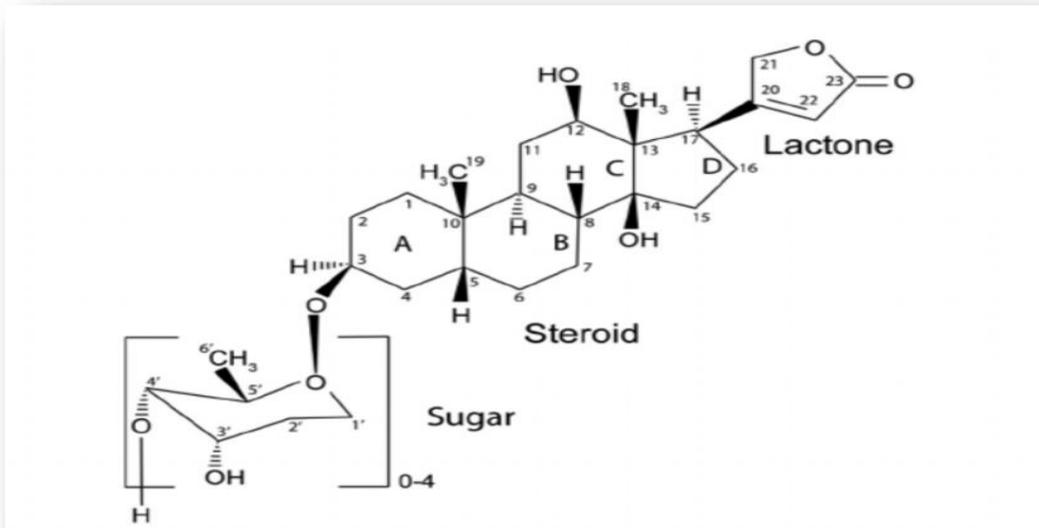


Fig.6 : Structure bidimensionnelle de la digoxigénine associée aux sucres D -digitoxose [62]

A partir de là, la différence structurelle entre la digitoxine et la digoxine n'est qu'un groupe hydroxyle (-OH) supplémentaire sur la digoxine (tableau 3), ce qui modifie considérablement la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ces substances. [62]

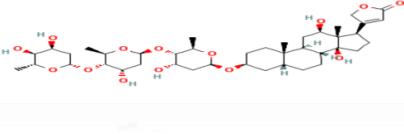
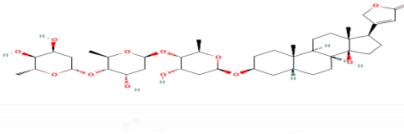
Tableau 3: la différence de la structure chimique entre la digoxine et digitoxine [63]

	Genine						Sucre
	R1	R5	R11	R12	R16	R19	R3
Digoxine	H	H	H	OH	H	H	α -L-Digitoxose(3)
Digitoxine	H	H	H	H	H	H	α -L-Digitoxose(3)

II.2. Propriétés physique et chimique

La digoxine et la digitoxine présentent de nombreux caractères physico-chimiques, dont certains sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : les différentes propriétés physico-chimiques de la digoxine et digitoxine [64], [65], [66]

	Digoxine	Digitoxine
Structure		
Formule moléculaire	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃
Masse moléculaire	780,9 g/mol	764,9 g/mol
Forme	cristaux	poudre ou folioles
Couleur	blancs	blanches
Odeur	Inodore	Inodore
Gout	amer	amer
solubilité	soluble dans l'acétate, l'alcool amylique, la pyridine peu soluble dans l'éther, l'éther de pétrole insoluble dans l'eau <1 g/100 L à 20 °C>	facilement soluble dans la pyridine légèrement soluble dans l'alcool dilué (50 %) et dans le chloroforme insoluble dans l'eau et dans l'éther
Point de fusion	au-delà de 230 °C	255,5 °C

III. Propriété pharmacocinétique

Même si la digitoxine n'est plus sur le marché, il semble intéressant de traiter également de cette molécule

III.1.L'absorption

- Après absorption, la digoxine va être résorbée au niveau de l'intestin grêle par un mécanisme de transport passif.
- L'absorption est incomplète et varie selon les sujets de 65 à 89%.

Chez le sujet âgé, on observe une augmentation du PH gastrique associée à une diminution de la sécrétion de trypsine ainsi qu'une réduction de la surface d'absorption intestinale.

Ces modifications, associées à une baisse du débit sanguin splanchnique de 45 à 60% ne modifient pas les quantités de digoxine absorbées mais ralentissent la vitesse de résorption, entraînant de la sorte, une augmentation du Tmax (temps nécessaire pour atteindre le pic de

concentration (plasmatique).

Après avoir été résorbée, la digoxine gagne la circulation générale en empruntant:

- Soit, le système porte veineux
- Soit, de façon moindre, la voie lymphatique

III.2. Diffusion plasmatique

La lipophilie modérée de la digoxine explique un taux de fixation aux protéines plasmatiques faible entre 20 et 30%. La protéine principalement responsable de ce transport est l'albumine. Chez le sujet âgé l'albumine a tendance à baisser.

L'hypoalbuminémie entraînera une augmentation du taux sanguin de la digoxine à condition qu'elle soit associée à une baisse de l'élimination.

III.3. Distribution

A l'état d'équilibre, la digoxine est distribuée dans tous les tissus. Mais les muscles squelettiques représentent un réservoir de stockage important. De plus, le myocarde est l'un des tissus cibles puisque le rapport concentration myocardique /concentration plasmatique est de 50/1. Cette distribution est déterminée par le volume apparent de distribution qui est défini comme étant le volume qu'occuperait la digoxine si elle était répartie de façon homogène dans tout l'organisme.

Ce volume apparent de distribution dépend des volumes physiologiques réels plasmatique et tissulaire, mais aussi, de la fraction libre du médicament dans le plasma et les tissus. La digoxine, ayant une forte affinité tissulaire, va chez le sujet adulte donner un volume de distribution (Vd) élevé 8 l/kg, soit pour un homme de 70 kg un volume de 560 l.

III.4. Métabolisation

Dès l'absorption de la digoxine, une métabolisation intestinale peut intervenir. Mais elle n'existe que chez certains sujets et demeure faible. La digoxine en fait subit une très faible métabolisation au niveau hépatique. Seule, 10% de la digoxine est modifiée, le reste sera éliminé en l'état au niveau rénal. Cette métabolisation hépatique va transformer la digoxine en digoxigénine, puis en épigoxigénine ou en dihydro-digoxigénine, qui subissent ensuite une glucuro- ou sulfoconjugaison. Chez le sujet âgé, se sont surtout les premières réactions de métabolisation (oxydation réduction, hydrolyse, décarboxylation) qui sont altérées, mais dans le cas de la digoxine, cette diminution a un faible retentissement. [67]

III.5. Elimination

La demi-vie de la digoxine est de 36 à 48 heures chez les patients ayant une fonction rénale normale et de 3,5 à 5 jours chez les patients anuriques. [68]

III.5.1. Rénale

La digoxine va être éliminée essentiellement par les reins. Cette élimination est estimée entre 60 et 80%. Elle se fait majoritairement par filtration glomérulaire et accessoirement par excrétion tubulaire.

La digoxine est éliminée par les reins sous sa forme initiale mais aussi 10% sous forme métabolisée (voire jusqu'à 35% pour certains sujets).

Chez le sujet âgé, les fonctions rénales sont altérées. En effet, la filtration glomérulaire passe de 120 à 60 ml/mn en moyenne, Cette diminution est due à une réduction moyenne de 35% du nombre des néphrons fonctionnels et à une baisse de 50% de la perfusion rénale. [69]

IV. Relation structure/activité

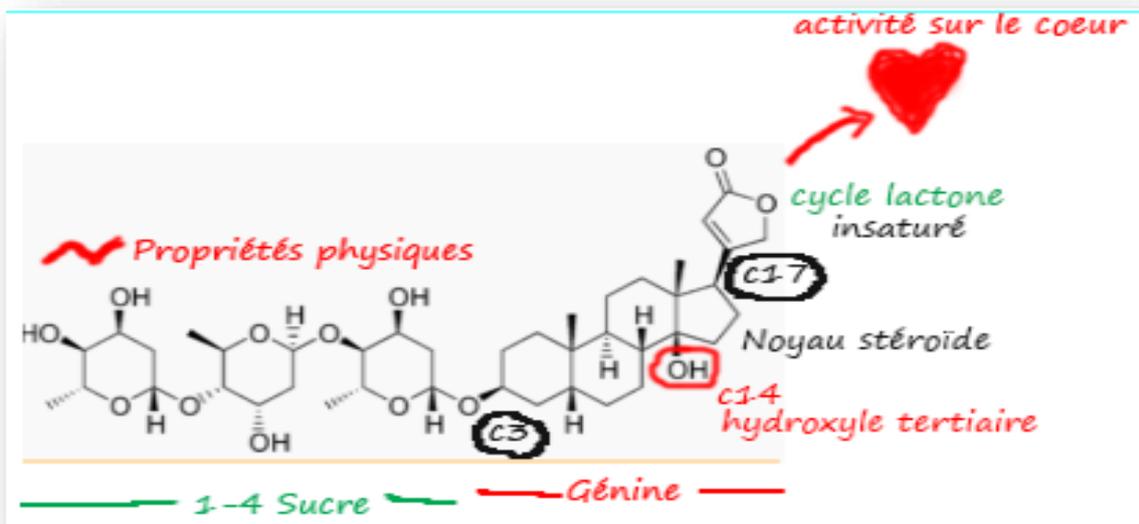


Fig. 7: Relation structure activité. [70]

La saturation du cycle lactone est responsable de la diminution de l'**activité** de la molécule et le raccourcissement de son **délai d'action**. Cependant l'ouverture complète du cycle entraîne une perte totale d'activité.

Le sucre lié à la génine en **C3** par son β -OH peut être composé d'**héxoses (D-glucose)**, ou bien de **désoxy-oses (L-rhamnose)**, les résidus glucidiques sont nécessaires à la solubilité de la génine ainsi son **activité cardiotonique**.

Quant à la présence d'un groupement **OH** dans la structure, son effet est le suivant:

Au niveau du **C12** augmente la polarité du glycoside : **digitoxine** : pas d'**OH** sur **C12** (molécule apolaire lipophile), **digoxine** : présence d'un OH supplémentaire (molécule plus polaire), **ouabaine** : présence de 3 OH (molécule très polaire). [70]

V. Mode d'action digoxine et digitoxine

La digoxine se lie spécifiquement à la Na,K-ATPase membranaire (pompe à sodium) et inhibe l'activité de cette enzyme.

V.1. Structure de la Na,K-ATPase

La Na, K-ATPase située dans la membrane plasmique utilise l'énergie obtenue à partir de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter trois ions Na^+ hors de la cellule contre deux ions K^+ (Fig. 8).

La Na,K-ATPase est une protéine oligomérique. La sous-unité catalytique α , composée de 10 segments transmembranaires, transporte les cations, hydrolyse l'ATP et est un récepteur pharmacologique des glycosides cardiaques. La sous-unité β , chaperon moléculaire, permet la bonne insertion membranaire de la sous-unité α lors de sa synthèse et module ses propriétés de transport. Quatre isoformes α et trois isoformes β dont l'expression est tissu spécifique, peut former 12 isoenzymes différentes avec des propriétés de transport et pharmacologiques différentes. [71]

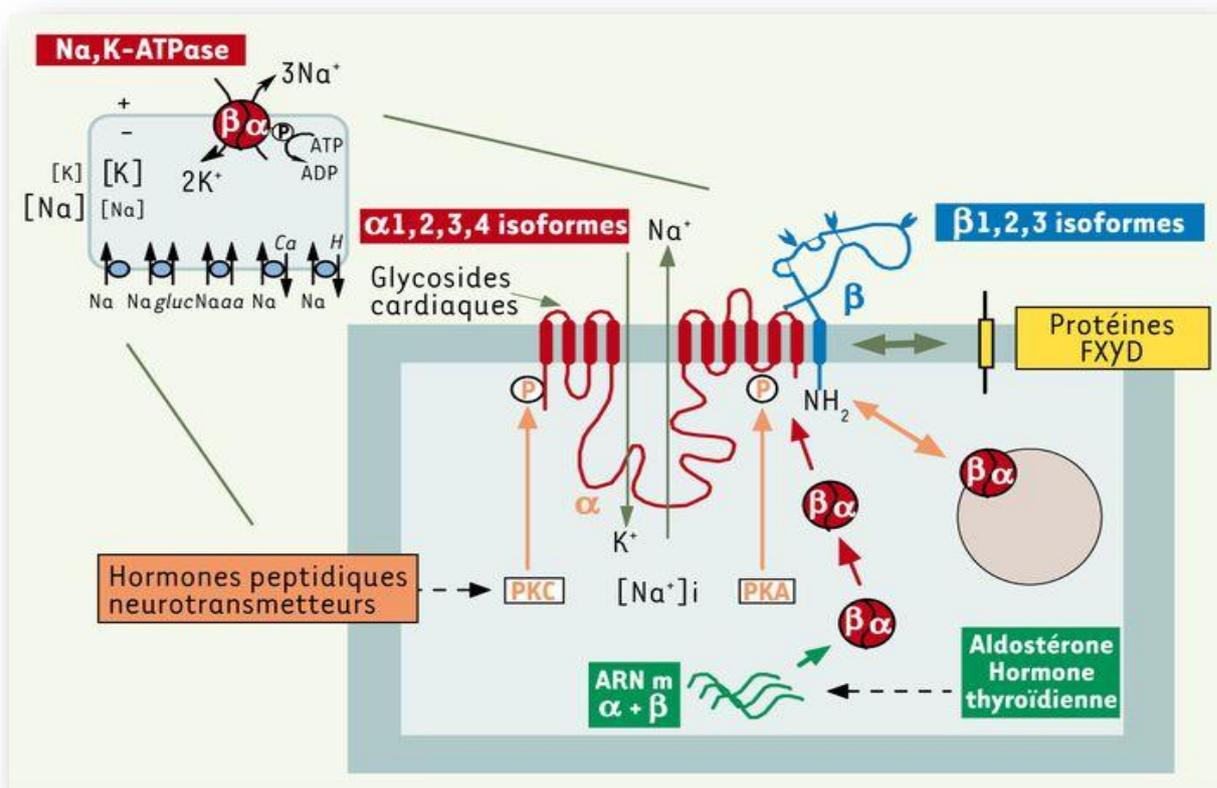


Fig. 8: Structure et régulation de la Na,K-ATPase. [71]

V.2. Sites et modes d'action

Les stéroïdes cardiotoniques se lient à la Na,K-ATPase du côté extracellulaire dans la voie d'échange d'ions suggérée comme révélée par la structure cristalline d'un complexe de liaison à haute affinité entre le stéroïde cardiotonique digoxine et la Na,K-ATPase purifiée à partir de reins de porc (fig. 9). [72]

La digoxine agit en inhibant la Na / KATPase membranaire, entraînant indirectement une augmentation du calcium intracellulaire (Une augmentation de la concentration intracellulaire de sodium entraîne l'échangeur Na⁺/Ca²⁺). L'augmentation de calcium libéré par les myocytes explique l'effet inotrope positif. L'effet antiarythmique de la digoxine résulte d'une action indirecte via le système nerveux autonome par une inhibition du tonus sympathique et

une augmentation du tonus vagal. Ce mécanisme engendre un ralentissement de la conduction atrioventriculaire et de la fréquence cardiaque. [74], [73]

Alors Les modifications ioniques induites par la digoxine conduisent donc à des :

-effets inotrope et bathmotrope positifs (augmentation de la force de contraction du myocarde et de l'excitabilité).

-effets dromotrope et chronotrope négatifs (ralentissement de la vitesse de conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire et baisse de la FC par ralentissement de la vitesse de dépolarisation automatique des cellules du nœud atrio-ventriculaire. [75]

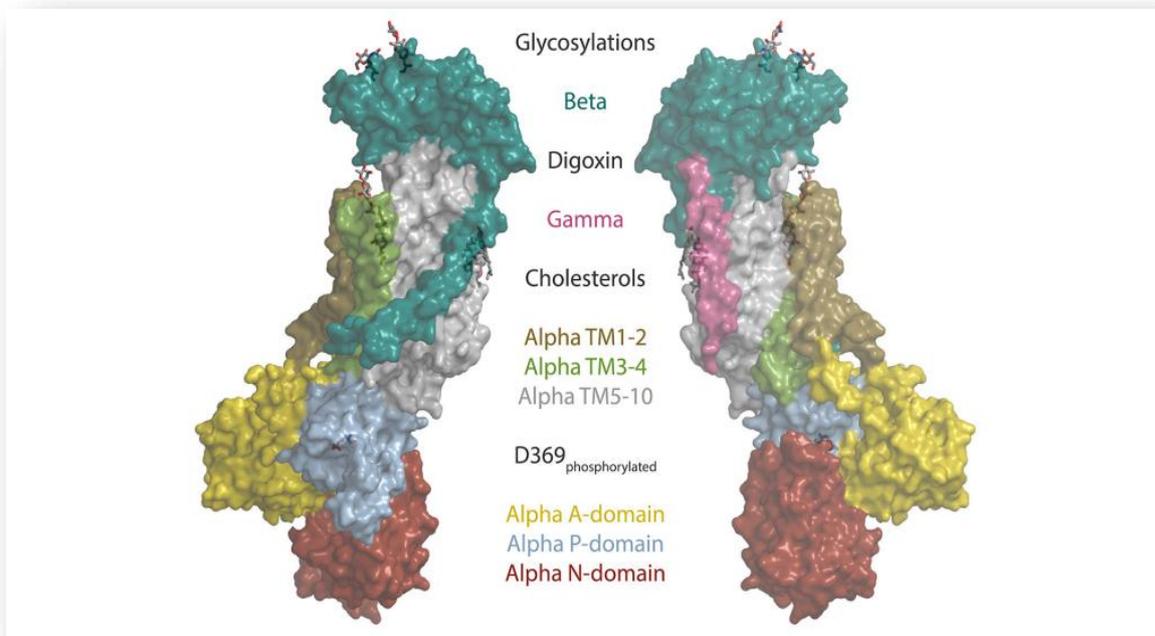


Fig. 9 : La structure de la pompe à sodium. [76]

VI. Plantes contenant digoxine et digitoxine

Les digitaliques utilisés en thérapeutique sont extraits de plantes à fleurs, et plus particulièrement des feuilles de la «Digitale laineuse » (digoxine) (Fig. 10) et de la « Digitale pourpre» (digitoxine) (Fig. 11)



Fig. 10 : Digitale laineuse [77]



Fig. 11: Digitalis purpurea L. [77]

VII. Indications

Les digitaliques sont donc considérés principalement comme des traitements antiarythmiques et font partie de la classe V de la classification de Vaughan-Williams. Leur utilisation thérapeutique est liée à leur capacité à contrôler le rythme cardiaque au repos (mais très peu à l'exercice) et à diminuer la conduction auriculo-ventriculaire. [78]

La digoxine est efficace pour améliorer les symptômes de d'insuffisance cardiaque (IC) parce que c'est un inotrope positif. Cela signifie que le cardioglycoside augmente la force des battements cardiaques en augmentant la contractilité des fibres musculaires. La digoxine est aussi utilisée pour traiter la fibrillation auriculaire (FA), l'arythmie cardiaque la plus fréquente qui affecte les oreillettes cardiaques avec un rythme trop élevé. Pour cette raison, la digoxine est employée pour son effet chronotrope négatif, c'est-à-dire qu'elle ralentit la fréquence des pulsations cardiaques.

Ces améliorations cliniques claires de la digoxine en ont fait un médicament très populaire pour le traitement de l'IC et de la FA. Toutefois certains rappelleront que cette mise en marché a été faite avant la mise en place des essais double randomisés contemporains.

Étant donné que l'action de la digoxine passe par un effet sur les ions potassium et calcium, certaines conditions de déséquilibres électrolytiques rendent la prescription de la digoxine peu recommandée. En effet, pour les patients en situation d'hypokaliémie et les patients en situation d'hypercalcémie, les cardioglycosides ne sont pas recommandés, car leur action sur les cardiomyocytes est altérée. [79]

VIII. Surdosage, intoxication, seuils toxicité

La concentration thérapeutique habituellement considérée comme acceptable est de 0,5 à 2 ng/mL (0,6 à 2,6 nmol/L), mais il est le plus souvent conseillé de « viser » une digoxinémie entre 0,5 et 1,2 ng/mL car la digoxine est un médicament à marge thérapeutique étroite. Chez les patients les plus à risque de surdosage, insuffisants rénaux et/ou âgés, il peut être recommandé de mesurer la digoxinémie 8 jours (5 demi vies) après l'initiation du traitement, puis une fois par année, de façon systématique. [80]

La dose de glycoside cardiaque nécessaire (digoxine ou digitoxine) dépend de l'indication clinique. Par exemple, le contrôle de la fréquence cardiaque aiguë nécessite une charge rapide avec des doses plus élevées par voie intraveineuse, alors que le contrôle des symptômes de

l'insuffisance cardiaque (IC) peut être obtenu avec des doses plus faibles et un temps plus long jusqu'à l'état d'équilibre par voie orale. [81]

Une intoxication digitalique se définit par une digoxinémie supérieure à 2 ng/mL (ou 2,6 nmol/L). [80]

L'intoxication digitalique est une intoxication médicamenteuse rare mais grave. Elle peut correspondre à deux situations bien distinctes :

- les intoxications aiguës accidentelles ou volontaires.
- les surdosages au cours d'un traitement chronique.

Dans ce dernier cas, qui est la situation la plus souvent rencontrée chez les patients âgés, l'intoxication survient avec des doses répétées de digoxine, chez un patient avec cardiopathie sous-jacente et souvent une insuffisance rénale. Un épisode de surdosage, toutes gravités confondues, surviendrait dans 6 à 23 % des traitements prolongés. En outre, la digoxinémie est corrélée au type et au degré d'intoxication : elle est beaucoup plus élevée dans les intoxications volontaires que dans les surdosages accidentels et elle est associée à une surmortalité pour des chiffres extrêmes (supérieure à 6 ng/mL). Cependant, elle n'a pas été identifiée comme un facteur de mauvais pronostic d'intoxication car la mortalité paraît plus liée à l'âge et à l'existence d'une cardiopathie. [80]

Symptômes

L'intoxication à la digitale touche environ 20 % des patients traités par digoxine. Le diagnostic n'est pas toujours aisé car les signes et symptômes sont souvent peu spécifiques et la mesure du taux de digoxine plasmatique n'est souvent pas corrélée au degré de toxicité clinique. [75]

- Les manifestations cardiaques de la toxicité sont la préoccupation principale des présentations aiguës et chroniques de la toxicité des glycosides cardiaques. Bien que toute dysrythmie soit possible, certaines aberrations sont fréquentes, telles que la tachycardie auriculaire paroxystique avec bloc de conduction, la tachycardie jonctionnelle et la tachycardie ventriculaire bidirectionnelle. Le décès dû à un surdosage en digoxine résulte généralement d'un collapsus cardiovasculaire [81], la visualisation de la « cupule digitalique » à l'ECG (fig. 12) est un signe d'imprégnation aux digitaliques et non d'intoxication. [75]

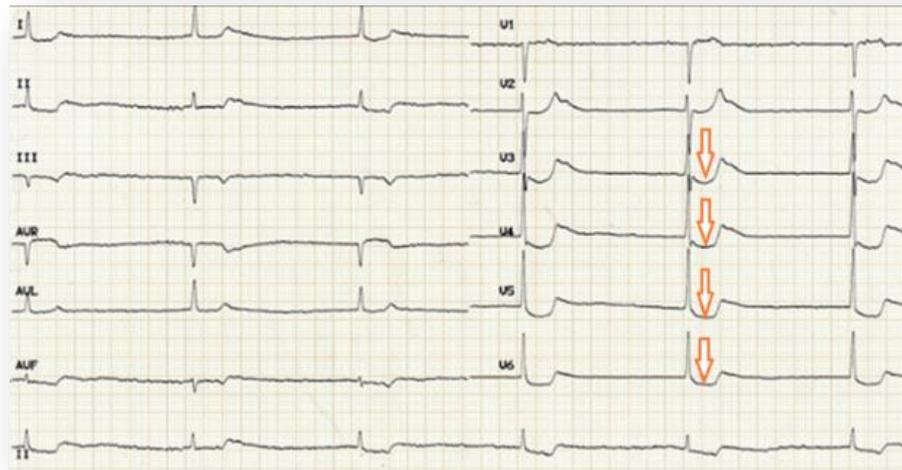


Fig. 12: Signe de la « cupule » digitalique

- Les symptômes neurologiques les plus fréquents sont des céphalées, vertiges, agitation, désorientation, hallucination ou plus rarement une modification de la vision colorée.

-L'inhibition de la Na/KATPase par la digoxine, entraînant une augmentation de la concentration de potassium extracellulaire, explique que l'hyperkaliémie soit un important marqueur d'intoxication aiguë et prédicteur de la mortalité [80]. D'autre part la digoxine peut potentiellement augmenter le gradient de la voie de sortie du ventricule gauche chez les patients atteints de cardiomyopathie hypertrophique, mais peut être utilisée en toute sécurité chez ceux qui ne présentent pas de phénotype obstructif. Les patients qui développent des manifestations cliniquement significatives d'empoisonnement à la digoxine (c.-à-d. arythmie menaçant le pronostic vital, dysfonctionnement d'un organe terminal ou hyperkaliémie) doivent être traités avec des fragments d'anticorps (Fab) spécifiques de la digoxine.

**Des taux sériques élevés n'améliorent pas l'efficacité et augmentent le risque de toxicité et d'intoxication. [82]

IX. Effet anticancéreux : digoxine et digitoxine

IX.1.Mécanisme d'action

IX.1.1. Digoxine

Le mécanisme anticancéreux de la digoxine n'a pas encore été entièrement élucidé.

L'inhibition de la Na⁺/K⁺-ATPase et de la topoisomérase, l'altération de la signalisation du Ca²⁺ ainsi que l'inhibition de la synthèse de HIF-1a ont été signalés comme jouant un rôle

dans les effets anticancéreux de la digoxine. Les voies de signalisation telles que Src/MAPK, Akt/mTOR, NFkB et Nrf2 sont également connues pour être impliquées. Fait remarquable, il a récemment été signalé que la digoxine inhibait la réparation des cassures double brin de l'ADN, ce qui constitue un nouveau mécanisme anticancéreux. [80]

Les voies de réparation des cassures double brin (DSB) et simple brin (SSB) de l'ADN font partie du réseau cellulaire de réparation des dommages à l'ADN (DDR), crucial pour maintenir la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Jusqu'à présent, l'inhibition médicamenteuse de la DDR a ouvert la voie à de nouvelles approches thérapeutiques en oncologie. Le premier médicament thérapeutique anticancéreux ciblant le DDR et approuvé par la FDA est l'olaparib, un inhibiteur des poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) pour le traitement des cancers présentant des mutations héréditaires BRCA1 ou 2 en induisant la létalité synthétique. Il existe actuellement divers inhibiteurs de la PARP, obtenus auprès de Technologie de signalisation cellulaire (Danvers, MA, États-Unis). Le 2', 7'-Dichloro fluorescein diacetate (DCFH-DA) a été acheté chez Sigma-Aldrich (Danvers, MA, USA). 3-(4, 5- diméthyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphényl-2-H-bromure de tétrazolium (MTT) provient d'Amresco (Solon, OH, USA). [80]

IX.1.2. Digitoxine

Pour comprendre ses mécanismes anticancéreux, les premières recherches se sont concentrées sur la capacité de la digitoxine à inhiber la pompe Na⁺/K⁺-ATPase à des concentrations comprises entre 0,5 et 5 µM. Cette inhibition peut entraîner une augmentation du calcium intracellulaire par le biais d'une activité accrue de la pompe Na⁺/Ca²⁺ et, par la suite induire l'apoptose des cellules cancéreuses. La (fig. 13A) montre comment l'inhibition de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase provoque une accumulation de sodium intracellulaire, et donc une perturbation de l'homéostasie ionique cellulaire. Pour que les cellules rétablissent l'homéostasie ionique, l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ doit être activé pour exporter l'excès de sodium dans l'espace extracellulaire tout en important du calcium, ce qui provoque une accumulation de calcium intracellulaire qui intervient dans des événements cellulaires tels que la contractilité du myocarde, le remodelage du cytosquelette et l'apoptose. Il est toutefois intéressant de noter que des études épidémiologiques ont montré que la digitoxine inhibe la viabilité des cellules cancéreuses à des concentrations nanomolaires (10-100 nM). Ceci Cela suggère que l'effet anticancéreux de la digitoxine repose sur un mécanisme différent de celui qui avait été initialement proposé. En 2003, Xie et al. ont suggéré que les caractéristiques de

signalisation de la Na⁺/K⁺-ATPase sont distinctes de l'activité de pompage. Il a été démontré que le signalosome de la Na⁺/K⁺-ATPase est un complexe de signalisation à protéines multiples composé de 3 sous-unités alpha (a) et de 2 sous-unités bêta (b) qui contrôle les activités cellulaires telles que l'apoptose, la prolifération cellulaire, la motilité cellulaire et les jonctions serrées. Par la suite, il a été proposé que la digitoxine, à des concentrations nanomolaires, active le signalosome de la Na⁺/K⁺-ATPase pour transmettre des signaux intracellulaires. La (figure 13B) résume les effets intracellulaires de la digitoxine lorsqu'elle se lie à la Na⁺/K⁺-ATPase à des concentrations comprises entre 10 et 100 nM. Lors de la liaison, la digitoxine module le complexe protéique Na⁺/K⁺-ATPase en activant les voies de signalisation associées en aval, c'est-à-dire l'activation de plusieurs cascades de signalisation telles que la signalisation par la phospholipase C (PLC), la signalisation par la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), la signalisation par la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) et la signalisation par la kinase Src.

Les cascades de signalisation qui sont stimulées lors de l'interaction de la digitoxine avec la Na⁺/K⁺-ATPase ont des fonctions mixtes. Par exemple, la signalisation MAPK est principalement une signalisation pro-proliférative et pro-survie qui peut également être complétée par une capacité de signalisation pro-apoptotique. La signalisation de la kinase Src est une tyrosine kinase non réceptrice qui présente des fonctions pro-survie et pro-apoptotiques. Par conséquent, la capacité de la digitoxine à affecter le signalosome Na⁺/K⁺-ATPase en aval est très complexe. Cette complexité, associée à l'étroite fenêtre thérapeutique de la digitoxine et à sa cardiotoxicité connue, a entraîné une lenteur dans le développement de la digitoxine comme thérapeutique anticancéreuse.[82]

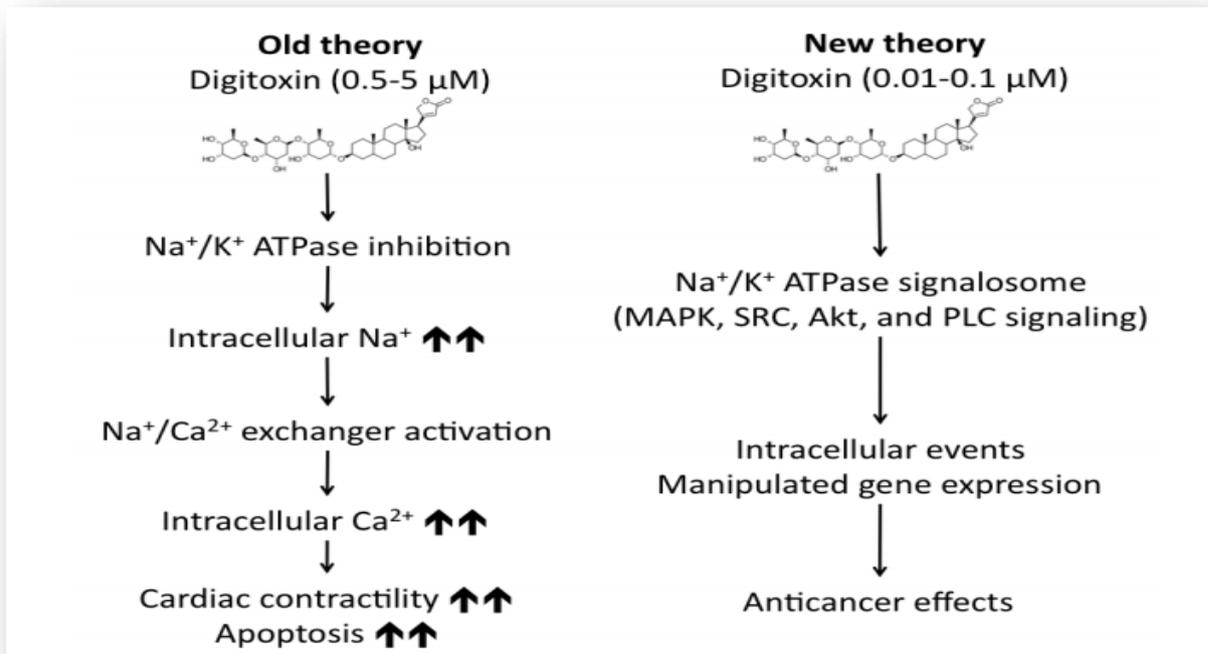


Fig. (13) : Effets de la digitoxine sur la Na⁺/K⁺-ATPase à des concentrations micromolaires et nanomolaires. (A) L'ancien modèle théorique résume l'effet de la digitoxine à des concentrations de 0,5 à 5 μM. (B) Le nouveau modèle théorique résume l'effet de la digitoxine à des concentrations de 0,01 à 0,1 μM. [82]

Chapitre III :
Les essais précliniques

I. Définition et historique

La découverte et le développement de médicaments subissent une pression énorme pour accélérer la production et la fourniture de thérapies nouvelles, sûres et efficaces aux patients, ce qui dépend de la collaboration entre l'industrie pharmaceutique, les collaborateurs universitaires, les organismes de recherche sous contrat, les fournisseurs de technologie et les organismes de réglementation. Ainsi, le domaine réinvente la découverte et le développement de médicaments en tirant parti de la transformation numérique avec les technologies émergentes. Les premiers efforts de recherche préclinique ont consisté à automatiser les observations du comportement animal avec des dispositifs analogiques dans les années 1980, puis à extraire des métriques à partir de vidéos au début des années 1990. Les systèmes automatisés sont depuis couramment utilisés pour quantifier le comportement des rongeurs dans une grande variété de paradigmes de test. [83]

Le stade préclinique du développement d'un médicament s'appelle également « phase 1 ». Il évalue l'activité et l'effet thérapeutique d'une substance sur des modèles animaux et/ou cellulaires en laboratoire, après la recherche fondamentale et avant les essais chez l'homme. Les données issues des essais précliniques (mécanisme d'action, toxicologie, métabolisme...) sont indispensables, d'un point de vue scientifique et réglementaire, à la poursuite du développement d'un médicament. En effet, elles permettent de poser les bases d'une utilisation sûre du candidat médicament lors des études effectuées chez l'homme. [84]

D'autre part, Le test préclinique est vital pour l'évaluation des profils de sécurité ainsi que pour l'efficacité potentielle des techniques thérapeutiques en développement. L'expérimentation animale est un des deux itinéraires généralement choisi dans l'étape préclinique ; tandis que l'autre itinéraire consiste à établir les tests sur les cellules humaines cultivées in vitro. Alors que les scientifiques devraient fournir une justification solide au choix du model animal dans la méthodologie in vitro afin d'assurer que les modèles animaux sont uniquement utilisés dans les cas extrêmes. Le sujet de l'éthique de l'utilisation des modèles animaux demeure très controversé.

Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études est effectué afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique et de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Elles répondent à des

normes internationales de qualité scientifique et sont étroitement évaluées par les autorités de santé au moment de délivrer l'AMM. [86]

L'étude préclinique a pour but de dresser une carte d'identité de la molécule. Le but ultime est d'évaluer l'efficacité et la toxicité sur l'animal des molécules d'intérêt avant son éventuelle administration à l'Homme. [87]

Enfin, une partie du développement préclinique, appelée évaluation du risque environnemental, a pour objectif de mesurer l'impact de la mise sur le marché d'un nouveau médicament pour l'environnement. [88]

II. Recherches précliniques

Il existe **deux formes** de recherche dans les tests pharmaceutiques : *in-vivo* et *in-vitro* (noms latins). *In-vivo* signifie « **dans le vivant** » et se produit sur un organisme vivant, tandis *qu'in-vitro* signifie « **dans du verre** » – le test a souvent lieu sur des cellules cultivées dans un récipient de test en verre. [89]

II.1. In vitro

Les essais in vitro proposés pour évaluer les paramètres d'absorption, de distribution et d'excrétion d'une nouvelle entité chimique (NCE) se basent sur des méthodes validées et scientifiquement admises par l'industrie pharmaceutique et la recherche académique.

- Il existe certain systèmes d'essais a mentionner :

- * Etude de l'absorption sur Cellules Caco-2 cultivées en monocouche
- * Essai de perméabilité sur des membranes artificielles en parallèle (PAMPA)
- * Liaison aux protéines plasmatiques
- * Stabilité plasmatique [90]

- Les cellules utilisent :

Les techniques de culture cellulaire sont essentielles dans le développement des produits de biotechnologie : parce que les tests de culture cellulaire sont souvent les plus rapides à mettre en place et parce qu'il existe de nombreux tests différents : prolifération, migration, viabilité, inflammation, apoptose.

Trois principaux types de cellules sont utilisés pour les tests *in vitro* :

- **lignées cellulaires immortalisées** (une cellule qui a échappé à la sénescence)
- **lignées cellulaires primaires** (dérivées directement d'un organisme, avec le moins de passages possible)
- **cellules pluripotentes induites** (cellules souches dédifférenciées issues de cultures).

Les tests *ex vivo*, c'est-à-dire effectués sur des échantillons de tissus directement issus de l'organisme, donnent une image plus proche de la réalité biologique.

Tous les tests développés dans le cadre d'un programme de R&D sont critiques car ils peuvent devenir des tests de référence qui seront utilisés pendant toute la durée du projet. Créer ou optimiser un test cellulaire peut être délicat, et il peut donc être intéressant d'externaliser une partie de son développement. [91]

II.2. In vivo chez les animaux

Pendant la phase préclinique, des modèles seront utilisés, optimisés ou développés pour comprendre le mécanisme d'action du médicament candidat. Les études *in vivo* sont utilisées pour comprendre l'effet du médicament principal sur les organismes vivants. Ces essais peuvent être très longs à optimiser et peuvent, dans certains cas, devenir la preuve ultime du concept nécessaire pour avancer dans le développement du médicament.

Les molécules peuvent être testées pour leur comportement pharmacocinétique et pharmacologique chez les petits animaux (ADME). Les optimisations peuvent être réalisées par modification chimique (petites molécules) ou par mutations pour les biomolécules.

Certains de ces tests sont réalisés en interne dans les entreprises de développement de médicaments, mais il est très courant que les tests *in vivo* et ADME soient confiés à des laboratoires disposant des capacités et des autorisations nécessaires pour réaliser ces tests. Il peut être difficile de trouver le bon laboratoire de service pour ces études. [92]

Par exemple : Les modèles des animaux utilisent :

Les modèles *in vivo* sont des animaux vivants (par opposition à l'expérimentation sur des organismes morts). Ils peuvent être des rongeurs, des chiens, des chats, des lapins, des cochons, des poissons ou d'autres animaux et sont spécialement élevés à cet effet. Les souris sont le modèle le plus couramment utilisé, l'une des raisons étant que leur constitution génétique est similaire à celle des humains. [89]

Par exemple :

1. Dans l'étude d'agents analgésiques les rongeurs (rats ou souris, lapins et cobayes) sont le modèle utilisé. [93]
2. les souris, les rats ou les cochons d'Inde sont des animaux souvent utilisés dans les laboratoires. Conformément aux objectifs ces études, ils seront normaux ou transgéniques. Le terme transgénique signifie que ces animaux sont génétiquement modifiés pour devenir plus sensibles à certaines pathologies, comme le cancer de la peau. [94]

III. Recherches anticancéreuses

Les recherche sur les cancers fait appel à plusieurs spécialités différentes : académiciens, cliniciens, épidémiologistes, mais aussi spécialistes des sciences humaines et sociales et de santé publique. Tous ces acteurs travaillent ensemble pour faire avancer les connaissances sur les cancers et les moyens de les prévenir, de les dépister et de les soigner.

La recherche met tout en œuvre pour agir contre le cancer, à tous les niveaux : prévention des facteurs de risque, dépistage et détection précoce, traitements, meilleure compréhension des mécanismes et de la biologie des tumeurs... Chaque jour, les chercheurs font émerger de nouvelles connaissances et de nouvelles pistes de lutte contre les cancers [95], par exemple il y a une branche appelée «recherche interventionnelle», développée depuis quelques années, se base sur ce qui existe déjà pour évaluer et améliorer les actions actuelles de lutte contre les cancers. Elle inclut à la fois les chercheurs et les acteurs de terrain (soignants, associations, politiques...). [95]

Ainsi, La recherche peut être dite fondamentale en cancérologie vise à comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués dans la naissance et la croissance des tumeurs. En décryptant le fonctionnement d'une cellule cancéreuse, en le comparant à celui d'une cellule normale, les chercheurs peuvent identifier des processus qui ont un rôle crucial dans le développement de la maladie. Ces clés sont autant de cibles contre lesquelles des médicaments peuvent ensuite être développés. [96]

Mais aujourd'hui, l'accent est mis sur les interactions entre la recherche fondamentale menée en laboratoire, la recherche clinique, au lit du patient, et la recherche en santé des populations, qui intègre des problématiques humaines, sociales et épidémiologiques. [97]

IV. Essais précliniques sur le cancer

IV.1. Généralité

Actuellement la plupart des substances potentiellement anticancéreuses sont sélectionnées sur des cellules cancéreuses *in vitro* avant d'être étudiées *in vivo* sur des modèles souris de ces mêmes cancers. Et il arrive que les résultats des essais *in vivo* ne correspondent pas à ceux des essais *in vitro*.

Les différences des milieux nutritifs dans lequel baignent les cellules cultivées *in vitro* ou se développant spontanément *in vivo* peuvent en être la cause.

Des chercheurs ont donc étudié en détail le microenvironnement qui baigne et nourrit les cellules cancéreuses chez la souris. Ils ont mesuré les concentrations de plus de 100 substances dans ce microenvironnement. Ils ont aussi étudié les variations liées au type de tumeur (cancer du poumon ou cancer du pancréas), à la localisation anatomique des tumeurs et à l'alimentation des animaux.

Ils ont constaté d'importantes différences entre les microenvironnements *in vivo* et les milieux de culture utilisés en laboratoire, ce qui crée un risque de résultats inexacts *in vitro*. [98]

Avant d'être testés sur des animaux ou des humains, la plupart des médicaments anticancéreux sont évalués dans des cellules tumorales cultivées dans une boîte de laboratoire. Cependant, ces dernières années, il y a eu une prise de conscience croissante que l'environnement dans lequel ces cellules sont cultivées n'imitent pas avec précision l'environnement naturel d'une tumeur, et que cette divergence pourrait produire des résultats inexacts. [99]

Actuellement, les études précliniques requises par les autorités réglementaires reposent principalement sur des cultures cellulaires bidimensionnelles (2D) et des modèles animaux, qui restent une des approches expérimentales pivots de la recherche translationnelle sur le cancer.

Dans les expériences *in vitro* **2D**, des cultures cellulaires sont exposées à des candidats-médicaments, généralement à des concentrations constantes pendant une période déterminée. L'objectif est de cribler et de classer un grand nombre de composés à tester, en évaluant s'ils ont un effet anticancéreux, généralement quantifié en mesurant la viabilité

cellulaire. D'autres paramètres, tels que l'engagement de la cible et les effets en aval, peuvent également être évalués dans le cadre de ces études pour fournir des informations sur la puissance et sur le mode d'action des candidats. Les composés qui présentent des profils d'efficacité prometteurs dans les systèmes *in vitro* 2D progressent vers des tests *in vivo* sur des modèles animaux.

Dans des expériences *in vivo*, les composés sélectionnés sont administrés à des modèles animaux pour étudier la pharmacocinétique (PK) et pour évaluer l'efficacité et la sécurité. Dans ce contexte, les xénogreffes ectopiques sont les modèles animaux les plus populaires. Il s'agit d'animaux immunodéprimés, généralement des souris ou des rats, auxquels des cellules cancéreuses humaines sont inoculées par voie sous-cutanée (sc) dans le flanc. Les animaux xénogreffés sont répartis en plusieurs bras recevant un placebo ou des anticancéreux selon différents protocoles d'administration. L'activité anticancéreuse est généralement évaluée en surveillant le volume tumoral au fil du temps et en calculant le retard de croissance tumorale et/ou l'inhibition de la croissance tumorale (TGI) comme mesures d'efficacité. Les composés étudiés sont classés en fonction de l'évaluation de l'efficacité, et la priorité est donnée aux agents présentant la plus grande activité antitumorale. [100]

Au lieu de rechercher des composés qui améliorent la sélectivité (*in vitro*) et le taux de survie (*in vivo*) des traitements pharmacologiques existants, les chercheurs recherchent généralement des composés qui ciblent les cellules malignes à de faibles concentrations et induisent une activité antitumorale dans des modèles animaux.

Exemple :

Wang et al ont examiné une bibliothèque de 359 484 composés et ont découvert que la bufaline, un glycoside cardiaque, était un puissant inhibiteur des coactivateurs des récepteurs stéroïdiens SRC-3 et SRC-1. Étant donné que la bufaline pourrait également inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein humaines à de très faibles concentrations et induire une activité antitumorale chez des souris transplantées avec des cellules cancéreuses du sein humaines, les auteurs ont discuté du fait que ce composé pourrait avoir un potentiel pour le traitement du cancer. De même, Denicolai et al a criblé une bibliothèque chimique de 1 120 composés et sélectionné le glycoside cardiaque proscillaridine A en fonction de sa capacité à cibler puissamment les lignées cellulaires de glioblastome (concentrations nanomolaires). La proscillaridine A a également induit une activité anticancéreuse chez des

souris xéno greffées avec des cellules cancéreuses humaines, et les auteurs ont suggéré que ce composé était un agent chimiothérapeutique prometteur. [101]

IV.2. Définitions des méthodes réalisées in vitro et vivo

IV.2.1. Méthodes de marquage de la prolifération cellulaire

Incubation des cellules vivantes en présence d'un précurseur marqué d'ADN, qui s'incorpore exclusivement lors de la réplication de l'ADN, soit en phase S (³H-thymidine (détekté in vitro par comptage à scintillation, ou in vivo par autoradiographie), Bromo-desoxy-uridine BrdU (détekté par immunocytochimie grâce à un anticorps spécifique anti-BrdU)). Ce type de marquage peut fournir diverses informations selon le protocole expérimental choisi, étant donné que le cycle cellulaire dure en moyenne 16 à 24 heures :

- Si le prélèvement par rapport à la fixation de l'échantillon a lieu quelques heures après la première administration du nucléotide marqué, le marquage obtenu est un index de l'activité mitotique instantanée.
- Si le prélèvement par rapport à la fixation de l'échantillon est effectué au moins un jour après une administration ponctuelle du nucléotide marqué, on peut suivre le devenir des cellules néoformées par division ; notamment in vivo, on peut voir si la prolifération est suivie de migration des cellules filles. Si on attend suffisamment longtemps (quelques semaines), on peut déterminer le phénotype dans lequel les cellules-filles se différencient, en combinant le marquage immunocytochimique BrdU avec le marquage immunocytochimique d'un marqueur phénotypique (double immunocytochimie). [102]

IV.2.2. Western blot

Le Western blotting ou immunoblotting est une méthode bien établie pour mesurer spécifiquement les quantités relatives de protéines individuelles dans des échantillons biologiques complexes [103]. Cette technique permet la séparation et l'identification d'une protéine d'intérêt spécifique dans un mélange complexe de protéines, la technique Western Blot est largement utilisée pour évaluer le niveau d'expression des protéines dans les cellules, ainsi que les variations de taille et d'autres propriétés.

Il existe plusieurs méthodes Western Blot selon l'anticorps secondaire utilisé. La détection de la protéine cible peut se faire par colorimétrie, chimioluminescence ou fluorescence. Par exemple, la chimioluminescence peut être détektée à l'aide d'un film radiographique ou d'un

équipement d'imagerie numérique, tandis qu'un anticorps secondaire fluorescent requiert un imageur de fluorescence. Chaque type de détection présente des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte lors de la sélection d'une méthode. [104]

- Comment ça marche

Les protéines d'un échantillon sont séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire

Un anticorps spécifique est ensuite utilisé pour détecter la protéine d'intérêt. Le résultat permet de déterminer le poids moléculaire et la quantité relative de la protéine. [105]

IV.2.3. RT-PCR en temps réel.

La RT-PCR en temps réel est une technique dérivée du nucléaire qui permet de détecter la présence de matériel génétique propre à un agent pathogène, notamment un virus. Initialement, le matériel génétique cible était détecté au moyen de marqueurs isotopiques radioactifs, mais la méthode a ensuite été perfectionnée et d'autres types de marqueurs, le plus souvent des colorants fluorescents, remplacent aujourd'hui les isotopes. Avec cette technique, les scientifiques peuvent visualiser les résultats de façon presque immédiate, avant que le processus soit terminé, tandis que la RT-PCR classique ne livre ses résultats que tout à la fin. [106]

La procédure habituelle nécessite deux étapes successives : l'amplification d'un fragment d'acide nucléique d'intérêt et l'analyse du produit d'amplification par différentes méthodes dont l'électrophorèse, l'hybridation ou le séquençage du produit amplifié... Ces techniques présentent l'avantage de pouvoir estimer la taille des produits d'amplification, par contre, elles ne permettent pas de détecter des variations nucléotidiques ponctuelles (à l'exception du séquençage). [107]

IV.2.4. FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

La technologie FACS sépare les cellules en fonction des marqueurs de surface cellulaire. Les ligands antigéniques, tels que les protéines et les glucides, confèrent à chaque cellule un phénotype de surface unique, et des anticorps spécifiques associés aux antigènes de surface cellulaire sont ensuite utilisés pour cibler les cellules avec ces antigènes.

Faisons une plongée en profondeur :

- Un anticorps apparié avec un antigène à la surface de la cellule ciblée est marqué avec une molécule fluorescente et mélangé dans l'échantillon cellulaire.
- Une à une, les cellules sont passées en flux continu à travers un faisceau laser.
- Chaque cellule diffuse une partie de la lumière laser et les cellules marquées avec l'anticorps d'identification émettent une lumière fluorescente.
- Les cellules sont déposées dans des conteneurs en fonction de leur fluorescence ou de leur motif de diffusion de lumière spécifique.

Les cellules peuvent être séparées par fluorescence ou par lumière diffusée, soit une diffusion vers l'avant (parallèle) qui indique la taille des cellules, soit une diffusion latérale (perpendiculaire) qui indique la granularité.

IV.2.5. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode d'analyse qui permet, à grande vitesse (i.e., plusieurs milliers d'événements par seconde), de caractériser et compter des cellules (ou des particules) en suspension dans un flux liquidien. L'interaction de ces éléments avec la lumière émise par une ou plusieurs sources lumineuses (lasers en général) permet de caractériser les cellules selon différents critères tels que la taille ou la granularité, détectés grâce à la diffusion de la lumière, ou l'expression de molécules de surface (souvent nommées CD pour cluster of differentiation) généralement révélées par un composé fluorescent couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre le CD d'intérêt. [108]

Un cytomètre de flux se compose de trois systèmes principaux : la fluïdique, l'optique et l'électronique.

- Le système fluïdique transporte les particules dans un flux vers le faisceau laser pour d'interrogation.
- Le système optique se compose de lasers qui éclairent les particules dans le flux d'échantillons et de filtres optiques qui dirigent les signaux lumineux résultants vers le cytomètre de flux.
- Le système électronique convertit les signaux lumineux détectés en signaux électroniques qui peuvent être traités par l'ordinateur. Pour certains instruments équipés d'une fonction de de tri, le système électronique est également capable de déclencher des décisions de tri pour charger et dévier les particules. [109]

IV.2.6. Immuno HistoChemistry (IHC)

IV.2.6.1. Définition

L'immunohistochimie est une technique d'identification simple, basée sur la reconnaissance d'un antigène dans un tissu à l'aide d'un anticorps, monoclonal ou polyclonal (Figure 1). Une fois le complexe antigène-anticorps formé, on ajoute un anticorps secondaire. L'anticorps secondaire peut-être couplé à une enzyme telle que la phosphatase alcaline ou la peroxydase du raifort (Horseradish Peroxydase, HRP) ou couplé à la biotine pour permettre une amplification du signal. Dans le cas où une amplification du signal est requise, il faut effectuer une autre étape où on ajoute de la streptavidine directement conjuguée aux enzymes déjà mentionnées. La streptavidine est une protéine qui se lie avec beaucoup d'affinité à la biotine. La dernière étape consiste à ajouter un substrat chromogène. Les substrats chromogènes sont des molécules qui vont être oxydées par les enzymes et produire un précipité coloré sur le lieu de la réaction. [110]

IV.2.6.2. Principe

Le principe de base de l'immunohistochimie est en fait très simple. Son but est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques (par exemple, filaments intermédiaires), nucléaires (par exemple, récepteurs hormonaux) ou membranaires (par exemple cerbB2), spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, à l'aide d'anticorps dirigés contre cette protéine aux propriétés antigènes. Les anticorps spécifiques utilisés en immunohistochimie sont obtenus de deux façons différentes : 1- Immuniser un animal (souris, lapin, cobaye) en lui injectant l'antigène donné et recueillir ensuite son sérum pour le purifier et isoler ensuite un anticorps polyclonal, 2- Immuniser un animal (souris), recueillir ses lymphocytes, mettre ceux-ci en culture, et après purification du surnageant de la culture, obtenir un anticorps monoclonal. [111]

IV.2.6.3. Intérêt

L'intérêt est multiple, on distingue :

- Diagnostique en facilitant l'identification et la classification des tumeurs indifférenciées grâce à des marqueurs de différenciation épithéliale (kératines, cytokératines, EMA), musculaire (actine, desmine, caldesmone, myogénine), vasculaire (CD34, CD31), lymphocytaire (CD45, CD3, CD20, CD79A),

neuroendocrinienne (CD56, chromogranine, synaptophysine) et nerveuse (S100, GFAP).

- Orientation vers une étiologie ou un point de départ de la tumeur dans le cadre de métastase, d'une porte d'entrée méconnue et dans le cadre d'un diagnostic différentiel large en cas de tumeur peu différenciée ou indifférenciée (TTF1 pour certaines tumeurs pulmonaires, thyroïdienne).
- Thérapeutique ou oncogène comme les récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone) et Her-2.

L'immunohistochimie est actuellement indispensable pour diverses classifications histologiques des tumeurs incluant des données de biologie moléculaire sur des profils génétiques de prédiction pronostique. [112]

Exemple

-L'IHC, ou ImmunoHistoChemistry, est un processus de coloration spécial effectué sur des tissus de cancer du sein frais ou congelés prélevés lors d'une biopsie. L'IHC est utilisée pour montrer si les cellules cancéreuses ont ou non des récepteurs HER2 et/ou des récepteurs hormonaux à leur surface. Cette information joue un rôle essentiel dans la planification du traitement.

- IHC pour le test HER2 :

L'IHC est le test le plus couramment utilisé pour déterminer si une tumeur contient trop de protéine réceptrice HER2 à la surface des cellules cancéreuses. Avec trop de récepteurs HER2, les cellules reçoivent trop de signaux leur disant de se développer et de se diviser. Le test IHC donne un score de 0 à 3+ qui mesure la quantité de protéine réceptrice HER2 à la surface des cellules dans un échantillon de tissu de cancer du sein. Si le score est de 0 à 1+, cela s'appelle HER2 négatif. Si le score est de 2+, cela s'appelle borderline. Un score de 3+ est dit HER2 positif. [113]

- Immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode qui permet de détecter des protéines ou d'autres antigènes dans des sections de tissu. À cet effet, les sections sont exposées à des anticorps marqués dirigés contre des épitopes de la protéine cible. Il est alors possible de visualiser une cible à l'aide d'un marqueur, par exemple, d'un colorant fluorescent, d'une enzyme, d'un traceur radioactif ou d'or colloïdal.

L'application des anticorps peut se faire de deux manières distinctes : par méthode directe, c'est-à-dire en liant un anticorps conjugué à un marqueur à sa substance cible, ou par méthode indirecte, en incubant l'anticorps primaire dans la substance cible, puis en liant un anticorps secondaire marqué à l'anticorps primaire. [114]

IV.2.7. Monodansylcadaverine (MDC)

monodansylcadavérine, est un composé autofluorescent dû au résidu dansyl conjugué à la cadavérine, s'accumule dans les vacuoles autophagiques acides. La concentration de MDC dans les vacuoles autophagiques est la conséquence d'un mécanisme de piégeage des ions et d'une interaction avec les lipides dans les vacuoles autophagiques (les vacuoles autophagiques sont riches en lipides membranaires). Les vacuoles marquées au MDC peuvent être isolées par fractionnement subcellulaire en vue d'une analyse biochimique.

L'utilisation de la coloration MDC est une approche rapide et pratique pour évaluer l'autophagie, comme le montrent les cellules en culture. Il a été démontré que le monodansylpentane (MDH), où un groupe neutre remplace un groupe aminé primaire, s'accumule dans les vacuoles autophagiques, y compris les auto-phagosomes naissants, indépendamment d'un mécanisme de piégeage des ions, et ce composé montre toujours une préférence pour les lipides membranaires des vacuoles autophagiques. [115]

V. Intérêt

Les études précliniques sont importantes car elles représentent la première étape du développement d'un nouveau composé thérapeutique. Elles fournissent des informations importantes sur le mécanisme d'action, l'activité anti-tumorale, la pharmacologie et la toxicologie qui peuvent guider le développement clinique ultérieur.

Deux catégories de preuves précliniques soutiennent généralement le développement clinique. La première catégorie comprend la toxicologie et la pharmacocinétique. Elles visent à anticiper les problèmes de sécurité et les doses essais. La deuxième catégorie est celle des "études d'efficacité". [116]

Voici quelques-uns des principaux intérêts des essais précliniques :

- **Étude de la toxicité**

Les objectifs principaux d'une évaluation de la sécurité au stade préclinique sont :

1. la détermination d'une dose sûre initiale et celle des doses progressivement plus élevées chez les humains;
2. l'identification des organes cibles pour lesquels le produit pourrait être toxique et la détermination de la réversibilité possible de cette toxicité
3. le choix des paramètres de sécurité à surveiller sur le plan clinique. L'adhésion aux principes présentés dans le présent document devrait améliorer la qualité et l'uniformité des données sur la sécurité au stade préclinique qui sont nécessaires pour appuyer le développement de produits biopharmaceutiques.[117]

- **Évaluation de l'efficacité**

Quel que soit le médicament que l'on désire sélectionner, un analgésique, un antibiotique etc., il est nécessaire :

1. de déterminer d'une manière approfondie sa propriété principale
2. de préciser par une étude systématique tout autre effet concomitant éventuel sur les autres appareils : cardio-vasculaire, respiratoire, rénal, etc. Ceci explique qu'une exploration systématique de tous les effets possibles d'un médicament soit nécessaire.

Ces études, qu'il n'est pas possible de citer ici, se font sur l'animal entier, sur des organes isolés, des cellules isolées, des fractions cellulaires isolées, enzymes, récepteurs. Elles précisent les propriétés et les mécanismes d'action des médicaments.

Généralement, des études de pharmacocinétique sont menées parallèlement aux précédentes pour déceler notamment les principaux métabolites du produit étudié. [118]

alors, Les essais précliniques sur les anticancéreux jouent un rôle crucial dans le développement de nouveaux traitements contre le cancer. Ils sont réalisés avant les essais cliniques sur les humains et visent à évaluer l'efficacité et la sécurité potentielle d'un médicament anticancéreux.

Partie
pratique

Etude bibliographiques comparatif

I. Problématique et objectifs

Notre travail vise à comparer, évaluer et discuter des articles scientifiques liés aux études de la molécule de digoxine en tant qu'agent anticancéreux afin d'analyser deux théories sur les factures HIF1A et PI3K.

Pour atteindre nos objectifs ; nous devons examiner un piont essenceil suivant :

Quelles sont les méthodes précliniques in vivo et vitro pour évaluer les activités de substance digoxine contre les tumeurs. Est-ce que la digoxine sera-t-elle adoptée comme médicament à l'avenir.

II. Partie 01 : Inhibition de hif-1 α par la digoxine

Les articles 1 et 2 et 3 sont des études sur l'inhibition de l'expression de la protéine HIF-1 α , le premier concerne les cellules lymphoïdes P493-Myc et prostatiques PC3, tandis que le deuxième traite les cellules A594 (les cellules non-petites du cancer du poumon), et le troisième s'intéresse aux cellules prostatiques C4-2.

II.1. Matériel

Tableau 5: tableau illustre des informations des articles 1,2 et 3

Numero d'article	Titre	Auteurs	Date de la publication	Université Laboratoire	Pays
① Article 01	Digoxine and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth	Huafeng Zhanga,b, David Z. Qiana,b, Yee Sun Tana, KangAe Leea, Ping Gaod, Yunzhao R. Rene, Sergio Reya, Hans Hammersb, Daniel Changa, Roberto Pilib, Chi V. Dangb,d, Jun O. Liue, and	September 30, 2008	Institute for Cell Engineering, - Department of Oncology, -McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, - Department of Medicine, -Department of	Baltimore usa

		Gregg L. Semenza		Pharmacology - Department of Pediatrics, and Department of Radiation Oncology, - The Johns Hopkins University School of Medicine,		
2	Article 02	Digoxin Downregulates NDRG1 and VEGF through the Inhibition of HIF-1 α under Hypoxic Conditions in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells	Dong Wei , Jing-Jing Peng , Hui Gao, Hua Li, Dong Li, Yong Tan and Tao Zhang	2 April 2013	Oncology Medicine Centre, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Command	chengduChina
3	Article 03	Digoxin Inhibits Blood Vessel Density and HIF-1 Expression in Castration-Resistant C4-2 Xenograft Prostate Tumors	Bishoy A. Gayed , M.D. Katherine J. O'Malley 1 , Jan Pilch , M.D. , and Zhou Wang , Ph.D.	23 February 2012	-Department of Urology, Department of Pharmacology, Chemical Biology, - University of Pittsburgh Cancer Institute, -University of Pittsburgh School of Medicine,	Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

II.2. Méthode

La comparaison entre les articles 1, 2 et 3

II.2.1. Choix du matériel

En comparant les matériels utilisés, on a trouvé qu'ils ont été presque identiques dans les trois expériences ayant lieu in vivo et vitro

Tableau 6: Comparaison entre les matériels

	Article 01	Article 02	Article 03
Milieu de culture	Les cellules humaines Hep3B, Hep3B-c1, 293 et 293T ont été cultivées dans du milieu essentiel modifié de Dulbecco (DMEM). PC3, PC3-EV, PC3-CA5 (29) P493-Myc et P493-Myc-Luc ont été cultivées dans du RPMI-1640. Les milieux ont été supplémentés avec 10% de FBS et 1% de pénicilline-streptomycine.	Les cellules A549 ont été cultivées dans du RPMI 1640 additionné de pénicilline (100 UI/mL), de streptomycine (100 mg/mL) et 10 % de sérum bovin fœtal inactivé à la chaleur dans une atmosphère humidifiée à 95 % d'air et 5 % de CO ₂ à 37 °C. Les cellules A549 ont ensuite été placées à une densité de 5×10 ³ par puits dans une plaque à 96 puits. Le traitement par hypoxie a été effectué en plaçant les cellules dans un incubateur à double enveloppe de CO ₂ (Heracell 150i ; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) avec un mélange de 1% d'O ₂ , 5% de CO ₂ et 94% de N ₂ . Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de digoxine (0,01, 0,1 et 1 µM) dans 0,5 % de DMSO. Les protéines et l'ARNm ont été extraits des cellules. protéines et	Des souris mâles athymiques nu/nu âgées de quatre à six semaines ont été achetées à Harlan Labs (Indianapolis, États-Unis). Les expériences ont été réalisées avec l'approbation d'un protocole approuvé par un comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux. Lignes directrices pour l'utilisation correcte et sans cruauté des animaux dans la recherche ont été suivies. Les souris ont été laissées en position assise 1 semaine après leur arrivée et l'injection sous-cutanée de 1×10 ⁶ cellules C4-2 dans un rapport de 1:1 dans du matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Les tumeurs ont pu s'établir et croître jusqu'à un diamètre de 7 mm. Les souris ont été castrées et gardées pendant 10 jours

		<p>l'ARNm ont été extraits des cellules à des moments précis (0, 24, 48 et 72 h), et la prolifération cellulaire a été mesurée par le test MTT. La prolifération cellulaire a été mesurée par le test MTT. Viabilité cellulaire (%) = $(OD_{\text{échantillon}} / OD_{\text{normoxie 0h}}) \times 100$ (%).</p>	<p>avant l'injection de digoxine. les tumeurs ont été mesurées trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse afin de calculer le volume de la tumeur (diamètre le plus grand \times le plus petit diamètre)¹⁶. Après 10 jours, les souris ont reçu des injections i.p. quotidiennes de digoxine (2 mg/kg ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) pendant 7 jours consécutifs. Les souris ont été laissées au repos pendant 2 jours, après elles ont été sacrifiées par euthanasie au CO₂. Le tissu tumoral a été prélevé en trois parties, dont deux ont été congelées dans l'azote liquide pour l'analyse de l'ARN et du Western Blot. Un tiers du tissu tumoral a été fixé dans du formol à 10 % pour l'histologie.</p>
<p>RT-PCR</p>	<p>Quantitative : L'ARN total a été isolé à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen) suivi d'un traitement à la DNase (Ambion) conformément aux instructions des fabricants. Un microgramme d'ARN total a été utilisé pour la synthèse d'ADNc premier brin à l'aide du système iScript cDNA Synthesis (BioRad Laboratories). Les échantillons d'ADNc ont été dilués au 1:10 et la PCR en temps réel a été réalisée à l'aide</p>	<p>L'ARN total a été isolé à partir des cellules A549 avec le réactif Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). La PCR a été réalisée avec un thermocycleur d'ADN dans un volume de réaction de 50-μL, contenant 5 μL de tampon Taq 10\times, 4 μL de dNTP 2,5 mM, 4 μL de MgCl₂ 25 mM, 2 μL de chacune des amorces avant et</p>	<p>Le tissu tumoral a été prélevé et congelé dans du LN 2 pour éviter la dégradation de l'ARN. Le tissu a été homogénéisé sur de la glace et isolé à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La qualité de l'ARN a été confirmée sur un gel d'agarose. La transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Cells</p>

<p>du supermix iQ SYBR Green et du système de détection PCR en temps réel iCycler (BioRad). Les amorces pour les ARNm GLUT1, HK1, HK2, VEGF, sous-unité Na/K ATPase 1, topoisomérase I et topoisomérase II (tableau S1) ont été conçues à l'aide du logiciel Beacon Designer (BioRad) et la température de recuit a été optimisée par PCR en gradient. Le changement de pli dans l'expression de chaque ARNm cible par rapport à l'ARNr 18S a été calculé sur la base du cycle seuil (Ct) comme $2^{-D(DCt)}$, où $DCt = Ct \text{ "cible"} - Ct \text{ "18S"}$ et $D(DCt) = Ct \text{ "traitement"} - Ct \text{ "contrôle"}$</p>	<p>arrière, 0,5 µL de Taq polymérase et 2 µL de matrice d'ADNc, pendant 35 cycles en utilisant un système GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis). Les séquences d'amorces étaient les suivantes : β-actine (en avant) 5'-CTCCATCCTGCTCGCTGT-3' et (en arrière) 5'-GCTGTACCTACCGTCC-3' ; VEGF, (en avant) 5'-TGCCCGCTGCTGTCTAAT-3' et (en arrière) 5'-TCTCCGCTGAGCAAGG-3' ; NDRG1, (forward) 5'-AGGCAGGTGACAGCAGGGAC-3' et (reverse) 5'-CGTGGCACGGCAAAAGT-3' ; HIF-1α, (forward) 5'-GCACAGGCCACATTCACG-3' et (reverse) 5'-TGAAGATTCAACCGGTTTAAGGA-3'. Le gène de maintien de la β-actine a été utilisé comme contrôle interne.</p>	<p>Direct Superscript III (Invitrogen) et la PCR quantitative sous-séquentielle a été réalisée à partir d'échantillons regroupés à l'aide du SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen). Les amorces pour HIF-1, GAPDH et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3 (Primer3, Totowa, NJ, USA) et étaient les suivantes : HIF-1 en avant 5'-CCAGTTACGTTCTCGATCAGT-3', HIF-1 en arrière 5'-TTTGAGGACTTGCGCTTTCA-3', GAPDH en avant 5'-5ATGTTTCGATGGGTGTGA-3', GAPDH en arrière 5'-GGTGCTAAGCAGTTGTGGT-3', VEGF en avant 5'-CCTTGCTACCTCCACATGATTCTGCCCTCCTT-3'. Les amorces ont été optimisées dans des fourchettes appropriées pour l'efficacité et le coefficient de corrélation à l'aide d'une courbe standard sur le thermocycleur ABI Step-One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis) et ont</p>
--	---	---

			été testées pour s'assurer que l'ADN génomique n'était pas présent. pour s'assurer que l'ADN génomique n'a pas été amplifié. Les données sont indiquées en tant qu'expression relative par rapport à la GAPDH normale. expression relative par rapport à la GAPDH, normalisée par rapport aux souris traitées par le véhicule, à l'aide de la méthode delta-delta Ct. à l'aide de la méthode delta-delta Ct.
Immunoblot	Les protéines extraites des cellules avec le tampon RIPA ont été fractionnées par SDS/PAGE à 10%. Des anticorps contre HIF-1 (16), HIF-2 (Novus Biologicals), FLAG (Sigma-Aldrich), phospho-RPS6 et RPS6 total (Cell Signaling Technology) ont été utilisés pour les tests d'immunoblot. Les blots ont été décapés et re-probés avec un anticorps polyclonal β -actine (Santa Cruz Biotechnology) pour confirmer une charge protéique égale.		
Western Blot		La teneur en protéines a été mesurée par Western blotting. Les cellules A549 ont été lavées deux fois avec du PBS froid. Les cellules ont ensuite été lysées avec un tampon d'échantillonnage SDS contenant 50 mM de Tris (pH 7,4), 2 % de SDS	Le tissu tumoral a été lysé dans un tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay) contenant 10 mM NaPO ₄ 4,5. (RIPA) contenant 10 mM de Na ₃ PO ₄ , 1% de Triton-X 100, 1 mM

		<p>(w/v, 5 % de 2 d'acide mercaptoéthanol et 10 % éthylènediaminetétraacétique de glycérol. Les que (EDTA), 150 mM de homogénats cellulaires NaCl, 2 mM de PMSF, 1 mM de Na₃VO₄ et un cocktail d'inhibiteurs de 60 minutes. Les protéase (Sigma concentrations en Aldrich). Les lysats ont protéines de chaque été bouillis et les échantillon ont été concentrations ont été mesurées à l'aide d'un kit déterminées à l'aide du de dosage de l'acide colorant Protein Assay bicinchoninique en Dye (Bio-Rad, Hercules, utilisant la BSA comme CA, USA). Les étalon (Pierce, Rockford, échantillons ont été IL, USA). Les lysats analysés sur un gel de protéiques (150 µg) de polyacrylamide à 7 % et chaque échantillon ont été soumis à une détection soumis à une PAGE-SDS par immunoblot à l'aide sur un gel d'acrylamide à d'anticorps contre HIF-1 10 %, et les protéines (NB100-449 Novus séparées ont été Biologicals, Littleton, transférées sur une CO, USA) et la membrane PVDF. Après glycéraldéhyde 3-incubation pendant 1 h phosphate dans une solution de déshydrogénase blocage (5 % de lait sec (GAPDH) (FL-335, dans une solution saline Santa Cruz tamponnée au Tris avec Biotechnology, Santa Tween 20) à température Cruz, CA). Comme ambiante, la membrane a contrôle positif pour HIF été incubée pendant 24 h 1, les cellules LNCaP ont avec des anticorps anti-β-été cultivées dans des actine (1:1000), anti-conditions de normoxie VEGF (1:500), anti-ou d'hypoxie et lysées NDRG1 (1:500) ou anti-dans un tampon RIPA. HIF1α (1:500) à 4 °C. Les images ont été L'anticorps secondaire capturées sur un imageur (immunoglobuline de moléculaire Versadoc chèvre anti-souris (Bio-Rad) en utilisant des conjuguée à de la réactifs de détection ECL peroxydase de raifort) a Plus (Amersham, été ajouté à une dilution Piscataway, NJ, USA). de 1:10000 et incubé à L'analyse dosimétrique a</p>
--	--	--

		<p>température ambiante pendant 1 h. Le marquage peroxydase a été détecté avec le système de détection de western blotting par chimioluminescence améliorée (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) et analysé par densitométrie. Le niveau relatif des protéines a été normalisé par rapport à la β-actine.</p>	<p>été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad).</p>
<p>Tests de xénogreffes</p>	<p>Toutes les études animales ont été réalisées selon des protocoles approuvés par le comité de protection et d'utilisation des animaux de l'université Johns Hopkins et conformément au guide NIH pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire. La digoxine et la solution saline pour injection ont été obtenues auprès de la pharmacie de l'hôpital Johns Hopkins. L'implantation sous-cutanée de cellules P493-Myc, P493-Myc-Luc, PC3, PC3-EV et PC3-CA5 dans des souris SCID athymiques (National Cancer Institute) et l'imagerie Xenogen ont été réalisées comme décrit précédemment (29). Les tumeurs ont été mesurées en trois dimensions (a, b, c) et le volume (V) a été calculé : $V = abc \times 0,52$. Les tumeurs ont été prélevées 4 heures après la dernière dose de digoxine. Un tiers de chaque tumeur a été traité pour l'isolement de l'ARN et un lysat de protéines</p>		

	tissulaires a été préparé à partir des deux tiers restants.		
EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)		<p>L'EMSA a été réalisée conformément aux instructions du fabricant. En bref, la sonde oligonucléotidique (5' CCACAGTGCATACGT GGGCTCCAACA-3' et 5' TGTTGGAGCCCACGT ATGCACTGTGG-3'), correspondant au promoteur du gène VEGF humain, a été utilisée. Les oligonucléotides ont été recuits et les sondes obtenues ont été marquées à l'aide d'un kit de marquage de l'extrémité 3' de l'ADN à la biotine (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Les noyaux ont été isolés et les extraits nucléaires ont été préparés à partir de cellules A549 à l'aide d'un kit d'extraction nucléaire (Activemotif, Carlsbad, CA, USA). Les réactions de liaison ont été réalisées à l'aide du kit LightShift Chemoluminescent EMSA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Les réactions de liaison contenant la protéine nucléaire (10 µg), Tris (10 mM), KCl (50 mM), DTT (1 mM), MgCl₂ (5 mM), 2 µg de poly (dI-dC) et 2 pmol de</p>	

		<p>sonde oligonucléotidique ont été incubées pendant 20 min à température ambiante. La liaison spécifique a été confirmée par un excès de 200 fois de sonde non marquée utilisée comme concurrent spécifique. Les complexes protéine-ADN ont été séparés sur un gel d'acrylamide non dénaturant à 6 %, transférés sur des membranes de nylon chargées positivement et réticulés à l'aide d'un réticuleur Stratagene. Les déplacements de bandes ont été visualisés à l'aide d'une peroxydase streptavidine-horseradish suivie d'une détection chimioluminescente.</p>	
<p>Immuno-histo-chimie</p>			<p>Les tissus ont été fixés immédiatement dans du formol à 10 % à 4 °C pendant une nuit, puis inclus dans de la paraffine. Des coupes sériées de 10 µm ont été incubées à 1:500 avec un anticorps monoclonal de rat anti-CD31 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Des IgG anti-rats conjuguées à de la HRP (Santa Cruz Biotechnology) ont été utilisées comme anticorps secondaire. Le tétrahydrochlorure de diaminobenzidine (DAB) (DAKO, Carpinteria,</p>

		<p>CA, USA) a été utilisé comme chromagène pour visualiser la localisation de l'antigène. Les coupes ont été légèrement contre-colorées à l'hématoxyline. L'indice CD31 a été déterminé en fonction de la présence ou de l'absence de coloration par rapport aux échantillons témoins. La densité des vaisseaux CD31-positifs a été déterminée sur la base du comptage des microvaisseaux, comme décrit pour quatre tumeurs xéno greffées différentes. 17 Six champs aléatoires ont été choisis dans chaque spécimen et les vaisseaux ont été comptés à un grossissement de 10× pour déterminer le nombre moyen de vaisseaux par champ. Les vaisseaux sanguins et les branches ont été comptés par un observateur aveugle qui ne connaissait pas les groupes de traitement. Le dosage de la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) a été effectué en injectant aux souris, par voie i.p., 1 ml de réactif de marquage BrdU (Zymed, San Francisco, CA, USA) pour 100 g de poids corporel. Les animaux ont été sacrifiés</p>
--	--	--

			2 heures après l'injection et les tissus ont été immédiatement fixés dans du formol à 10 % pendant une nuit à 4 °C. Des coupes sériées de 10 µm ont été incubées avec l'anticorps monoclonal BrdU (Sigma Aldrich) à 1:500 pendant 60 minutes à température ambiante. Les lames ont été placées dans un tampon de récupération d'antigène Rodent Decloaker (Biocare Medical, Concord, CA, USA) dans une chambre de décrochage. La peroxydase endogène a été éteinte à l'aide de peroxyde d'hydrogène à 3 %. L'anticorps secondaire Biocare Medical Mouse on Mouse HRP a été utilisé et du DAB (DAKO) a été appliqué pendant 10 minutes pour visualiser l'antigène.
--	--	--	---

II.2.2. Etude comparative in vivo

*DANS L'ARTICLE 1 on a trouvé que les cellules P493-Myc, qui sont des lymphocytes B humains transformés, forment des tumeurs chez les souris SCID de manière Myc-dépendante, alors que le traitement des cellules avec de la doxycycline réprime l'expression de Myc et bloque la croissance tumorale. Ces cellules ont été choisies pour les études in vivo car la croissance des xénogreffes de tumeurs P493-Myc chez les souris atteintes d'immunodéficience combinée sévère (SCID). Le traitement à la digoxine a bloqué l'expression de HIF-1a induite par l'hypoxie dans les cellules P493-Myc en culture (Fig. 14A).

Partie pratique

Des injections intra-péritonéales quotidiennes de 0,5 ou 2 mg/kg de digoxine à des souris, ont significativement inhibé la croissance des xénogreffes tumorales P493-Myc de manière dose-dépendante (Fig. 14B), avec seulement des effets modestes sur le poids corporel (Fig. 14C). L'effet anti-tumoral de la digoxine était parallèle à l'inhibition dose-dépendante de l'expression de la protéine HIF-1 α dans les tumeurs (Fig. 14D). L'injection sous-cutanée (s.c.) de cellules P493-Myc-Luc modifiées pour exprimer un vecteur d'expression de la luciférase a permis d'analyser les effets du traitement médicamenteux à un stade précoce (jour 8) et de reproduire les effets sur le volume tumoral à des stades ultérieurs (Fig.14E).

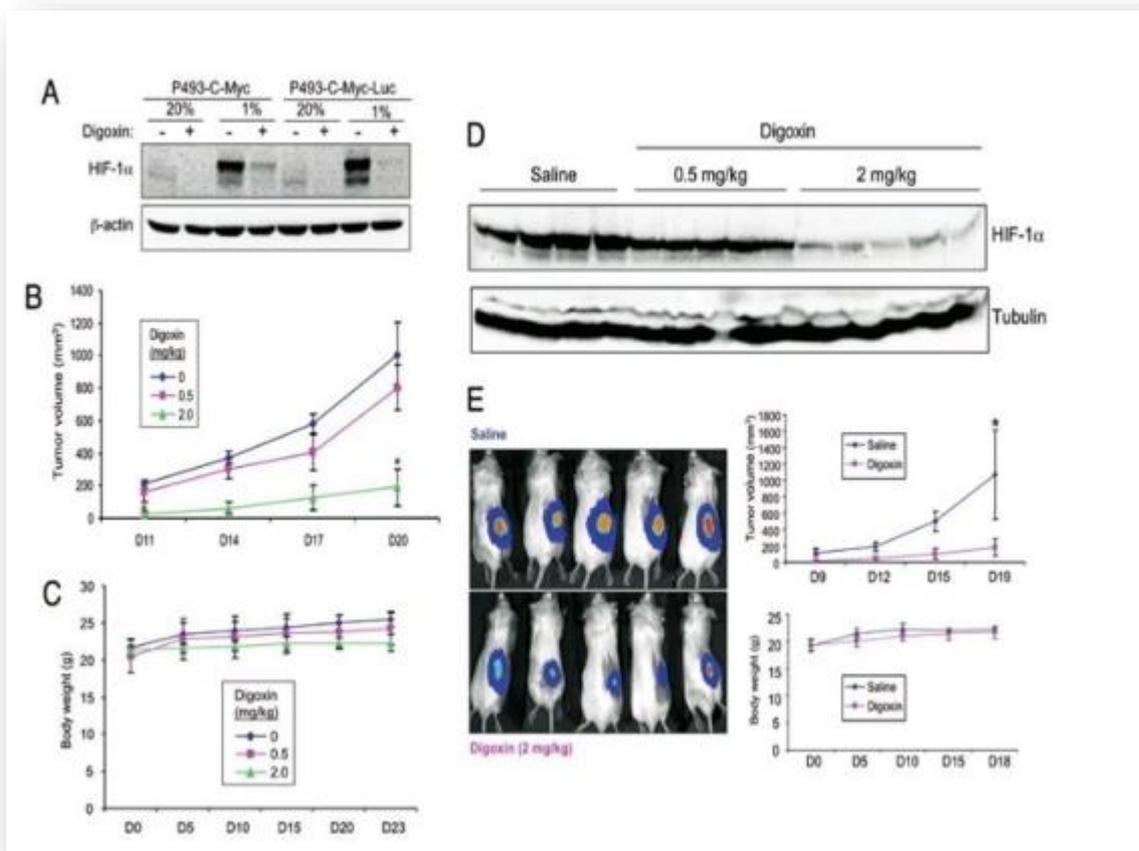


Fig. 14 : Effet de la digoxine sur l'expression de HIF-1 α et la croissance des xénogreffes tumorales. (A) Les cellules P493-Myc parentales et un sous-clône exprimant la luciférase firefly (PA93-Myc-Luc) ont été cultivées à 20% ou 1% d'O₂ pendant 24h en présence du véhicule (-) ou de 100 nM de digoxine (+). (B-D) $2,5 \times 10^7$ de cellules P493-Myc ont été implantées dans des tissus sous cutanés sur les flancs de souris SCID (n=4-5 dans chaque groupe), et traitées quotidiennement par des injections intra-péritonéales de 0.05 ou 2 mg/Kg de digoxine dans la saline, en commençant 3 jours avant l'implantation des cellules tumorales. Le volume tumoral a été déterminé tous les 3 jours sur la base de mesures au pied à coulisse. Les moyennes \pm SEM sont indiquées. *, P<0.05 (test t de Student) (B). Le poids corporel a été déterminé tous les 5 jours ; les moyennes \pm SEM sont indiquées (C). Les tumeurs ont été récoltées au 23^{ème} jour, et les lysats de tissus ont été

soumis au test d'immuno-blot (D, chaque voie représente une tumeur indépendante). (E) Les cellules P493-Myc-Luc ont été implantées dans des tissus sous cutanés sur les flancs de souris SCID (n=5 pour chacun), et traitées quotidiennement par des injections intra-péritonéales de solution saline ou de digoxine (2mg/Kg) en commençant 3 jours avant l'implantation des cellules tumorales. L'activité de la luciférase au 8^{ème} jour après l'implantation des cellules tumorales (gauche). Les mesures du volume tumoral (en haut à droite) et du poids corporel (en bas à droite) ont été effectuées aux jours indiqués ; les moyennes+/-SEM sont indiqués. [* , P<0,05 (test t de Student)].

Tandis qu'on a trouvé dans l'article 3 que bien que le traitement par la digoxine ait entraîné une réduction d'un facteur quatre de la densité des vaisseaux sanguins dans les densité des vaisseaux sanguins dans les tumeurs C4-2 xéno greffées, il n'a pas réduit la croissance de la tumeur. En fait, les cellules tumorales C4-2 in vivo étaient toujours en prolifération active, comme l'a montré la coloration BrdU (fig. 15). Des études in vitro antérieures ont montré que la digoxine peut inhiber de manière significative la prolifération des lignées cellulaires de cancer de la prostate LNCAP, DU145 et PC3. L'absence d'inhibition de la croissance par la digoxine dans les tumeurs xéno greffées C4 2 peut refléter des différences entre les conditions in vivo et in vitro. En outre, le traitement par la digoxine n'a pas eu d'effet sur le poids corporel des animaux, ce qui est en accord avec les observations publiées Dans les tumeurs xéno greffées C4-2, la dose de digoxine pour inhiber l'angiogenèse et la voie HIF-1 α pourrait ne pas être suffisante pour inhiber la prolifération cellulaire.

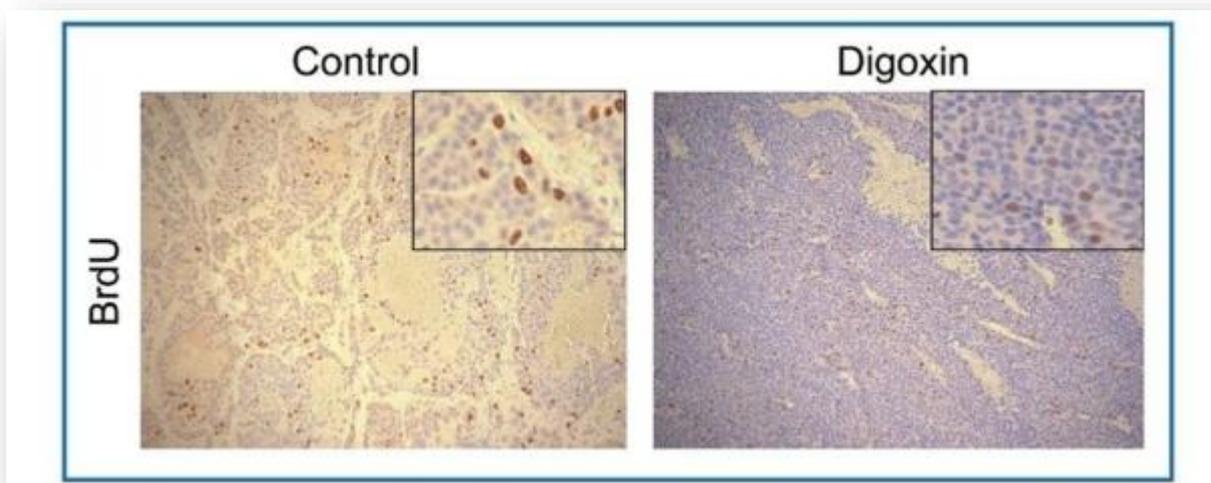


Fig. 15 : Prolifération des cellules tumorales C4-2 et effets de la digoxine. Des xéno greffes de cellules C4-2 ont été excisées après 7 jours de traitement par la digoxine ou le contrôle. Deux heures avant le sacrifice, les souris ont reçu une injection de réactif de marquage BrdU et ont été colorées pour le BrdU. Les photomicrographies sont représentatives des tissus traités à la digoxine et au contrôle, avec cinq souris chacune. de la digoxine, avec cinq souris chacune.

Partie pratique

*Dans l'article 1 une inhibition significative de la croissance tumorale (Fig. 16A), sans effet significatif sur le poids corporel (Fig. S16A), a également été observée chez des souris SCID hébergeant des xénogreffes s.c. de cellules PC3 traitées avec 2 mg/kg de digoxine par injection i.p. quotidienne. Dans cette expérience, les tumeurs étaient palpables chez les cinq souris traitées par le véhicule au jour 9, alors que les tumeurs des cinq souris traitées par la digoxine ont été palpables pour la première fois aux jours 9, 15, 15, 24 et 28, respectivement. Les tumeurs des souris traitées à la digoxine exprimaient des niveaux significativement réduits de protéine HIF-1 α (Fig. 16B) et d'ARNm pour GLUT1, HK1, HK2 et VEGF (Fig. 16C).

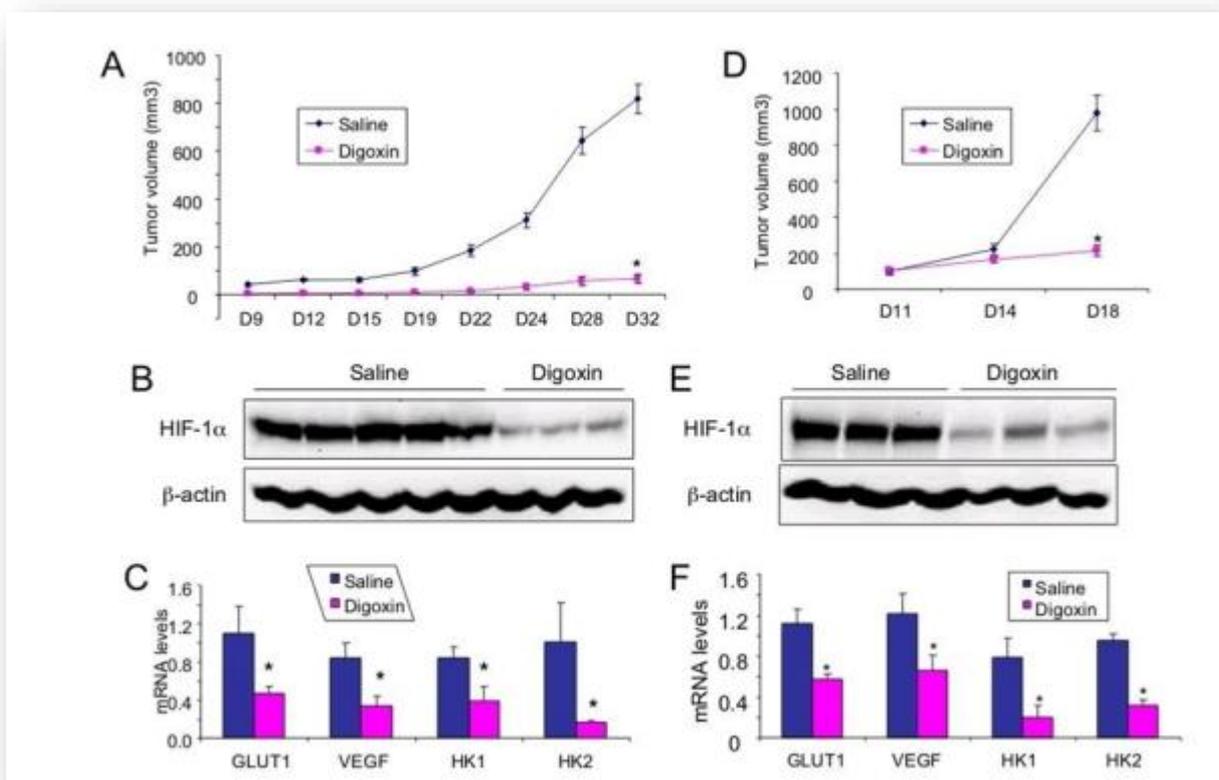


Fig. 16 : Prétraitement des PC3 et traitement retardé des xénogreffes Pa93-Myc par la digoxine. (A-C) Des cellules PC3 ont été implantées dans des tissus sous cutanés sur les flancs de souris SCID , qui ont été traitées quotidiennement par des injections intra péritonéales de solution saline ou de 2mg/Kg de digoxine (n=5 chacun)à partir de 3 jours avant l'implantation. Le volume tumoral a été déterminé tous les 2-4 jours sur la base de mesures au pied à coulisse ; les moyennes+/-SEM sont indiquées(A). Les tumeurs ont été récoltées au 35ème jour et divisées en deux. Les lysats protéiques tissulaires ont été soumis à des tests d'immunoblot (B; chaque voie représente une tumeur indépendante). L'ARN total a été extrait et les niveaux relatifs d'ARNm de GLUT1, VEGF, HK1 et HK2 ont été déterminés

par la RT-PCR quantitative en temps réel ; les moyennes \pm écart-type sont montrés (C). (D-F) Des cellules P493-Myc ont été implantées dans des tissus sous cutanés sur les flancs de souris SCID (n=3 pour chaque groupe) et les tumeurs ont été laissées se développer jusqu'à un volume de 100 mm³ avant de commencer le traitement le 11ème jour avec la saline ou la digoxine (2mg/kg). Le volume de la tumeur a été mesuré aux jours 11, 14 et 18 (D). Les tumeurs ont été récoltées au jour 18 et soumises à des analyses de protéines (E) et d'ARNm (F). [* , P< 005 (test t de Student)].

Mais dans l'article 3 les auteurs Zhang et al ont rapporté que la digoxine inhibait la synthèse de la protéine HIF-1 α . Cependant, il n'était pas clair si la digoxine pouvait également affecter le niveau de l'ARNm HIF. Les résultats de la figure 17 suggèrent que la digoxine inhibe également l'expression de l'ARNm HIF-1 α . Dans l'ensemble, la digoxine pourrait inhiber l'expression de HIF-1 α à la fois au niveau des protéines et de l'ARNm.

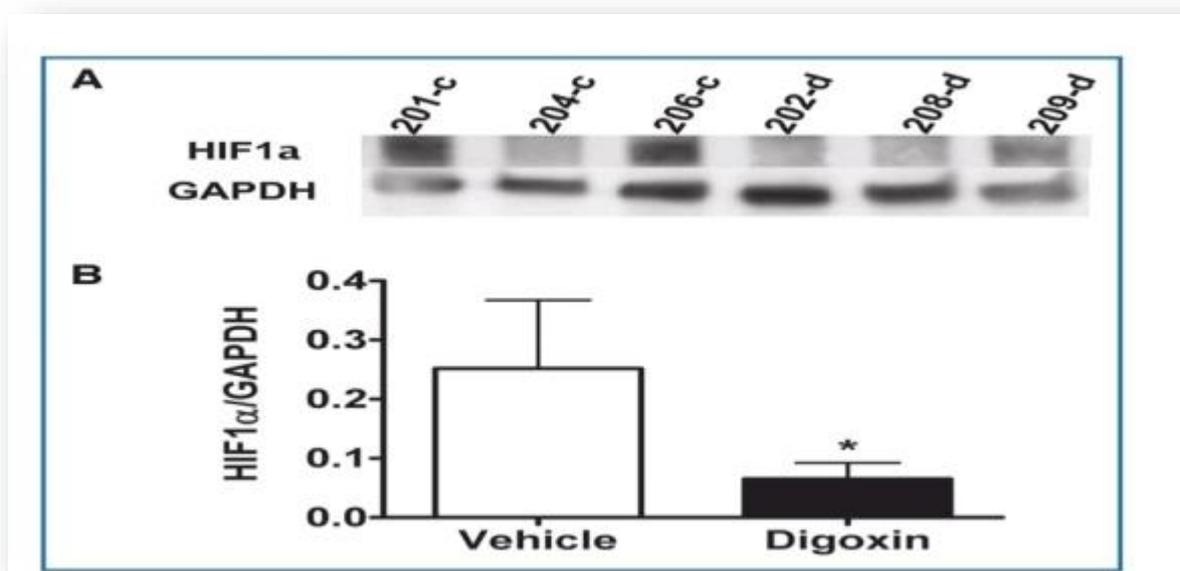


Fig. 17 : Expression de HIF-1 α dans la tumeur xéno greffée C4-2 régulée par la digoxine. Le tissu tumoral a été congelé au moment du sacrifice pour tester les niveaux de HIF-1 α par (A) western blot et (B) PCR en temps réel. Le Western blot montre trois échantillons de souris témoins (-c) ou traitées à la digoxine (-d). La protéine HIF-1 α est régulée à la baisse dans trois tumeurs traitées à la digoxine. La PCR en temps réel représente les données de trois souris du groupe témoin et de six souris du groupe traité à la digoxine. L'expression des gènes est rapportée à la GAPDH. La différence observée dans HIF-1 α est statistiquement significative (*p< 0,05).

*Dans l'article 1, on a constaté que lorsque le traitement par la digoxine a été retardé jusqu'au 11ème jour après l'implantation s.c. des cellules P493-Myc, alors que le volume tumoral moyen avait atteint 100 mm³, la croissance tumorale s'est arrêtée en 7 jours (Fig. 18D) sans effets significatifs sur le poids corporel. Le traitement de 7 jours a également

entraîné une réduction significative des niveaux intratumoraux de la protéine HIF-1 α (Fig. 18E) ainsi que l'ARNm de GLUT1, HK1, HK2 et VEGF (Fig. 18F). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque le traitement des souris porteuses de tumeurs PC3 a été retardé jusqu'au 20e jour, date à laquelle le volume tumoral moyen a atteint 200 mm³ (Fig. S18).

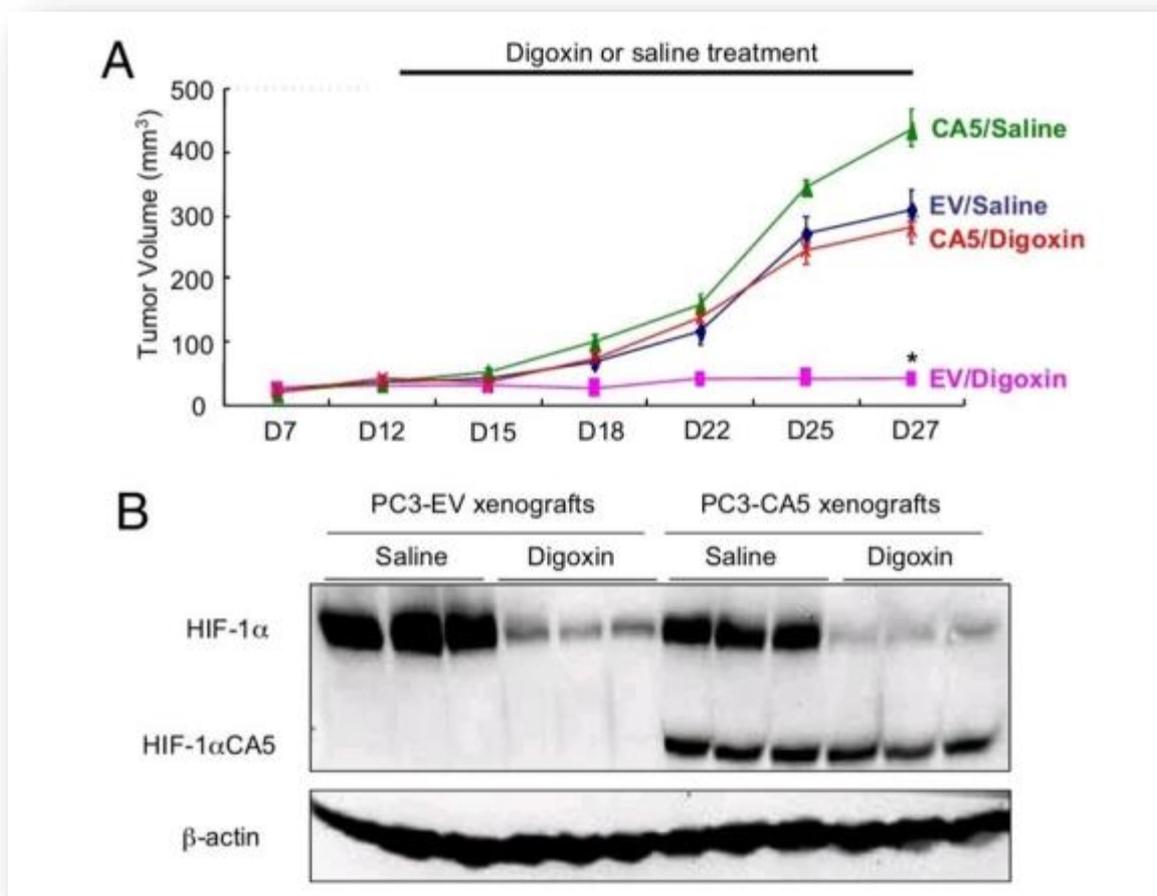


Fig. 18 : Les cellules PC3 ayant une expression renforcée d'HIF-1a sont résistantes à la digoxine. (A) Des cellules PC3-EV et PC3-CA5 ont été implantées dans le tissu sous cutané de souris SCID, qui ont été traitées par des injections intra-péritonéales quotidiennes de solution saline ou de 2 mg/kg de digoxine, à partir du 12e jour après l'implantation. Les volumes tumoraux ont été déterminés tous les 2 à 4 jours (moyennes +/- écart-type indiqués ; n = 5 pour chaque groupe)[*,p<0.05 contre toutes les autres conditions (test t de Student)]. (B) Des lysats tumoraux ont été préparés le 27e jour pour des tests immuno-blot.

Alors que dans l'article 3 ils ont constaté qu'il était inattendu que la digoxine inhibe l'angiogenèse mais pas la croissance tumorale dans les tumeurs C4-2 dans cette étude . Une possibilité est que les souris n'ont été traitées avec la digoxine que pendant 7 jours, ce qui n'est peut-être pas assez long pour permettre de détecter l'effet de la digoxine sur la croissance tumorale. Une autre possibilité est que le taux de croissance de la tumeur C4-2 était plus lent

que celui des tumeurs PC3 qui ont montré une inhibition de la croissance en réponse à la digoxine. Il peut être plus difficile de détecter une inhibition de la croissance dans des tumeurs moins agressives. En outre, chez l'homme, la digoxine nécessite une dose de charge pour atteindre des niveaux thérapeutiques chez les patients cardiaques. Nous n'avons pas utilisé de dose de charge chez nos souris. Par conséquent, le niveau de digoxine peut ne pas avoir été suffisamment élevé pour induire une réduction de la tumeur, bien qu'il ait inhibé l'angiogenèse dans le modèle C4-2.

II.2.3. Comparaison entre les résultats des deux articles 01 et 03

Dans l'article 1 les études dose-réponse et de transfection cellulaire ont démontré qu'une inhibition bonne et suffisante de l'expression d'HIF-1 α est exigée pour l'efficacité anti tumorale du digoxin. Ce qui a resté à déterminer par les essais cliniques encore en cours, est si l'expression intra-tumorale d'HIF1- α est efficacement inhibée au moment où les doses de digoxin sont administrées.

Mais dans l'article 3 on trouve que le rôle de la digoxine dans l'inhibition de HIF-1 α et de l'angiogenèse dans le cancer de la prostate pourrait constituer une nouvelle approche pour la prévention et/ou le traitement du cancer de la prostate. Nos résultats ont confirmé l'efficacité de la digoxine en tant qu'inhibiteur puissant de la signalisation HIF-1 α et de l'angiogenèse dans les cancers de la prostate. Les résultats de cette étude suggèrent également que la voie HIF-1 α et la densité des vaisseaux sanguins peuvent être utilisées comme indicateurs pour évaluer l'efficacité de la digoxine dans le cancer de la prostate.

II.3. Des études in vitro 1 et 2

Dans l'article 1 nous avons trouvé une étude dose-réponse qui a révélé que l'exposition des cellules Hep3B à l'ouabaine (Fig. 19C) ou à la proscillaridine A (Fig. 19D) à des concentrations >50 nM pendant 24 h inhibait l'expression des protéines HIF-1 α et HIF-2 α induite par l'hypoxie. Dans les cellules humaines de cancer de la prostate PC3, qui expriment des niveaux détectables de HIF-1 α dans des conditions non hypoxiques et hypoxiques, 50 nM d'ouabaine ou de proscillaridine A ont inhibé l'expression de HIF-1 α à la fois à 20 % et à 1 % d'O₂ (Fig. 19E). Pour étudier la cinétique de l'inhibition, les cellules Hep3B ont été exposées simultanément à 50 nM de proscillaridine A ou 100 nM d'ouabaine et à 1% d'O₂. HIF-1 α et HIF-2 α ont été fortement induite par l'exposition à l'hypoxie pendant 4 à 8 h en présence du véhicule, tandis qu'en présence de proscillaridine A ou d'ouabaine, l'expression a été réduite de manière dépendante du temps, l'inhibition complète étant obtenue après 8 h (Fig. 19F). Des

Partie pratique

résultats similaires ont été obtenus dans les cellules Hep3B traitées avec 100 nM de digoxine (Fig. 19G). Les expériences d'élimination du médicament ont montré que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 revenait progressivement à des niveaux normaux 24 heures après l'élimination de la digoxine du milieu de culture (Fig. 19S2).

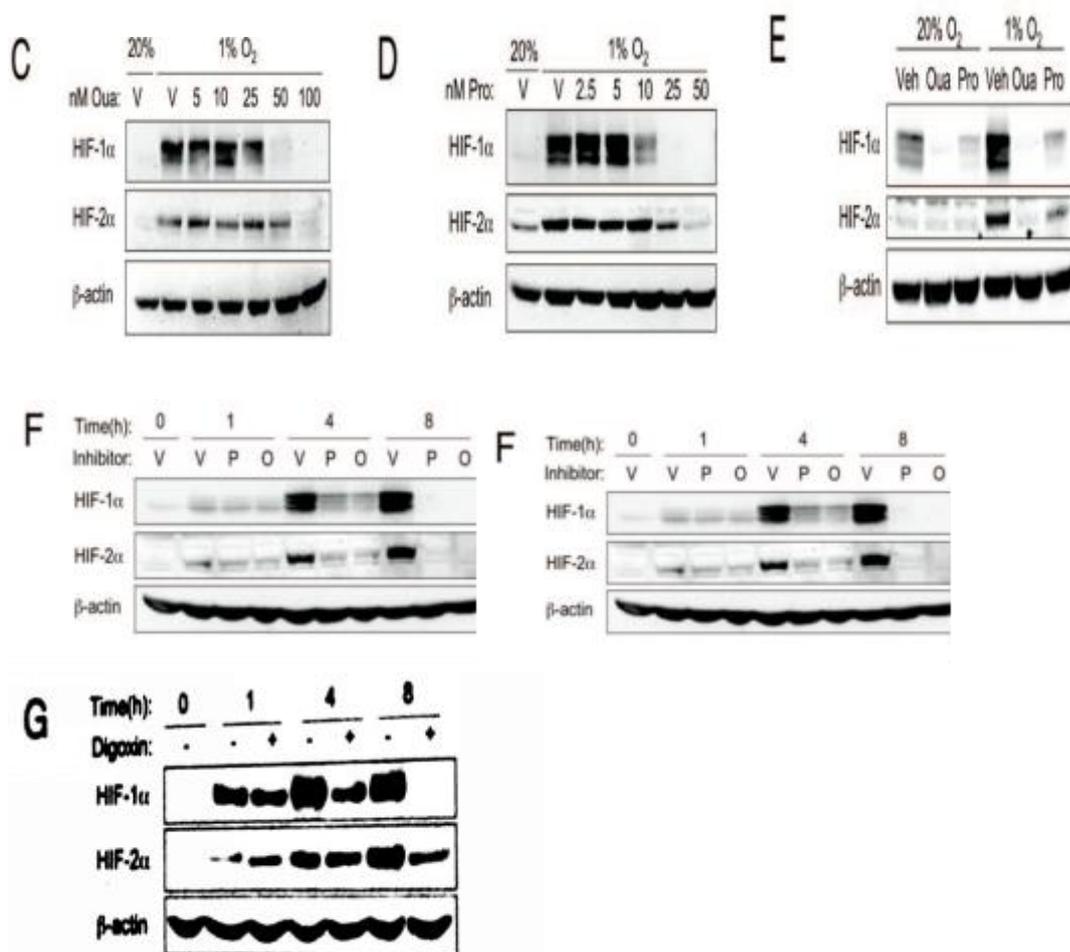


Fig. 19 : Inhibition de HIF-1a et HIF-2a par les glycosides cardiaques. (C et D) Les cellules Hep3B ont été exposées au véhicule ou à la concentration indiquée (nM) d'ouabaïne (Oua) ou de proscillaridina A (Pro) pendant 24 heures dans des conditions hypoxiques (1 % O) ou non hypoxiques (20 % O) et les lysats cellulaires ont été soumis à des tests immunoblot pour HIF-1a, HIF-2a et B-actine. (E) Les cellules PC3 ont été exposées au véhicule (V), à 50 nM d'ouabaïne (Oua) ou à 50 nM de proscillaridina A (Pro) pendant 24 h. Les cellules Hep3B ont été exposées au véhicule (M, à 50 nM de proscillaridina A (P) ou à 100 nM d'ouabaïne (O) dans des conditions hypoxiques pendant la durée indiquée et des analyses par immunoblot ont été réalisées. (G) Les cellules Hep3B ont été exposées au véhicule (-) ou à 100 nM de digoxine (+) dans des conditions hypoxiques pendant la durée indiquée et des analyses immunoblot ont été réalisées.

-Et aussi Pour étudier l'effet du traitement médicamenteux sur l'expression des ARNm codés par les gènes cibles de HIF-1, les cellules Hep3B ont été cultivées en présence du véhicule, de la proscillaridina A, de l'ouabaïne ou de la digoxine pendant 24 h à 20 % ou 1 %

d'O₂, et l'ARN total a été isolé. L'analyse par transcription quantitative en temps réel de la transcription inverse (RT-PCR) a révélé une diminution significative des niveaux d'ARNm codant pour HK1, HK2 et GLUT1 dans les cellules Hep3B traitées par des glycosides cardiaques, et cultivées à 1 % d'O₂, ainsi qu'une diminution des niveaux d'ARNm de HK1 et HK2 dans les cellules traitées par le médicament et cultivées à 20 % d'O₂, (Fig. 20 A-C). En revanche, le traitement médicamenteux n'a pas inhibé les taux d'ARNm de HIF-1 α à 20 % d'O₂, et a augmenté de manière significative les taux d'ARNm de HIF-1 α à 1 % d'O₂ ; (Fig. 20D). Ces résultats indiquent que la digoxine inhibe l'expression des gènes cibles de HIF-1 par un mécanisme qui n'implique pas l'inhibition de l'expression de l'ARNm de HIF-1 α . Outre l'hypoxie, HIF-1 peut également être induit par l'exposition des cellules au chlorure de cobalt, à la desferrioxamine ou à la diméthylaloxalyglycine, qui inhibent toutes les prolyl hydroxylases qui ciblent HIF-1 α pour l'ubiquitination dépendante de VHL et la dégradation protéasomique. L'induction de HIF-1 α par chacun de ces composés a été bloquée par un traitement à la digoxine (Fig. 21A). Le traitement par la digoxine (Fig. 21B), la proscillaridine A ou l'ouabaïne (Fig. S21A) a bloqué l'expression de HIF-1 α même en présence de l'inhibiteur du protéasome « MG132 ». L'ensemble de ces résultats indique que les glycosides cardiaques inhibent l'expression de HIF-1 α indépendamment de la voie PHD-VHL-protéasome.

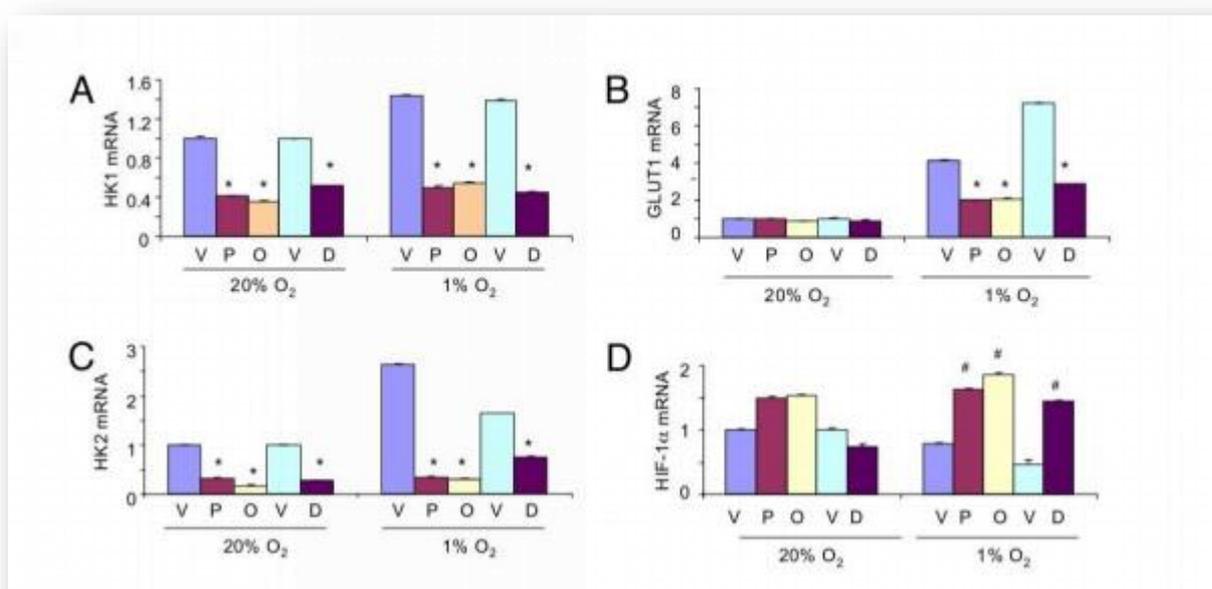


Fig. 20 : Les glycosides cardiaques inhibent l'expression des gènes cibles de HIF-1 induite par l'hypoxie. Dans deux expériences distinctes, des cellules Hep3B ont été exposées à 20 % ou 1 % d'O₂ pendant 24 h en présence de : véhicule (V), 50 nM de proscillaridine A (P) ou 100 nM d'ouabaïne (O) ; et véhicule (V) ou 100 nM de digoxine (D). L'ARN total a été extrait des

cellules et analysé par RT-PCR quantitative en temps réel pour les MRNAS codant pour l'hexokinase 1 (HK1 ; A), le transporteur de glucose 1 (GLUT1 ; B), l'hexokinase 2 (HK2 ; C) et le facteur 1a inductible à l'hypoxie (HIF-1a ; D). Pour chaque ARNm dans chaque expérience, l'expression a été normalisée par rapport aux niveaux dans les cellules traitées par véhicule à 20 % d'O₂. Les barres indiquent l'écart-type moyen (n = 4 pour chaque expérience). (*, diminution significative par rapport au véhicule (P<0,05, test t de Student) ; #, augmentation significative par rapport au véhicule (P<0,05, test t de Student)].

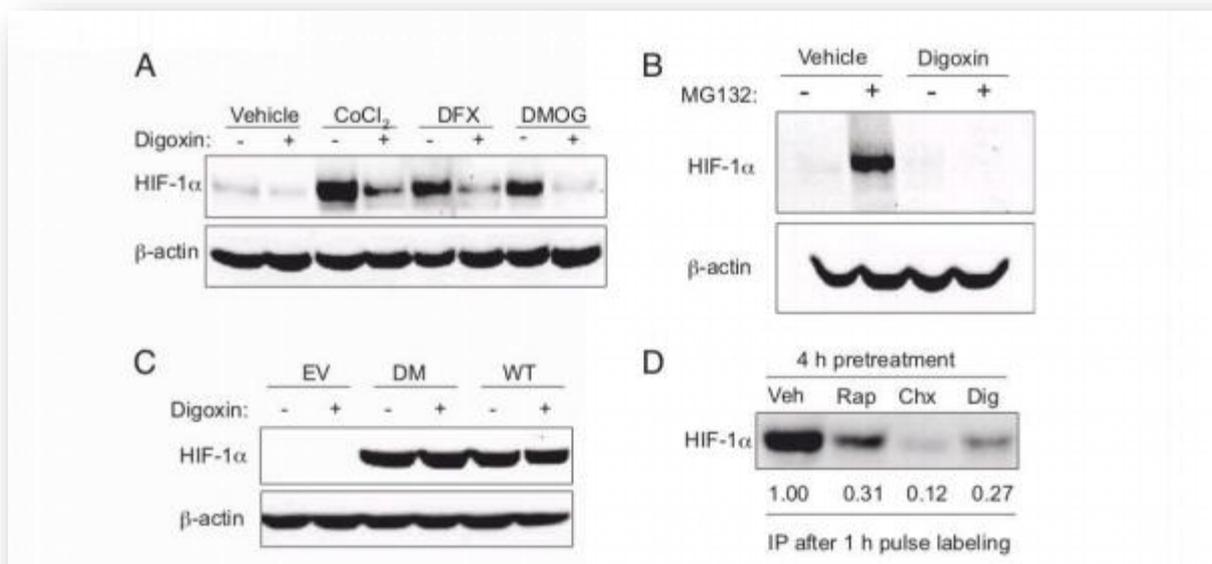


Fig. 21: Les glycosides cardiaques inhibent la synthèse de la protéine HIF-1a. (A) Les cellules Hep3B ont été exposées au véhicule ou à l'inducteur HIF-1a, le chlorure de cobalt (CoCl₂), la desferrioxamine (DFX) ou la diméthylaloxalylglycine (DMOG) en présence de 100 nM de digoxine (+) ou de véhicule (-) pendant 24 h et les lysats de cellules entières ont été soumis à des tests d'immunoblot. (B) Les cellules Hep3B ont été traitées avec le véhicule ou la digoxine en l'absence (-) ou en présence (+) de 5 M MG132. (C) Les cellules 293 ont été transfectées avec le vecteur vide (EV) ou le vecteur d'expression codant pour l'épitope FLAG marqué HIF-1a de type sauvage ou double mutant (DM) en raison des substitutions Pro Ala aux résidus 402 et 564 de la protéine. Les cellules ont été cultivées en présence de 100 nM de digoxine (+) ou de véhicule (-) pendant 24 h, et les lysats cellulaires ont été soumis à des tests d'immunoblot en utilisant l'anticorps anti-FLAG. (D) Les cellules Hep3B ont été prétraitées pendant 4 h avec le véhicule (Veh), 25 nM de rapamycine (Rap), 20 µg/ml de cycloheximide (Chx) ou 100 nM de digoxine (Dig). De la (5S)méthionine/cystéine a été ajoutée pendant 1 h, suivie d'une lyse cellulaire, d'une immunoprécipitation HIF-1a (1P), d'une SDS/PAGE et d'une autoradiographie. L'intensité du signal a été quantifiée par densitométrie.

II.3. Des études in vitro 1 et 2

Alors que dans le 2^{ème} article on a trouvé que

Le digoxin atténue l'expression des ARNm et protéines du VEGF et NDRG1 dans les cellules A549 : Les taux d'expression des ARNm et protéines du VEGF et NDRG1 ont été évalués par RT-PCR et western blot. Nos données ont démontré que le VEGF et NDRG1 sont fortement régulés à la hausse dans les cellules A549 après exposition à l'hypoxie. Pourtant, leur hyper expression induite par l'hypoxie a été inhibée par le digoxin d'une manière dépendante de concentration. En outre, leur expression dans des cellules A549 traitées par 1 μ M de digoxin n'avait aucune différence de celle sous conditions normales (fig. 22).

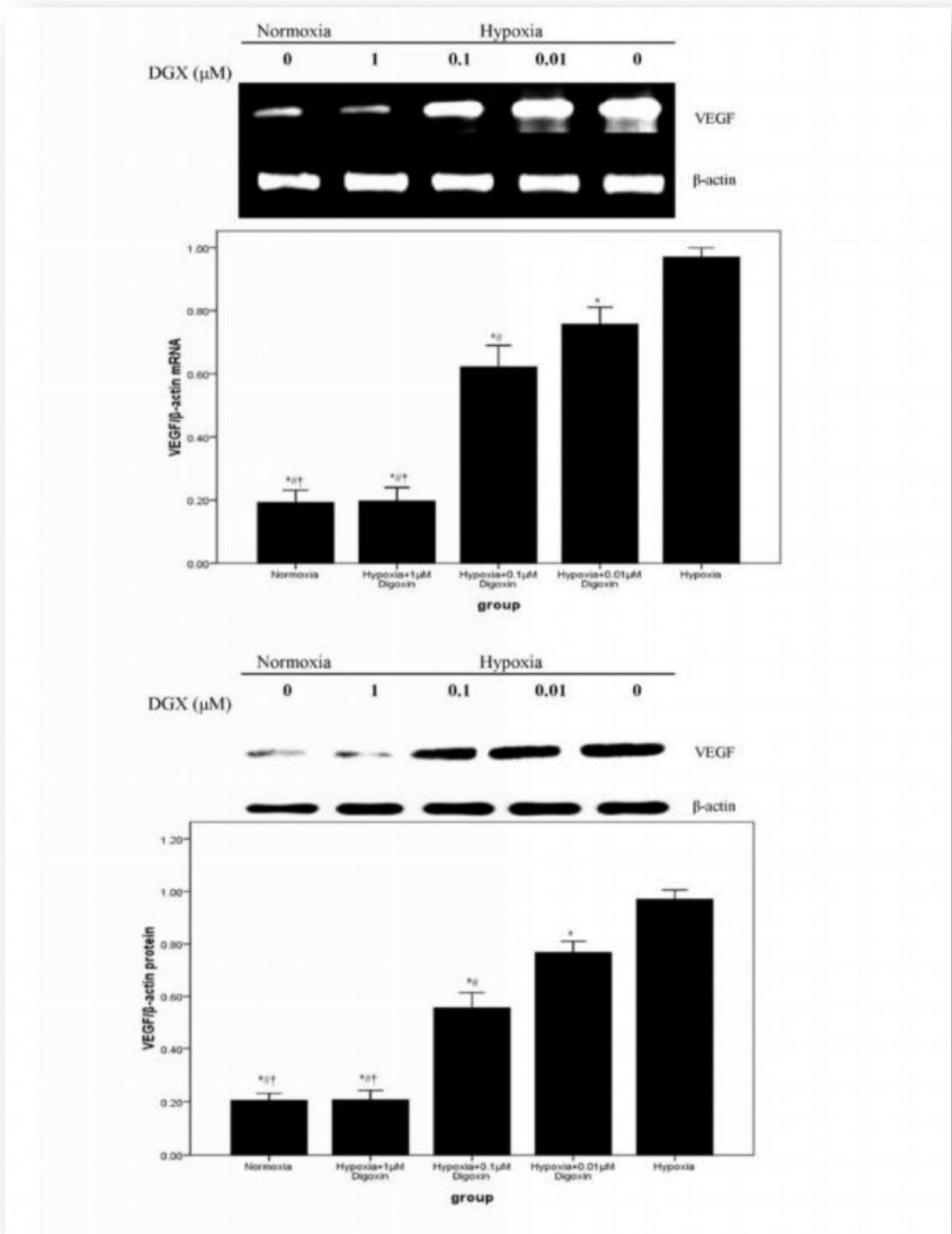


Fig. 22 : Digoxin atténue l'expression d'ARNm et des protéines de VEGF et NDRG1 dans les cellules A549 sous conditions hypoxiques. Sous conditions normales ou hypoxiques, les

taux d'ARNm et des protéines VEGF et NDRG1 dans les cellules A549 traitées ou non avec des concentrations différentes de digoxin (0.01,0.1,et 1 μ M) pendant 24h ont été analysés.

DATA quantitatif défini comme la moyenne \pm SD(n=4). *p<0.05 en comparaison avec l'hypoxie. #p<0.05 en comparaison avec l'hypoxie +0.01 μ M de digoxin. °p<0.05 en comparaison avec l'hypoxie +0.1 μ M de digoxin.

Digoxin supprime l'expression d'ARNm et de la protéine HIF-1a, et réduit les taux du complexe HIF-1a DNA dans les cellules A549 :Des rapports antérieurs décrivent que l'hyper expression d'HIF-1a est un événement commun dans plusieurs types de carcinomes, qui a été aussi associée au comportement agressif de la tumeur, à la résistance thérapeutique, et au faible pronostic global . HIF-1a a été considérée comme une cible thérapeutique éventuelle de plusieurs cancers. Un nombre de gènes impliqués dans la prolifération et survie cellulaire, l'angiogénèse, l'immortalisation tumorale, la maintenance des différenciation des cellules souches, l'instabilité génétique, la croissance autocrine, l'invasion/métastases, et l'échec thérapeutique, sont régulés à la hausse sous conditions hypoxiques par l'activation d'HIF1- α .

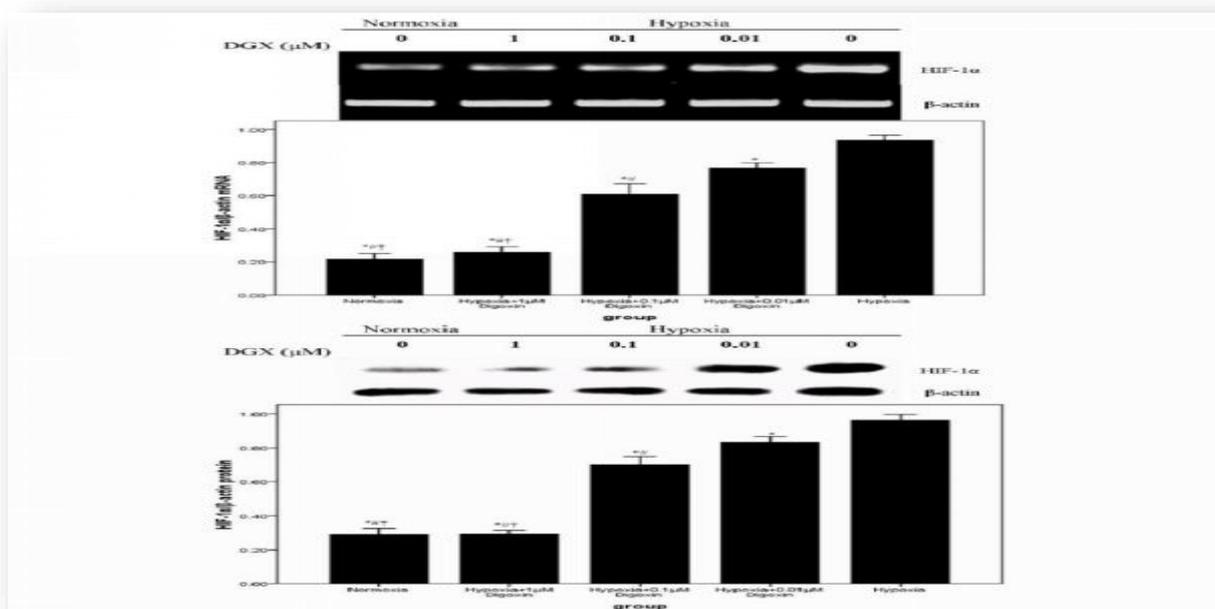


Fig. 23 : Le digoxin supprime l'expression d'ARNm et de la protéine HIF-1a, et réduit le complexe HIF-1/DNA dans les cellules A549 sous conditions hypoxiques. (a) Sous conditions normales ou hypoxiques, les taux d'ARNm et de la protéine HIF-1a dans les cellules A549 traitées ou non par des concentrations variables de digoxin (0.01 ,0.1, et 1 μ M) pendant 24h furent mesurés. Les DATA quantitatifs sont présentés comme la moyenne \pm SD (n=4). *p<0.05 en comparaison avec l'hypoxie. #p<0.05 en comparaison avec l'hypoxie+0.01 μ M de digoxin. °p<0.05 en comparaison avec l'hypoxie+0.1 μ M de digoxin.

II.3. Des études in vitro 1 et 2

Dans l'article 1 on a trouvé que contrairement à la rapamycine, la digoxine inhibe la traduction de HIF-1 α par un mécanisme indépendant de mTOR, ce résultat est prouvé par les propos suivants :

Bien que l'HIF-1 α endogène ait été puissamment inhibé par la digoxine, la proscillaridine A ou l'ouabaine, ces médicaments n'ont eu aucun effet sur l'HIF-1 α exprimé à partir d'un vecteur plasmidique transfecté transitoirement, que la protéine soit l'HIF-1 α de type sauvage ou l'HIF-1 α DM doublement mutant, qui contient des mutations faux-sens de Pro en Ala sur les résidus soumis à l'hydroxylation (Fig. 21C et Fig. S21B). Une différence majeure entre HIF-1 α endogène et exogène est que ce dernier est traduit à partir d'ARNm dépourvu de séquences 5' et 3' non traduites, qui régulent la traduction et la stabilité de l'ARNm. Comme les glycosides cardiaques n'ont pas réduit les niveaux d'ARNm de HIF-1 α (Fig. 20D), ce résultat implique que les glycosides cardiaques inhibent la traduction de l'ARNm de HIF-1 α en protéine. Pour tester cette hypothèse, nous avons marqué les cellules Hep3B avec de la 5s]-méthionine/cystéine en présence de cycloheximide, un inhibiteur global de la synthèse des protéines, de rapamycine, connue pour inhiber sélectivement la traduction de l'ARNm d'HIF-1 α , ou de digoxine. HIF-1 α a ensuite été immunoprécipité à partir des lysats cellulaires et analysé par PAGE et autoradiographie. À la concentration utilisée, la digoxine a efficacement inhibé la synthèse de la protéine HIF-1 α , de manière similaire à l'effet du cycloheximide ou de la rapamycine (Fig. 21D). La digoxine a réduit la synthèse de novo de HIF-1 α de 73 %, alors que la synthèse globale de la protéine n'était inhibée que de 19 % dans les cellules traitées par la digoxine (Fig. 21C). En revanche, le cycloheximide a eu des effets inhibiteurs similaires sur la synthèse protéique globale (85 %) et sur la synthèse protéique HIF-1 α (88 %).

La traduction de HIF-1 α est régulée par mTOR, qui active la kinase S6, qui à son tour phosphoryle la protéine ribosomale S6 et les niveaux de phospho-RPS6 peuvent être utilisés comme indicateur de l'activité de mTOR. Dans les cellules PC3, la protéine RPS6 a été phosphorylée dans des conditions hypoxiques et non hypoxiques, mais pas en présence de rapamycine (fig. 24A gauche). Dans les cellules de lymphome P493, la phosphorylation de RPS6 n'a été observée que dans les cellules non hypoxiques et était sensible à la rapamycine (Fig. 24A droite). Des résultats similaires ont été observés dans les cellules 293T (données non présentées). L'effet inhibiteur de l'hypoxie sur la phosphorylation de RPS6 est conforme aux rapports publiés. En revanche, le traitement de ces trois lignées cellulaires par la digoxine à des concentrations qui inhibent puissamment l'expression de la protéine HIF-1 α n'a pas eu

d'effet inhibiteur sur la phosphorylation de RPS6 (Fig. 24A). Ces résultats indiquent que, contrairement à la rapamycine, la digoxine inhibe la traduction de HIF-1 α par un mécanisme indépendant de mTOR.

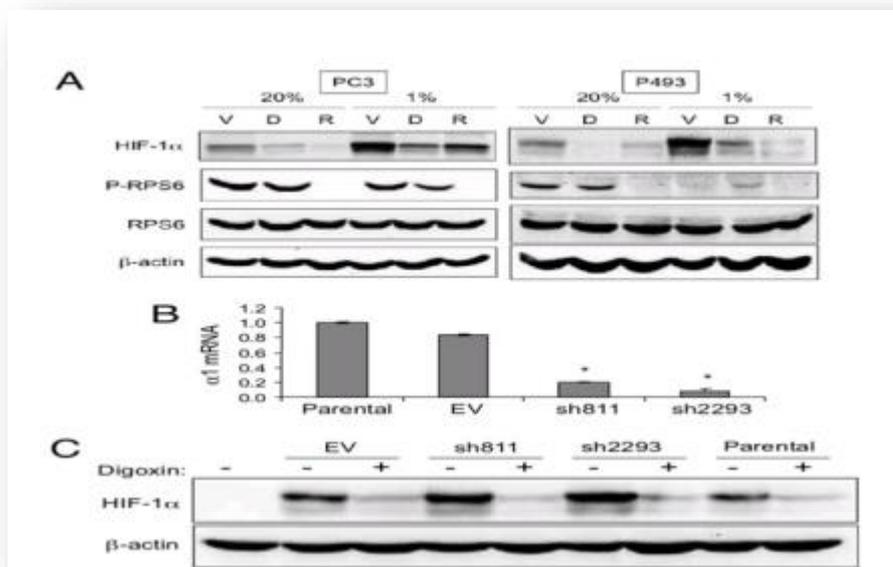


Fig. 24 : L'inhibition de HIF-1 par la digoxine est indépendante de mTOR et de la sous-unité Na ATPase $\alpha 1$. (A) Les cellules PC3 (à gauche) et P493 (à droite) ont été cultivées à 20 % ou 1 % O₂, pendant 24 h en présence de véhicule (V), 100 nM digoxine (D), ou 25 nM rapamycine (R) et les lysats de cellules entières ont été soumis à des tests d'immunoblot avec des anticorps spécifiques pour HIF-1 α , la protéine ribosomale S6 phosphorylée (P-RPS6), la RPS6 totale, ou la B-actine. (B) L'ARN a été isolé à partir de cellules 293T non traitées (Parental) ou de cellules transfectées avec un vecteur vide (EV) ou des vecteurs d'expression codant pour deux différentes épingles à cheveux courtes RNAs contre la sous-unité $\alpha 1$ de la Na/K ATPase (sh811, sh2293). Les niveaux d'ARNm de la sous-unité $\alpha 1$ (moyenne SD) ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel. $P < 0,05$ vs. parentale ou EV (test t de Student). (C) Les cellules 293T ont été transfectées de façon transitoire avec l'EV ou le vecteur codant pour sh811 ou sh2293 et traitées avec le véhicule (-) ou 100 nM de digoxine (+) à 1% d'O₂, pendant 24 h. Les lysats de cellules entières ont été soumis à des tests d'immunoblot pour HIF-1 α et B-actine.

En même temps on a trouvé dans l'article 2 que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est un facteur de croissance essentiel dans la régulation de l'angiogenèse. Plusieurs études ont montré que le VEGF est régulé à la hausse dans les tumeurs, y compris dans les NSCLC. L'angiogenèse est un processus indispensable à la croissance tumorale et à la formation de métastases. Selon des rapports antérieurs, l'ERH a été identifiée sur le gène du VEGF. Il a également été démontré que HIF-1 est un régulateur important du VEGF dans des conditions hypoxiques dans les cellules A549. De même, des études ont confirmé que l'HRE se trouve également sur le gène N-Myc downregulated gene 1 (NDRG1). En outre, il a

également été démontré que la voie de signalisation HIF-1 contribuait considérablement à la régulation du gène NDRG1 dans des conditions hypoxiques.

II.4. Résultats et discussion

Après avoir lecture, analyse et comparaison des articles, on constate qu'avant de commencer toute expérience scientifique, une sélection de la méthode de travail, les outils sont déterminés ainsi que leurs conditions, un choix du type cellulaires et du protocole à suivre sont établis.

Nous avons remarqué que les souris ont été comparées en termes de poids pendant les jours sous l'influence de la digoxine au jour 7, au cours duquel la dose du médicament digoxine a été relativement augmentée ; ils ont obtenu une diminution du volume de la tumeur et préservation du poids de la souris.

Des expériences in vitro en conditions d'hypoxie et de normoxie; La digoxine est administrée par une concentration élevée qui a une efficacité dans les facteur hif, glut1, vegf, mtor Et lors de la comparaison entre les articles, nous avons trouvé une contradiction dans l'analyse de l'article 3 sous l'expérience des cellules de xéno greffe dont Les résultats du contrôle sont similaire avec les cellules qui ont traité la Digoxine.

- dans le premier article, la digoxine peut être comparée par d'autres composants du glucoside cardiaque, et enfin il a été constaté que la digoxine est meilleure que oubaine proscillaridine et est capable avoir un effet contre le cancer.

Les cellules cancéreuses se multiplient rapidement en présence d'O₂, ce qui entraîne une activation de la structure angiogénèse et permet l'activation de facteur comme hif (sont des protéines agissant comme facteurs de transcription dans tous les tissus et qui sont régulées par l'absence de dioxygène O₂); donc à partir des courbe et les statistiques il y a une relation entre la digoxine et le facteur hypoxie hif-1a dans le contrôle des cellules cancéreux.

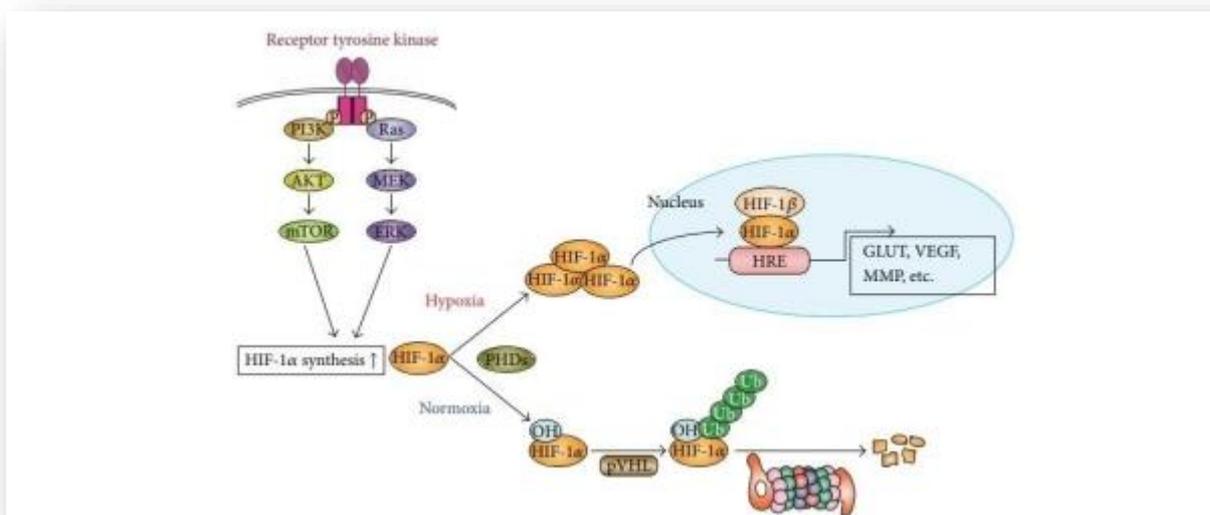


Fig. 25 : Mécanisme de régulation de l'expression du facteur inductible à l'hypoxie (HIF-1). La stimulation du facteur de croissance induit la synthèse de la sous-unité HIF-1.

En activant les voies kinases PI3K/Akt/mTOR et Ras/MEK/ERK. Dans des conditions normoxiques, HIF-1 α est hydroxylée par les proline hydroxylases (PHD), ce qui déclenche son interaction avec la protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (pVHL), conduisant à sa polyubiquitination et à sa protéinisation ultérieure. polyubiquitination et la dégradation protéasomique qui s'ensuit. En revanche, dans des conditions hypoxiques, HIF-1 α reste stable, pénètre dans le noyau et, avec HIF-1 β , dans le système nerveux central. noyau et, avec HIF-1 α , se lie aux éléments sensibles à l'hypoxie (HRE), ce qui augmente l'expression de gènes cibles tels que les transporteurs de glucose (GLUTs), les transporteurs d'oxygène et les transporteurs d'oxygène (HREs). les transporteurs de glucose (GLUT), les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et les métalloprotéinases matricielles (MMP).

Enfin, nous pouvons confirmer que le premier article est plus fiable et crédible en raison des expériences in vivo et vitro, qui permettent simplement de conclure que La digoxine est une molécule d'avenir dans la thérapie anticancéreuse, si cette dernière donne des résultats prometteurs lors des essais cliniques.

III. Partie 2: Blocage de l'enzyme PI3K/Ait par la digoxine et comparaison avec combinaison du médicament G SK2606414

III.1. Matériel

Tableau7: tableau illustre des informations des articles 4 et 5

	Titre	Auteurs	Date	Laboratoire	Université	Pays
Article 4	The combination of digoxin and GSK2606414 exerts synergistic anticancer activity against leukemia in vitro and in vivo	Xue-Hong Zhang Xin-Yu Wang Zhi-Wei Zhou Hua Bai Lin Shi Yin-Xue Yang Shu-Feng Zhou Xiao-Chun Zhan	06 juillet 2017		Ningxia Medical University University of South Florida University of Texas Southwestern Medical Center	La chine USA
Article 5	Digoxin exerts anticancer activity on human nonsmall cell lung cancer cells by blocking PI3K/Akt pathway	Yingying Wang Yongqiang Hou Lanjiao Hou Wei Wang Ke Li Zhe Zhang Bo Du and Dexin Kong	06 Octobre 2021	Biochrmlcal society	Tianjin University Hospital	Tianjin, la chine

III.2. Methode:

La comparaison entre les articles 4 et 5.

III.2.1. Points communs

III.2.1.1. Effets de la digoxine sur la viabilité des cellules

Dans article 4 : Les cellules ont été traitées avec la concentration indiquée de digoxine pendant les temps indiqués et la viabilité a été mesurée à l'aide de CCK-8, âpre examine l'effet anticancéreux potentiel de la digoxine (Fig. 26A) sur les cellules leucémiques par un

test de viabilité cellulaire les résultats ont montré que la digoxine diminuait significativement la viabilité des cellules leucémiques de manière **dépendante de la concentration** (Fig. 26B et 26C).

En revanche, dans l'article 5, l'étude était la suivante :

Pour étudier l'effet toxique de la digoxine sur les cellules cancéreuses du poumon aux cellules non petites, ils ont évalué la viabilité cellulaire des cellules A549 et H1299 traitées avec de la digoxine à différentes concentrations par un test MTT et un test de formation de colonies sur plaque. Ils ont précédemment rapporté les valeurs IC50 de la digoxine sur les cellules A549 (0,10 LM) et H1299 (0,12 LM) dans le test MTT.

A partir la (fig.27A, B) : la formation de colonies a été significativement inhibée après le traitement à la digoxine des cellules A549 et H1299 de manière **dose-dépendante** par rapport au groupe témoin, ce qui indique que la digoxine peut inhiber les capacités de formation de colonies des cellules A549 et H1299.

En outre, la digoxine a montré un effet cytotoxique beaucoup plus faible sur les PBMCS, comme le montre la (fig. 27C).

Alors, dans les deux articles on retrouve le même résultat (la digoxine diminuent significativement la viabilité des cellules de manière dose-dépendante) malgré que les tests utilisés sont différents. il n'y a qu'une différence dans le résultat supplémentaire tirée de l'article 5 (la digoxine a montré un effet cytotoxique beaucoup plus faible sur les PBMCS).

[Les données sont exprimées en moyenne + écart-type (n3) ; "P<0,05,"P<0,01, *P<0,01, par rapport au contrôle].

- Figures :
Article 4 :

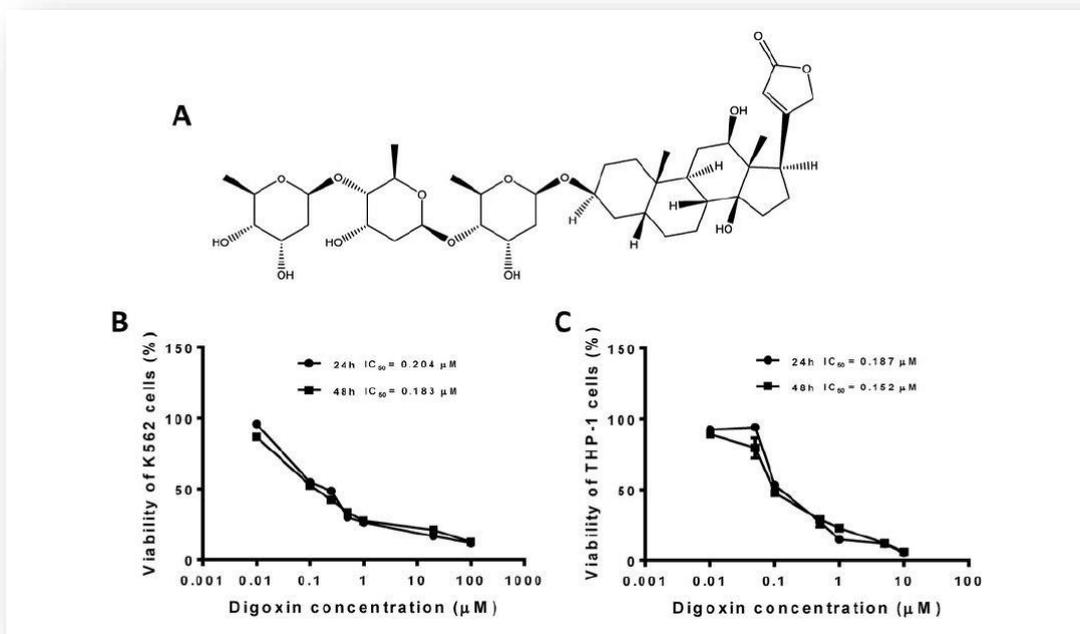


Fig. 26 : Effets de la digoxine sur la viabilité des cellules leucémiques. A : Structure chimique pharmaceutique de la digoxine. B, C : Les courbes graphiques montrent que la digoxine diminue significativement la viabilité des cellules leucémiques. Les cellules ont été traitées avec la concentration indiquée de digoxine pendant les temps indiqués et la viabilité a été mesurée à l'aide de CCK-8.

Article 5 :

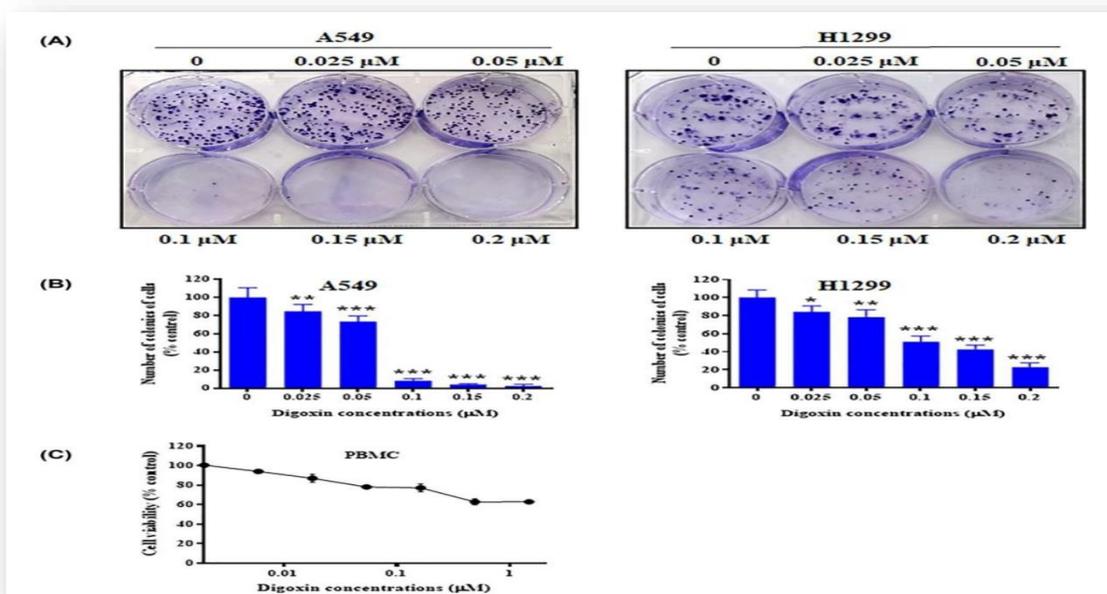


Fig. 27 : Effet inhibiteur de la digoxine sur la croissance des cellules cancéreuses du poumon non petites et des cellules mononucléaires du sang périphérique (A) Un test de formation de colonies sur plaque a été utilisé pour évaluer l'effet de la digoxine sur la capacité de formation de colonies des cellules A549 et H1299. Les cellules ont été incubées pendant 12 jours et colorées au Crystal Violet après traitement avec différentes concentrations de digoxine. (B) Les histogrammes représentent le nombre de colonies des cellules A549 et H1299 après traitement à la digoxine par rapport aux cellules témoins. (C) Les PBMCS ont été évaluées par un test MTT. Les données sont exprimées en moyenne + écart-type (n3) ; "P<0,05,"P<0,01, *P<0,01, par rapport au contrôle.

III.2.1.2. Digoxine induit l'apoptose des cellules

Dans l'article 4 : Les cellules ont été traitées avec ou sans 0,2 uM de digoxine pendant 24 h (IC50 était de 0,2 uM dans les cellules leucémiques K562 et THP-1) [.*, P<0,05 ; **<0,01 ; Con, contrôle], les résultats comme suit :

À partir la (fig. 28A) : La cytométrie en flux montre que le traitement à la digoxine stimule de manière significative **l'apoptose** des cellules leucémiques K562 et THP-1.

En revanche, dans l'article 5 : les cellules A549 et HI299 ont été traitées avec différentes doses de digoxine pendant 24 h [Les données sont exprimées en moyenne + SD (n=3). Moyenne + écart-type (n=3). P<0,05, *P0,01, par rapport au contrôle]. Les cellules apoptotiques ont été mesurées par coloration de l'annexine V/PI.

A partir la (Fig. 29A, B) : La cytométrie en flux montre que le traitement à la digoxine a induit l'**apoptose** des cellules A549. En revanche, il n'y avait pas de différence significative dans le nombre de cellules H1299 dans les quadrants supérieur et inférieur droit par rapport au groupe témoin après le traitement à la digoxine. C'est pourquoi, ils ont exploré les changements dans la MMP après un traitement à la digoxine en utilisant la sonde fluorescente JC-1 perméable à la membrane. Comme le montre la figure supplémentaire S1, la digoxine a diminué le potentiel de membrane mitochondriale des cellules A549, mais n'a pas eu d'effet évident sur les cellules H1299. Pour vérifier ces résultats, ils ont examiné les modifications des protéines liées à l'apoptose dans les cellules A549 et H1299 induites par la digoxine par Western blotting. La (fig. 29C) et la figure supplémentaire S5b montrent que le traitement par la digoxine a augmenté le clivage de la PARP dans les cellules A549. Cependant, il n'y a pas eu de changement significatif dans le niveau de clivage de la PARP dans les cellules H1299 par rapport au groupe témoin. Les résultats ci-dessus montrent que la digoxine peut induire l'apoptose dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299.

Alors, les deux articles donne même résultat (la digoxine a induit l'apoptose des cellules) avec des conditions différents, il n'y a qu'une différence dans la résultat supplémentaire tirée à l'article 5 (la digoxin n'induire pas l'apoptose dans les cellules H1299).

- Figures :

Article 4 :

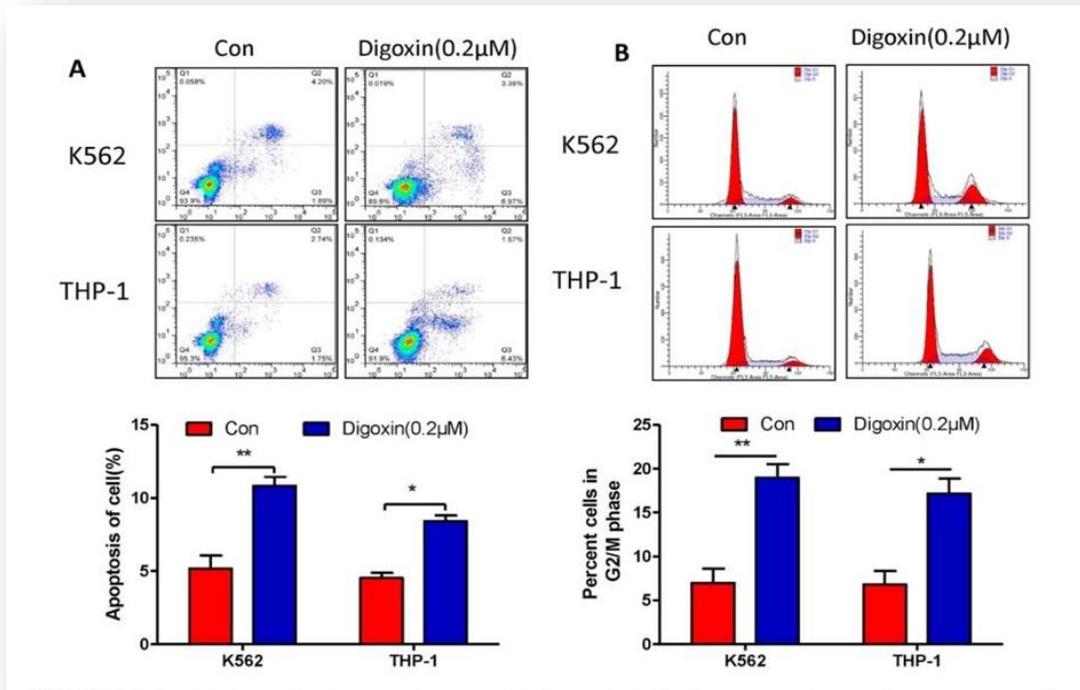


Fig. 28: La digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules leucémiques. A : La cytométrie en flux montre que le traitement à la digoxine stimule de manière significative l'apoptose des cellules leucémiques K562 et THP-1. B : La digoxine induit un arrêt du cycle cellulaire G2/M dans les cellules leucémiques. Les cellules ont été traitées avec ou sans 0,2 uM de digoxine pendant 24 h. *, P<0,05 ; **<0,01 ; Con, contrôle.

Article 5 :

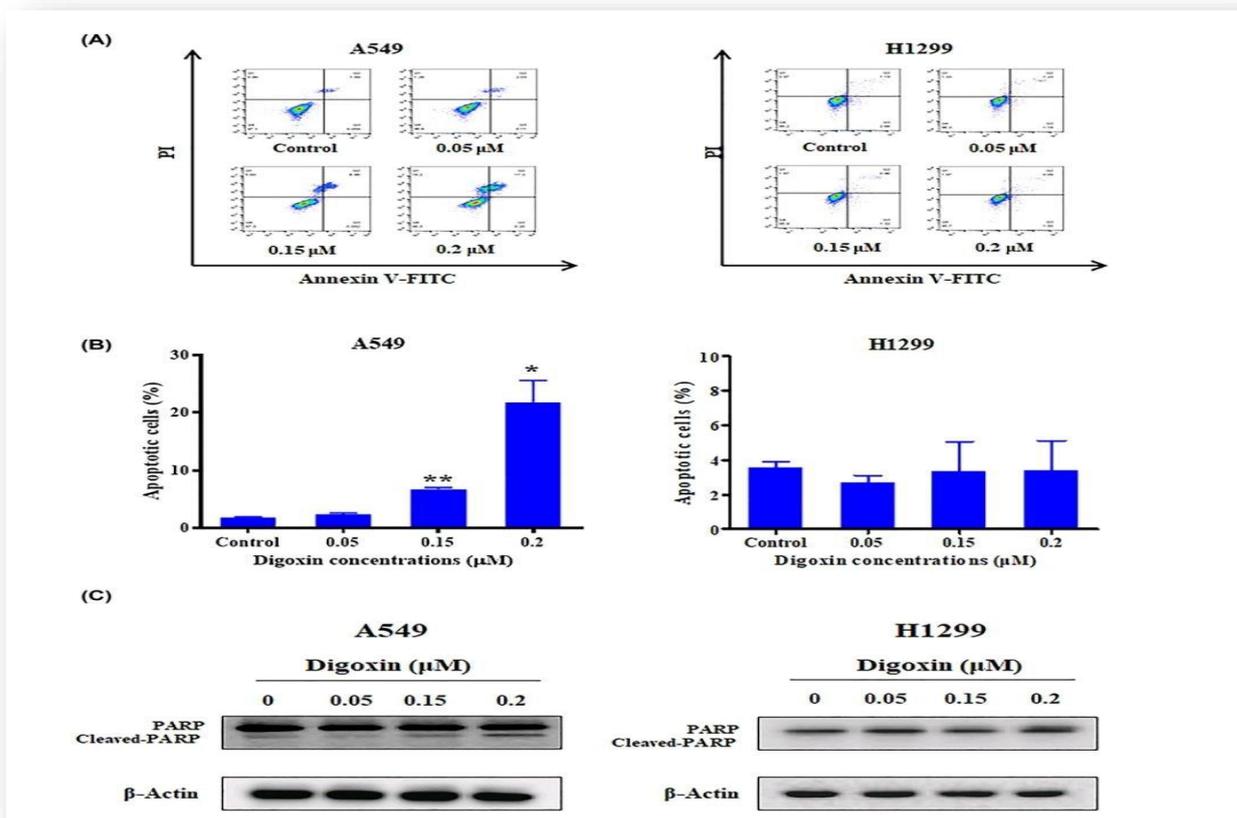


Fig. 29: La digoxine induit l'apoptose des cellules A549. (A) Les cellules A549 et H1299 ont été traitées avec différentes concentrations de digoxine pendant 24 heures, colorées avec de l'Annexin V-FITC et de la PI, puis mesurées à l'aide d'un cytomètre de flux. (B) Quantification des cellules apoptotiques. (C) Analyse par Western blotting des protéines indiquées dans les extraits cellulaires de A549. Dans des extraits cellulaires de cellules A549 et H1299 traitées avec différentes concentrations de digoxine pendant 24 h. Les données sont exprimées en moyenne + SD (n=3). Moyenne + écart-type (n=3). P<0,05, *P0,01, par rapport au contrôle.

III.2.1.3. Digoxine induit un arrêt du cycle cellulaire

Dans article 4 : Dans l'article 5 : Les cellules ont été traitées avec ou sans 0,2 uM de digoxine pendant 24 h (IC50 était de 0,2 uM dans les cellules leucémiques K562 et THP-1) [.*, P<0,05 ; **<0,01 ; Con, contrôle], les résultats comme suivant :

A partir la (fig. 30B): La digoxine induit un arrêt du cycle cellulaire G2/M dans les cellules leucémiques.

En revanche, dans l'article 4 : Les cellules A549 et H1299 ont été cultivées avec différentes concentrations de digoxine pendant 24 heures, et la distribution du cycle cellulaire a été détectée par cytométrie en flux, les résultats comme suit :

La (fig. 30A, B) : les populations cellulaires dans les phases G1 et G2/M étaient significativement plus élevées que celles du groupe témoin pour les cellules A549 et H1299, respectivement.

Pour déterminer comment la digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules de cancer du poumon aux cellules non petites, ils ont examiné l'expression des protéines liées à l'arrêt du cycle cellulaire par Western blotting :

La (fig. 31C) et la figure supplémentaire S5a montrent que l'expression de p27 a été régulée à la hausse tandis que les niveaux de cycline D1 ont été significativement régulés à la baisse dans les cellules A549 après le traitement à la digoxine. En outre, les cellules H1299 traitées à la digoxine ont montré une réduction significative de l'expression de Cde2 et de la cycline B1 de manière dose-dépendante.

Alors, les deux articles donnent même résultats (la digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules) dans des conditions différentes, mais l'article 5 nous a montré comment la digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules de cancer du poumon aux cellules non petites.

- Figures :

Article 4 :

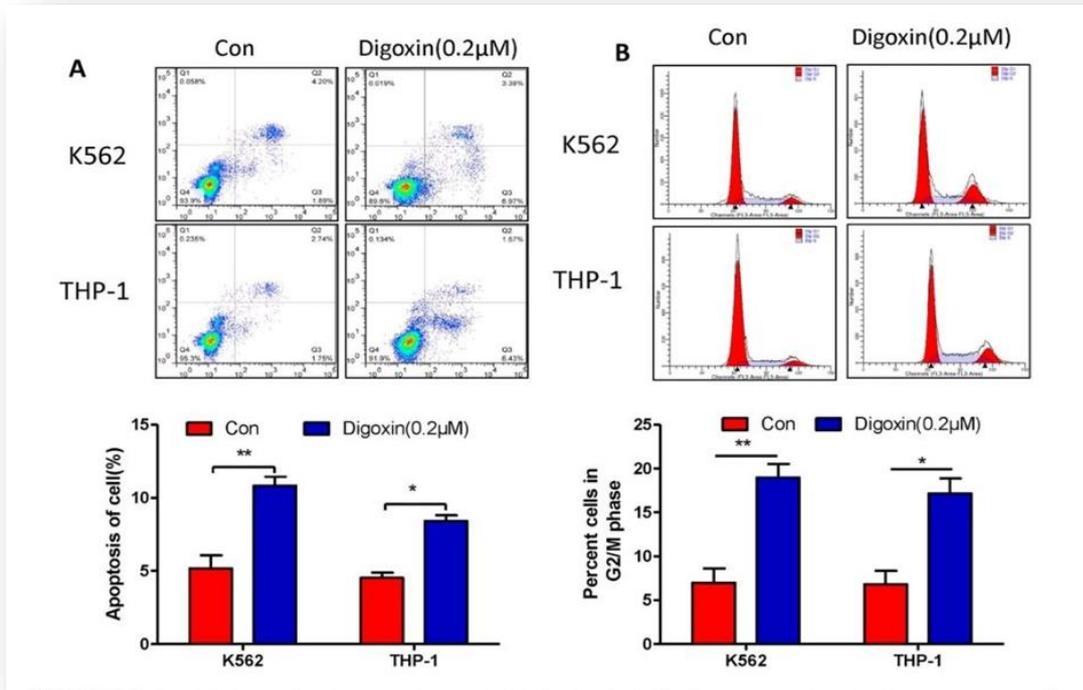


Fig. 30: La digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules leucémiques. A : La cytométrie en flux montre que le traitement à la digoxine stimule de manière significative l'apoptose des cellules leucémiques K562 et THP-1. B : La digoxine induit un arrêt du cycle cellulaire G2/M dans les cellules leucémiques. Les cellules ont été traitées avec ou sans 0,2 uM de digoxine pendant 24 h. *, P<0,05 ; **<0,01 ; Con, contrôle.

Article 5 :

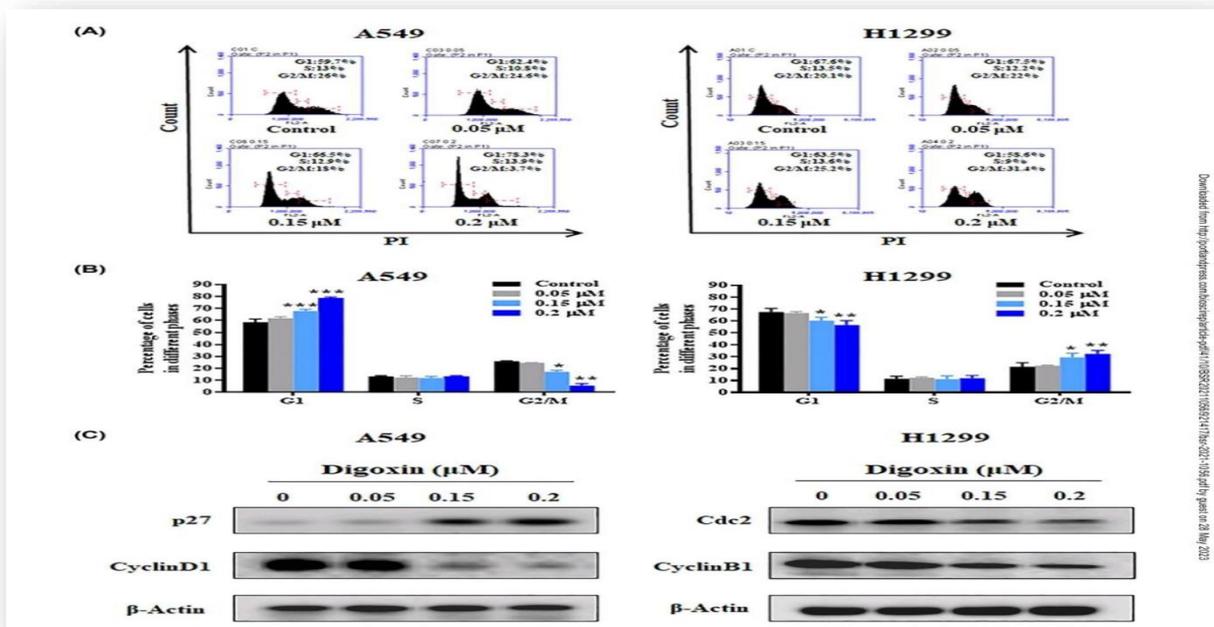


Fig. 31: La digoxine induit un arrêt des phases G1 et G2/M dans les cellules A549 et H1299, respectivement. (A) Les cellules A549 et H1299 ont été incubées avec différentes concentrations de digoxine pendant 24 heures, puis la distribution du cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie de flux. (B) Pourcentage de la population cellulaire en phases G1, S et G2M (C) Analyse par Western blotting des protéines liées au cycle cellulaire dans les cellules. Des protéines liées au cycle cellulaire dans les extraits cellulaires des cellules AS49 et H1299 traitées avec différentes concentrations de digaxine pendant 24 h. Les données sont exprimées en moyenne + SD (n=3) : "P<0,06, P<0,01, *P<0,01, par rapport au contrôle.

III.2.1.4. Digoxine bloque la voie PI3K/Akt/MTOR

Dans l'article 4: Pour déterminer comment la digoxine inhibe la viabilité des cellules leucémiques, ils ont examiné les effets de la digoxine sur la voie de signalisation Akt par Western blot. Étant donné que la signalisation Akt/mTOR activée joue un rôle important dans la leucémie et des études antérieures sur le cancer du poumon ont montré que l'inhibiteur de la Na+K+ATPase, la digoxine, peut inhiber la signalisation AktmTOR.

A partir de figure (32) et (33) :

Après le traitement des cellules leucémique avec la concentration indiquée de digoxine pendant 24h, puis soumises à une analyse par Western blot (fig. 32A), Les bandes de Western blot ont été analysées au densitomètre. *, P<0,05 ; **<0,01 ; Con,control (fig.32b). Les résultats montrent que Le traitement à la digoxine inhibe la signalisation Akt/mTOR d'une manière dépendante de la **concentration** dans les cellules leucémiques K562 et THP-1.

Après le traitement des cellules leucémique avec 0,2 uM de digoxine pendant la durée indiquée, puis soumises à une analyse par Western blot (fig.33A), Les bandes de Western blot ont été analysées au densitomètre. *, P<0,05 ; **<0,01 ; ***, P<0,001. Les résultats montrent que Le traitement à la digoxine inhibe la signalisation Akt/mTOR de manière **temporelle** dans les cellules leucémiques K562 et THP-1 (fig. 33A).

En revanche, dans article 5 : Ils utilisent les cellules NSCLC :

Après le traitement des cellules A549 et H1299 par les concentrations indiquées de digoxine pendant 24 h, puis les cellules ont été récoltées et les lysats cellulaires ont été préparés pour être disponibles pour l'analyse Western blot de p-Akt, Akt, mTOR, p-mTOR et p-P70S6K, les resultates comme suit :

La digoxine bloque la voie PI3K/Akt/mTOR dans les cellules A549 et H1299. (fig. 34)

Alors, les deux articles montrent que la digoxine inhibe la signalisation Akt/mTOR, mais l'article 4 nous a donné une information plus précise que l'article 5, qui est la manière d'inhibition (manière dépendante de la concentration et le temps), et l'article nous a également a ajouté que La digoxine bloque la voie PI3KJ.

- **Figures :**

Article 4 :

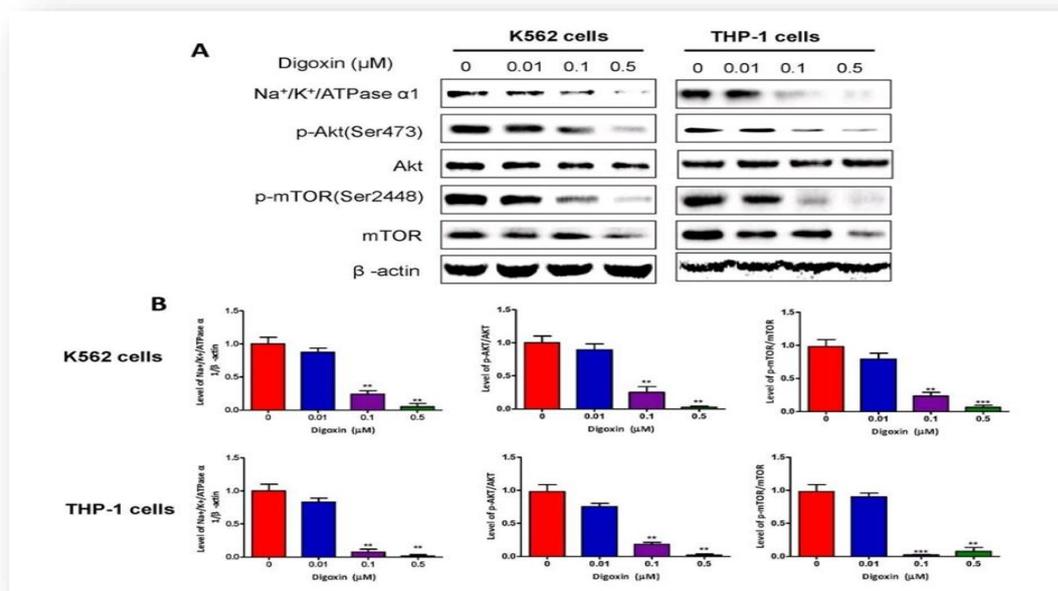


Fig. 32: La digoxine inhibe la voie Akt d'une manière dépendante de la concentration dans les cellules leucémiques. A : Le traitement à la digoxine inhibe la signalisation Akt d'une

manière dépendante de la concentration dans les cellules leucémiques K562 et THP-1. Les cellules ont été traitées avec la concentration indiquée de digoxine pendant 24h, puis soumises à une analyse par Western blot. B : Les bandes de Western blot ont été analysées au densitomètre. *, $P < 0,05$; ** $< 0,01$; Con, control.

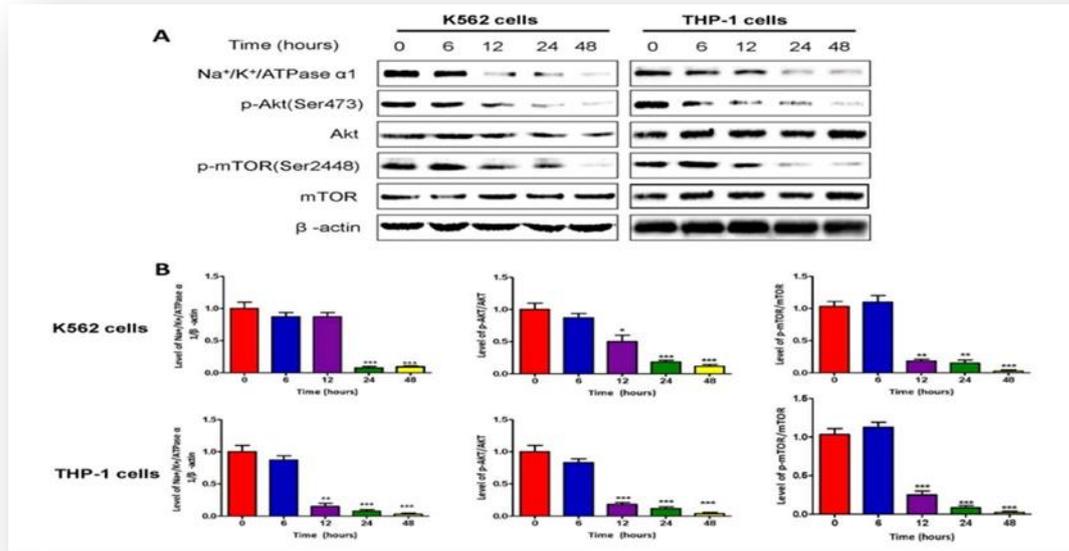


Fig. 33 : La digoxine inhibe la voie Akt d’une manière temps dépendante dans les cellules leucémiques. A : Le traitement à la digoxine inhibe la signalisation Akt de manière temporelle dans les cellules leucémiques K562 et THP-1. Les cellules ont été traitées avec 0,2 μM de digoxine pendant la durée indiquée, puis soumises à une analyse par Western blot. B : Les bandes de Western blot ont été analysées au densitomètre. *, $P < 0,05$; ** $< 0,01$; ***,

Article 5 :

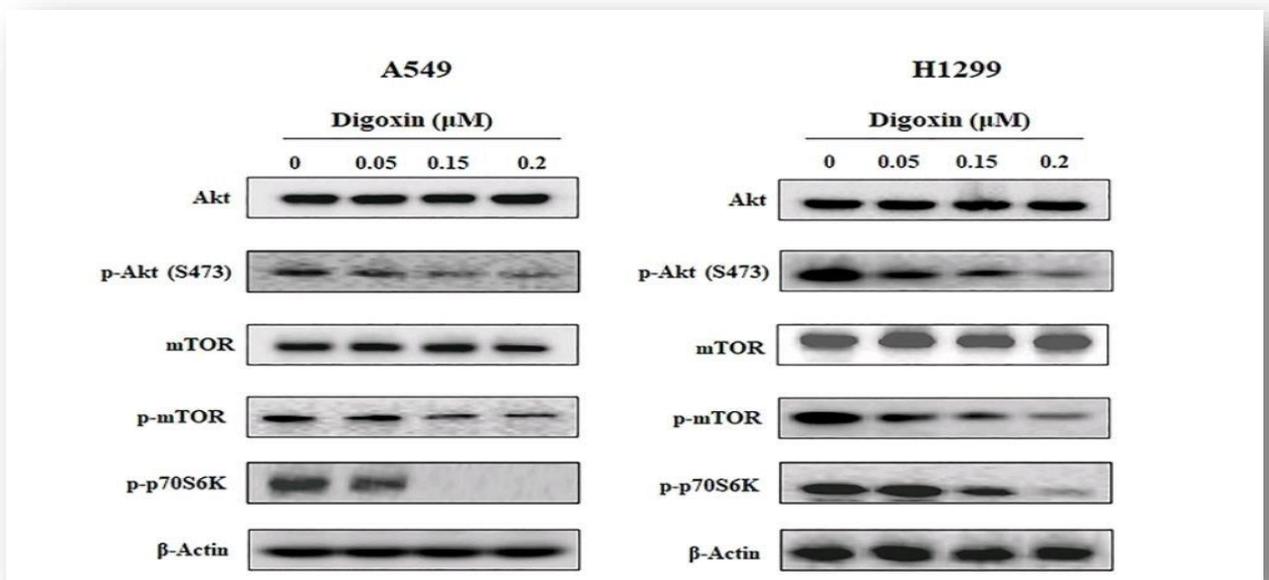


Fig. 34 : La digoxine bloque la voie PI3K/Akt/mTOR dans les cellules A549 et H1299. Les

cellules A549 et H1299 ont été traitées avec les concentrations indiquées de digoxine pendant 24 h, puis les cellules ont été récoltées et les lysats cellulaires ont été préparés pour être disponibles pour l'analyse Western blot de p-Akt, Akt, mTOR, p-mTOR et p-P70S6K.

III.2.2. Points différents

Article 4 :

III.2.2.1. Traitement à la digoxine active la signalisation UPR dans les cellules leucémiques

Premièrement, la digoxine est un inhibiteur de la Na⁺K⁺ATPase et l'étude montre que l'inhibiteur de la Na⁺K⁺ATPase peut activer la signalisation de l'UPR. Il est intéressant de noter que des études montrent que l'activation de la signalisation de l'UPR contribue à la chimiorésistance dans les cancers, y compris la leucémie

Dans cet article les cellules ont été traitées avec 0,1 uM de digoxine pendant 24h et ont ensuite été soumises à une analyse par Western blot. ***, P<0.001. Les bandes de Western blot ont été analysées au densitomètre.

Les résultats montrent que la digoxine augmente significativement la phosphorylation de PERK et IRE1 (Fig. 35A), ainsi que l'expression de XBP-1 dans les cellules leucémiques K562 et TPH-1 (Fig. 35B), ce qui suggère que la digoxine active la signalisation UPR dans les cellules leucémiques.

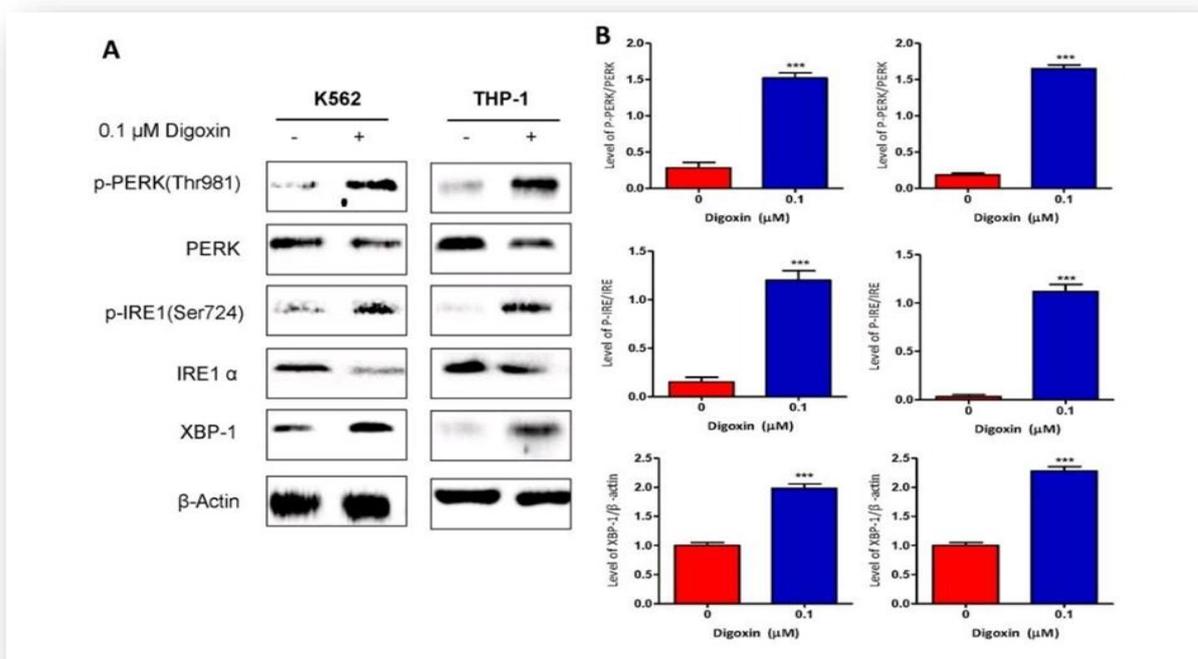


Fig. 35 : La digoxine active la voie UPR dans les cellules leucémiques. A : La digoxine augmente de manière significative la phosphorylation de PERK et IRE1, ainsi que l'expression de XBP-1 dans les cellules leucémiques K562 et TPH-1. B : Les bandes de Western blot ont été analysées au densitomètre. Les cellules ont été traitées avec 0,1 μ M de digoxine pendant 24h et ont ensuite été soumises à une analyse par Western blot. ***,

III.2.2.2. Traitement combiné de la digoxine et de l'inhibiteur de la signalisation UPR inhibe de manière synergique la croissance tumorale de la leucémie

- Effet de combinaison sur la de viabilité cellulaire

L'inhibiteur de la signalisation UPR GSK2606414 a diminué la viabilité des cellules leucémiques de manière dépendante de la concentration ; la valeur IC50 a été déterminée à 0,518 μ M.

Dans cet article : les cellules ont été traitées avec 0,1 μ M de digoxine et/ou 0,3 μ M de GSK2606414 pendant 24 heures, puis soumises à un test de viabilité cellulaire.

Les résultats montrent que le traitement combiné de digoxine et de « GSK2606414 » inhibe plus significativement la viabilité des cellules leucémiques que le traitement unique de digoxine ou de « GSK2606414 » (Fig. 36A).

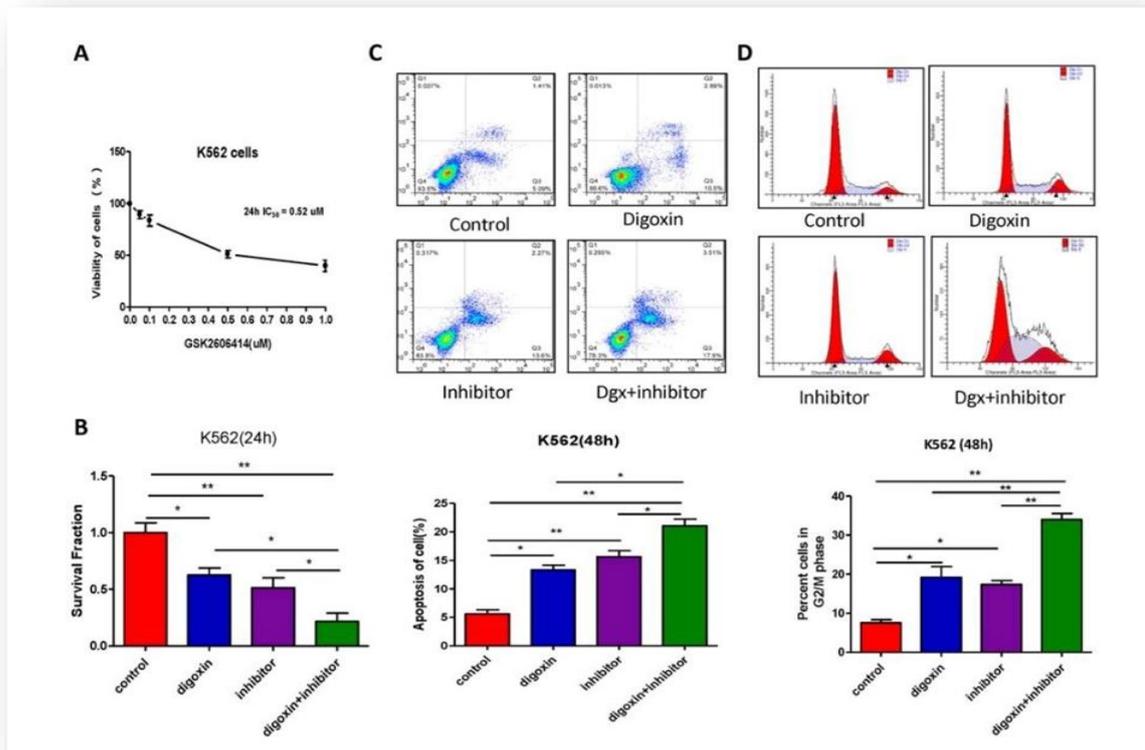


Fig. 36: La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de l'UPR inhibe de manière significative les cellules leucémiques. A : La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de la signalisation UPR GSK2606414 a inhibé de manière plus significative la viabilité cellulaire que le traitement unique de la digoxine ou du GSK2606414 dans les cellules leucémiques K562. Les cellules ont été traitées avec 0,1 uM de digoxine et/ou 0,3 uM de GSK2606414 pendant 24 heures, puis soumises à un test de viabilité cellulaire. B : La combinaison de digoxine et de GSK2606414 favorise de manière plus significative l'apoptose cellulaire que le traitement unique de digoxine ou de GSK2606414 dans les cellules de leucémie K562. C : La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de la signalisation UPR GSK2606414 supprime de manière plus significative le cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules leucémiques K562. Les cellules ont été traitées avec 0,1 uM de digoxine et/ou 0,3 uM de GSK2606414 pendant 48 h, puis soumises à une analyse de l'apoptose et du cycle cellulaire. Con, contrôle ; Dgx, Digoxine ; inhibiteur, GSK2606414 ; ", P < 0,05 ; **, P < 0,01 ; ***, P < 0,001

- **Effet de combinaison sur l'apoptose et le cycle cellulaire**

Dans cet article : les cellules ont été traitées avec 0,1 uM de digoxine et/ou 0,3 uM de GSK2606414 pendant 48 h, puis soumises à une analyse de l'apoptose et du cycle cellulaire. Con, contrôle ; Dgx, Digoxine ; inhibiteur, GSK2606414 ; ", P < 0,05 ; **, P < 0,01 ; ***, P < 0,001.

Les résultats : de façon similaire aux résultats de viabilité cellulaire, le traitement combiné de digoxine et de « GSK2606414 » a induit de façon plus significative l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules leucémiques que le traitement unique (Figs.37B et 37C).

Partie pratique

En outre, ils ont confirmé les résultats observés lors des expériences in vitro dans le modèle animal. Comme les résultats des expériences in vitro, le traitement combiné de la digoxine et du « GSK2606414 » a supprimé de manière plus significative la croissance de la tumeur leucémique que le traitement unique de la digoxine et du « GSK2606414 » (Fig. 38A et 38B).

De plus, l'analyse IHC (immuno histo chimique) de la protéine Ki-67, marqueur de la prolifération cellulaire (Fig. 38C) et l'analyse TUNEL montrent que le traitement combiné de digoxine et de « GSK2606414 » a supprimé de manière plus significative la prolifération cellulaire (Fig. 38C) et induit l'apoptose (Fig. 38D) dans le modèle de xéno greffe par rapport au traitement par un seul médicament.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le traitement combiné de la digoxine et de l'inhibiteur de la signalisation UPR supprime de manière plus significative la croissance tumorale de la leucémie en induisant de manière plus significative l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire.

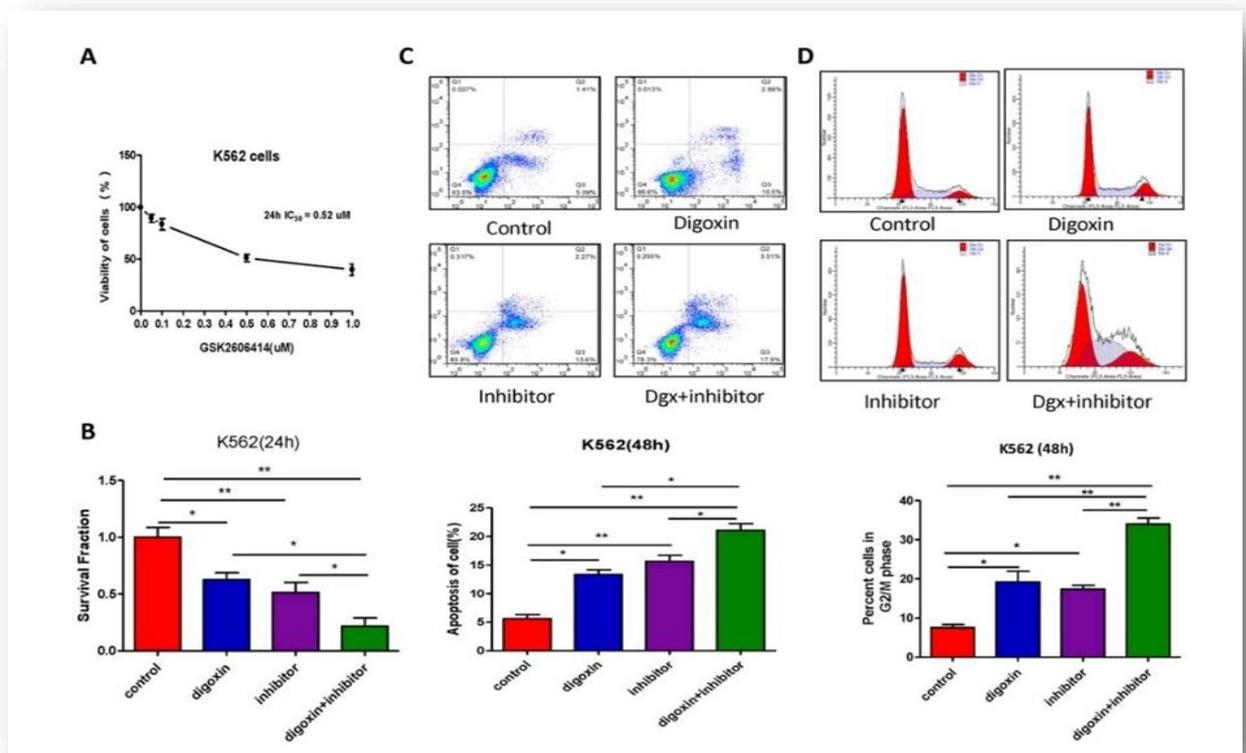


Fig. 37 : La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de l'UPR inhibe de manière significative les cellules leucémiques. A : La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de la signalisation UPR GSK2606414 a inhibé de manière plus significative la viabilité cellulaire que le traitement unique de la digoxine ou du GSK2606414 dans les cellules leucémiques

Partie pratique

K562. Les cellules ont été traitées avec 0,1 μ M de digoxine et/ou 0,3 μ M de GSK2606414 pendant 24 heures, puis soumises à un test de viabilité cellulaire. B : La combinaison de digoxine et de GSK2606414 favorise de manière plus significative l'apoptose cellulaire que le traitement unique de digoxine ou de GSK2606414 dans les cellules de leucémie K562. C : La combinaison de la digoxine et de l'inhibiteur de la signalisation UPR GSK2606414 supprime de manière plus significative le cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules leucémiques K562. Les cellules ont été traitées avec 0,1 μ M de digoxine et/ou 0,3 μ M de GSK2606414 pendant 48 h, puis soumises à une analyse de l'apoptose et du cycle cellulaire. Con, contrôle ; Dgx, Digoxine ; inhibiteur, GSK2606414 ; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$

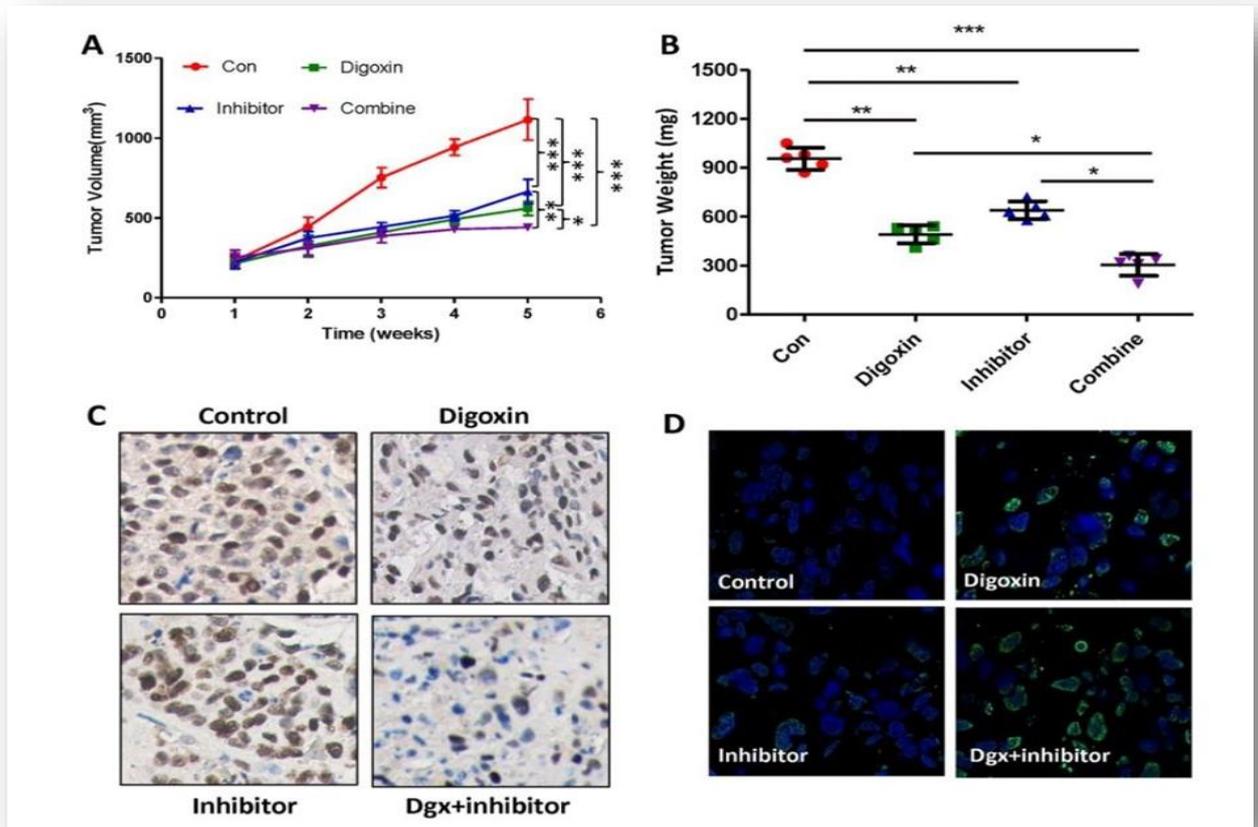


Fig. 38 : Le traitement combiné de la digoxine et de l'inhibiteur de l'UPR supprime de manière plus significative la croissance tumorale de la leucémie dans le modèle de xénogreffe. A : Le traitement combiné de la digoxine et du GSK2606414 a supprimé de manière plus significative la croissance tumorale que le traitement par un seul médicament dans le modèle de xénogreffe de cellules leucémiques K562. B : Le poids des tumeurs a été mesuré à la fin de l'expérience animale. C : La coloration immunohistochimique montre que le traitement combiné a supprimé de manière plus significative l'expression de Ki-67 par rapport au traitement par un seul médicament dans les tissus de xénogreffes. D : Le test TUNEL montre que le traitement combiné induit l'apoptose de manière plus significative que le traitement par un seul médicament dans les tissus de xénogreffes. Con, contrôle

Article 5 :

III.2.2.3. Digoxine a montré une activité anti métastatique sur les cellules A549 et H1299 du NSCLC qui était liée à l'inhibition de l'EMT

Dans cet article ils ont étudié l'activité anti métastatique in vitro de la digoxine, ils ont examiné l'effet sur la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules A549 et H1299 à l'aide de tests de migration, d'invasion et d'adhésion cellulaire Transwell, respectivement après traitement à la digoxine par rapport à ceux des cellules témoins. Les données sont exprimées en moyenne + SD (n-3). P0,06, *P<0,01, *P0,01, par rapport au contrôle. Les niveaux de E-cadhérine, ZEB1, Twist et Vimentine ont été détectés par analyse Western blot.

Nous commençons d'abord par l'activité anti métastatique :

- **La migration :**

Après un traitement de 24 heures des cellules A549 et H1299, le test de migration Transwell indiqué que la digoxine a inhibé la migration des cellules A549 et H1299 (fig. 39A). En outre, l'expérience de cicatrisation a donné un résultat similaire (fig. supplémentaire S2), ce qui indique que la digoxine a inhibé la migration des cellules A549 et H1 299 de manière dose-dépendante.

- **L'invasion**

Après traitement avec 0,02, 0,05 et 0,08 uM de digoxine, le nombre de cellules A549 et H1299 envahissant la membrane a été remarquablement réduit, indiquant que la digoxine pouvait bloquer l'invasion des cellules A549 et H1299 de manière dose-dépendante (Fig. 39A).

- **l'adhésion**

Après un traitement de 24 heures des cellules A549 et H1299 le nombre de cellules adhérant aux puits recouverts de fibronectine rendit de manière dose-dépendante (Fig. 39A).

Deuxièmement, par l'inhibition de l'EMT :

Afin de déterminer si la digoxine inhibe la motilité des cellules NSCLC par le biais de l'EMT, ils ont évalué l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux apparentés. Les analyses par Western blot ont montré que la digoxine a augmenté les niveaux d'expression des marqueurs mésenchymateux de la E-cadhérine tout en diminuant l'expression protéique des marqueurs de type mésenchymateux ZEB1, vimentine et Twist (fig. 39B et fig. supplémentaire S5c).

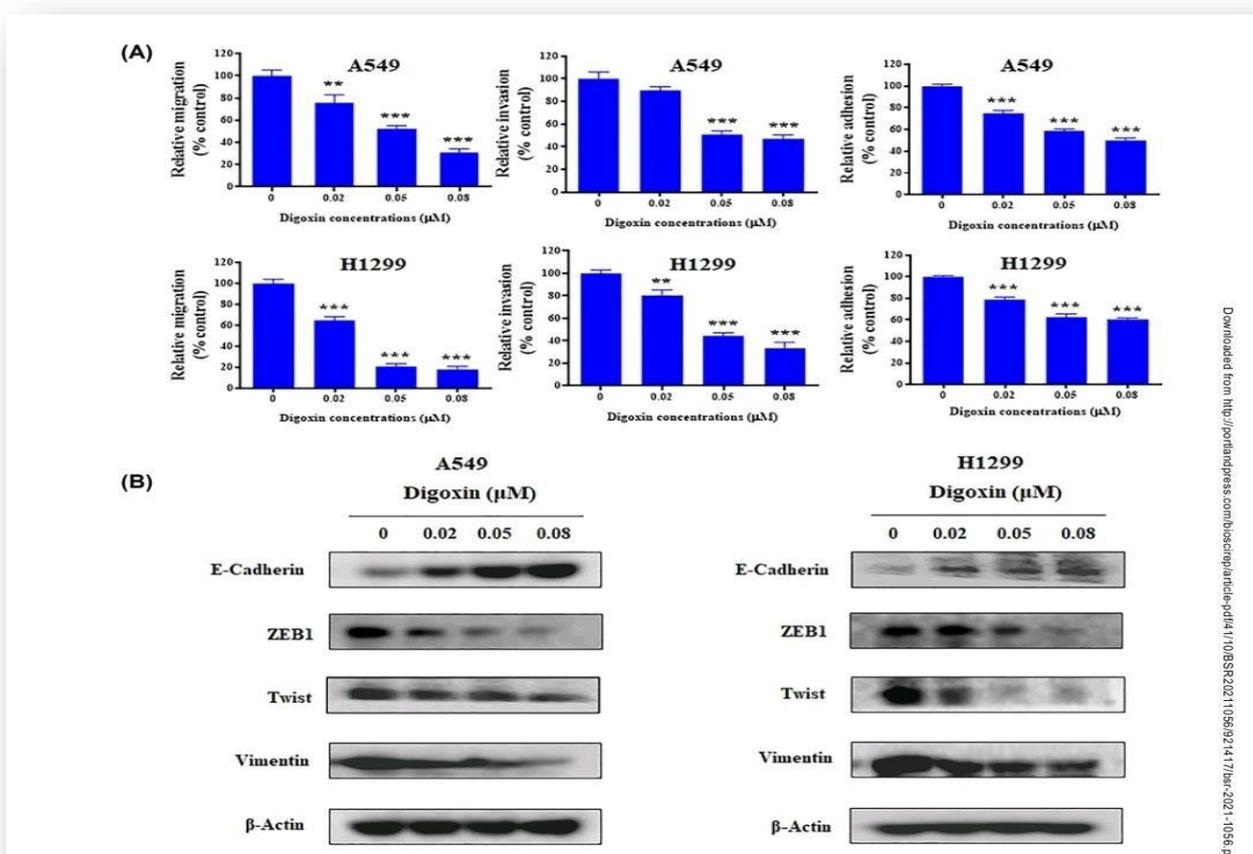


Fig. 39 : La digoxine inhibe la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules A549 et H1299 (A) Pourcentages de cellules AS49 et H1299 ayant migré, envahi ou adhéré après traitement à la digoxine par rapport à ceux des cellules témoins Les données sont exprimées en moyenne + SD (n-3). P0,06, *P<0,01, *P0,01, par rapport au contrôle. (B) Les niveaux de E-cadhérine, ZEB1, Twist et Vimentine ont été détectés par analyse Western blot

III.2.2.4. Digoxine induit l'autophagie dans les cellules NSCLC :

Dans cet article pour déterminer si la digoxine pouvait induire l'autophagie dans les cellules A549 et H1299, ils ont effectué une coloration MDC (c'est une substance autofluorescente qui s'accumule sélectivement dans les organites vésiculaires acides (AVOs) et est donc utilisé comme marqueur de l'autophagie) et évalué l'expression de LC3-II, Atg5 et p62 dans les cellules NSCLC par Western blotting.

Après coloration au MDC, les cellules A549 et H1299 traitées avec ou sans digoxine ont été observées au microscope à fluorescence. Comme le montrent la (fig. 40A) et la figure supplémentaire S6, le nombre de vacuoles autophagiques a augmenté dans ces lignées cellulaires de manière dose-dépendante après traitement par la digoxine, ce qui suggère que la digoxine a induit l'autophagie dans les cellules de NSCLC.

Partie pratique

En outre, l'expression des protéines marqueurs de l'autophagie, notamment LC3B II, p62 et Atg5, a été déterminée par analyse Western blot. Comme le montrent la (fig. 40B) et la (fig. supplémentaire S5d), après un traitement par la digoxine pendant 24 heures, la conversion de LC3B I en II et l'expression d'Atg5 ont augmenté, tandis que l'expression de p62 a diminué, ce qui démontre l'activité autophagique de la digoxine.

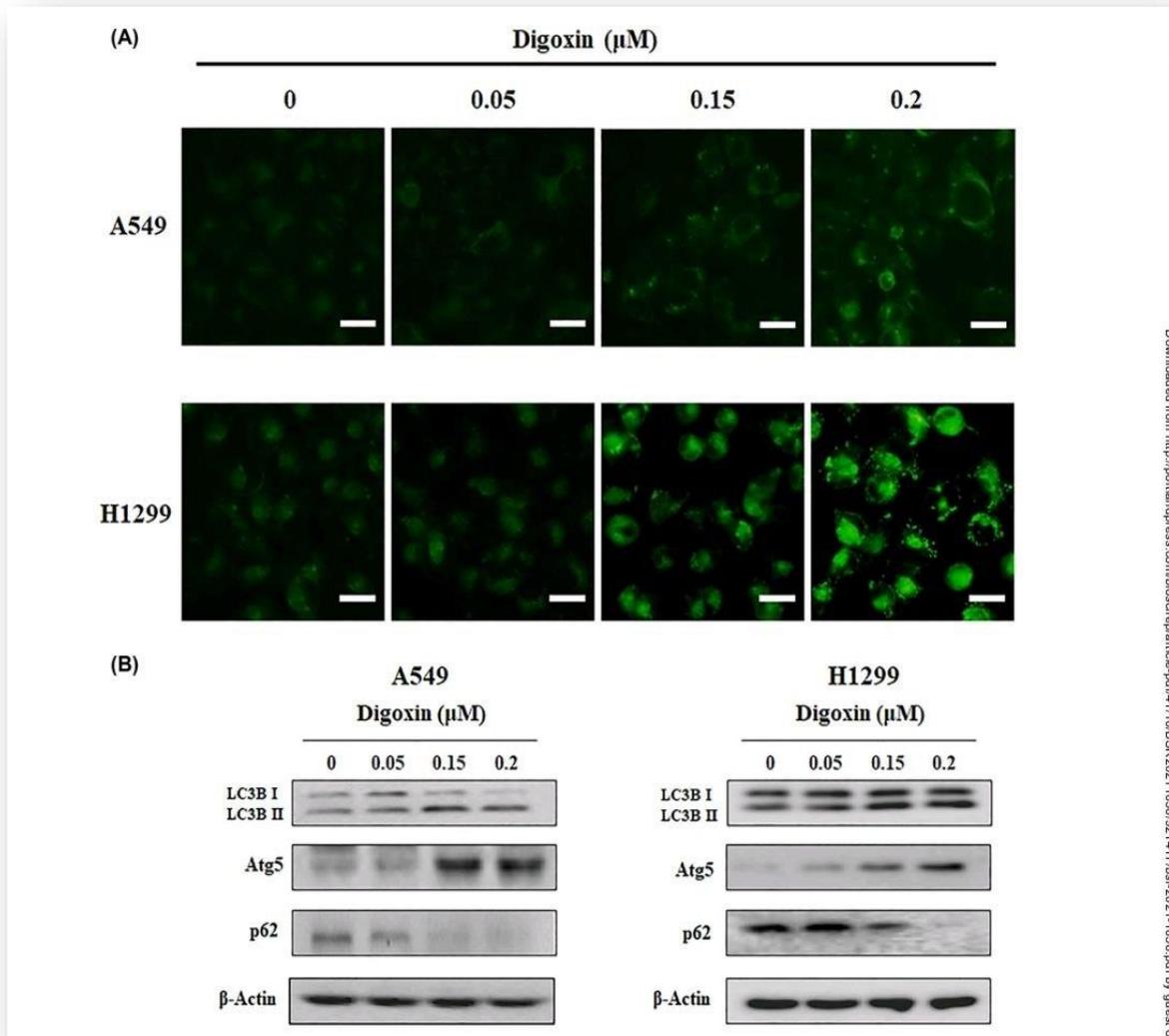


Fig. 40: La digoxine induit l'autophagie des cellules AS49 et H1299. (A) Les cellules A549 et H1299 ont été traitées avec les concentrations indiquées de digoxine pendant 24 heures, puis colorées avec le MDC. (B) Les niveaux de LC3B, Atg5 et p62 ont été détectés par le test de Western blot.

III.3.Résultats et discussions

La digoxine est un médicament de la classe des glycosides cardiaques, principalement utilisé pour le traitement des maladies cardiaques. Cependant, des études récentes ont mis en

évidence des effets potentiels de la digoxine dans le traitement du cancer. En particulier, son rôle dans :

III.3.1. Effet inhibiteur de la digoxine sur la variabilité des cellules leucémiques et la croissance des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules et des cellules mononucléaires du sang prophylactique

Nos résultats ont révélé que la digoxine a un effet inhibiteur significatif sur la variabilité des cellules leucémiques. Les cellules traitées à des concentrations croissantes de digoxine ont montré une diminution progressive de la variabilité génétique (fig.26BC, article 4), suggérant un effet stabilisateur sur le génome des cellules leucémiques.

De plus, la digoxine a également démontré un effet inhibiteur sur la croissance des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules. Les cellules cancéreuses exposées à la digoxine ont montré une diminution de la nombre des colonies formées (fig. 27B, article 5).

Les résultats de cette étude suggèrent que la digoxine peut avoir des propriétés inhibitrices sur la variabilité des cellules leucémiques, ainsi que sur la croissance des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules.

III.3.2. Digoxine induit l'apoptose des cellules leucémiques K562 et les cellules A549

Nos résultats (à partir de la comparaison de l'article 4 et 5) indiquent clairement que la digoxine induit l'apoptose des cellules leucémiques K562 et THP-1 de manière significative (fig. 28A, article 4). D'autre part l'étude sur les cellules A549 (une lignée de cellules de carcinome pulmonaire humain) était d'évaluer l'effet de la digoxine sur l'induction de leur l'apoptose (fig. 29, article 5). Pour ce faire, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de digoxine pendant une période de temps définie, et les changements associés à l'apoptose ont été évalués.

Ces résultats indiquent clairement que la digoxine est capable d'induire l'apoptose dans les cellules A549 et les cellules leucémiques K562 et THP-1 de manière significative. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et le contrôle de la croissance tumorale.

III.3.3. Digoxine induit l'arrêt du cycle cellulaire G2/M dans les cellules leucémique et induit l'arrêt des phases G1 et G2/M des cellules A549 et H1299

Dans cette étude (la comparaison entre article 4 et 5), nous avons évalué les effets de la digoxine sur le cycle cellulaire dans les cellules leucémiques ainsi que dans les lignées cellulaires A549 et H1299. Nous avons observé que la digoxine induit un arrêt du cycle

cellulaire en phase G2/M (fig. 30B, article 4) dans les cellules leucémiques, tandis qu'elle provoque un arrêt des phases G1 et G2/M dans les lignées cellulaires A549 et H1299 (fig. 31, article 5).

Pour déterminer ces effets, ils ont traité les cellules avec différentes concentrations de digoxine pendant une période donnée (article 4 et 5). Ils ont utilisé des techniques de cytométrie en flux, ils ont pu analyser le cycle cellulaire des populations cellulaires traitées.

Dans les cellules leucémiques, nous avons constaté qu'une exposition à la digoxine entraîne une accumulation significative de cellules en phase G2/M. Cela suggère que la digoxine interfère avec les mécanismes régulateurs du cycle cellulaire, provoquant ainsi un arrêt de la progression du cycle cellulaire à cette phase.

En ce qui concerne les lignées cellulaires A549 et H1299, nous avons observé un double effet de la digoxine. Tout d'abord, nous avons observé une réduction de la proportion de cellules en phase G1, indiquant un arrêt du cycle cellulaire à ce stade. De plus, nous avons également constaté une augmentation du pourcentage de cellules en phase G2/M, ce qui suggère un arrêt supplémentaire du cycle cellulaire à cette phase.

Les résultats de cette étude indiquent que la digoxine a un effet spécifique sur le cycle cellulaire dans différents types de cellules. Dans les cellules leucémiques, la digoxine provoque principalement un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Cela pourrait être attribué à une perturbation des mécanismes de régulation du cycle cellulaire, tels que l'activation de voies de signalisation spécifiques ou l'inhibition de kinases clés impliquées dans la progression du cycle.

Dans les lignées cellulaires A549 et H1299, les effets de la digoxine sont plus complexes. L'arrêt des phases G1 et G2/M suggère que la digoxine cible plusieurs points de régulation du cycle cellulaire dans ces cellules. L'arrêt en phase G1 peut être dû à une inhibition de l'entrée des cellules dans la phase S du cycle cellulaire, tandis que l'arrêt en phase G2/M peut être lié à une inhibition de la transition de la phase G2 à la phase M.

III.3.4. Effets de la digoxine sur les voies Akt et PI3K/Akt/mTOR dans les cellules leucémiques et les cellules A549 et H1299 :

Dans notre étude, nous avons comparé les expériences des articles 4 et 5 pour les effets de la digoxine sur la voie Akt dans les cellules leucémiques (article 4) et les cellules A549 et H1299 (article 5). Ils ont effectué des expériences in vitro en traitant les cellules avec la

concentration indiquée de digoxine pendant 24h (fig. 32A, article 4), et d'autre part en traitent les cellules avec 0,2 uM de digoxine pendant la **durée** indiquée (fig.33A, article 4).

Dans les cellules leucémiques, a partir la (fig.32A, article 4) et la (fig. 33A, article 4) nous avons observé que la digoxine inhibe la signalisation Akt/mTOR. De plus, cette inhibition était corrélée avec le temps d'exposition à la digoxine (fig. 33A) et leur concentration (fig.32A), montrant une relation temps-dépendante, dose-dépendante.

Dans les cellules A549 et H1299, a partir la (fig. 34, article 5) nous avons également observé une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR suite au traitement à la digoxine. La phosphorylation d'Akt a été inhibée par la digoxine, ce qui suggère une inhibition de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR.

Les résultats de ces articles démontrent que :

L'inhibition de la voie Akt par la digoxine dans les cellules leucémiques suggère un potentiel thérapeutique pour le traitement de la leucémie. La voie Akt est impliquée dans la survie des cellules leucémiques et son inhibition pourrait conduire à l'apoptose des cellules cancéreuses.

De même, le blocage de la voie PI3K/Akt/mTOR dans les cellules A549 et H1299 par la digoxine suggère une possible utilisation de ce médicament dans le traitement du cancer du poumon. Cette voie de signalisation est fréquemment dysrégulée dans le cancer du poumon et son inhibition pourrait supprimer la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses.

III.3.5. Traitement à la digoxine active la signalisation UPR dans les cellules leucémiques soit seul ou bien combine avec l'inhibiteur de la signalisation UPR GSK2606414

Nous avons observé (a partir de l'article 4) une augmentation dose-dépendante et significativement la phosphorylation de PERK et IRE1 (Fig. 35A), ainsi que l'expression de XBP-1 dans les cellules leucémiques K562 et TPH-1 (Fig. 35B), après traitement des cellules leucémiques avec la digoxine (fig. 35). De plus, le traitement combiné de la digoxine et du GSK2606414 a montré des effets synergiques, inhibant de manière significative l'apoptose et le cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules leucémiques (même résultat pour le modèle de xénogreffe (fig. 36C).

Nos résultats (a partir l'article 4) suggèrent que la digoxine active la signalisation UPR dans les cellules leucémiques, ce qui conduit à une augmentation de l'apoptose. L'UPR est une voie de signalisation complexe qui peut favoriser la survie ou la mort cellulaire en fonction du contexte cellulaire. Dans le cas de la leucémie, une augmentation de l'apoptose est souhaitable

pour éliminer les cellules cancéreuses. En combinant la digoxine avec l'inhibiteur de l'UPR, le GSK2606414, nous avons observé une inhibition synergique de l'apoptose et du cycle cellulaire. Cette combinaison thérapeutique pourrait représenter une approche prometteuse pour le traitement.

III.3.6. Digoxine possède une activité anti métastatique sur les cellules A549 et H1299 du NSCLC qui était liée à l'inhibition de l'EMT et induit l'autophagie dans les cellules NSCLC

D'après article 5: Les résultats ont montré que la digoxine avait une activité anti-métastatique en inhibant le processus d'épithélium-mésenchyme (EMT) (fig. 39). De plus, la digoxine a également été observée pour induire l'autophagie (fig. 40), un processus cellulaire de recyclage et de dégradation des composants cellulaires, dans les cellules NSCLC.

Le résultat de ce dernier montre que la digoxine inhibe la motilité des cellules NSCLC par le biais de l'EMT, l'EMT est un processus biologique par lequel les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques de migration, l'invasion et l'adhésion, favorisant ainsi la formation de métastases. En inhibant l'EMT, la digoxine pourrait contribuer à réduire la propagation du cancer et à limiter la formation de métastases dans les cellules A549 et H1299.

De plus, l'induction de l'autophagie par la digoxine dans les cellules NSCLC est également un aspect important de cette étude. L'autophagie est un processus cellulaire qui peut avoir des effets contradictoires sur la progression tumorale. Dans certains cas, l'autophagie peut supprimer la croissance tumorale en éliminant les composants cellulaires endommagés ou indésirables, tandis que dans d'autres cas, elle peut favoriser la survie des cellules cancéreuses.

Finalement, ces observations ouvrent la voie à de nouvelles recherches sur l'utilisation potentielle de la digoxine en tant qu'agent thérapeutique dans le traitement du cancer.

Conclusion

Les plantes médicinales de la famille des digitaliques, avec leurs principes actifs, les glycosides cardiotoniques, jouent un rôle important dans le traitement des affections cardiaques. La plante la plus connue de cette famille est la Digitale laineuse qui contient la digoxine. Mais malheureusement elles ont un index thérapeutique étroit, ce qui signifie que la marge entre une dose efficace et une dose toxique est mince et leur utilisation doit être strictement contrôlée par un professionnel de la santé.

Les nouvelles recherches précliniques sur les plantes médicinales, notamment la digitale, et leur relation avec le cancer offrent des perspectives prometteuses pour la médecine moderne. La digitale (la digoxine) a longtemps été utilisée pour traiter des problèmes cardiaques, mais des études récentes ont révélé son potentiel dans la lutte contre le cancer.

D'autre part, d'autres articles qui nous comparent (in vivo et vitro) les études précliniques suggèrent que la digoxine peut inhiber la croissance tumorale, induire l'apoptose des cellules cancéreuses et réduire la vascularisation des tumeurs. De plus, certains mécanismes d'action proposés impliquent la modulation de voies de signalisation clés dans la progression tumorale.

En conclusion, notre étude bibliographique sur l'utilisation de la digoxine dans les essais précliniques suggèrent que la digoxine pourrait être un candidat intéressant pour de futures études cliniques dans le traitement du cancer à cause de leur mécanismes contre les cellules cancéreuses, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre son mécanisme d'action, son efficacité et son potentiel thérapeutique réel. D'autre part, ces études offrent une base solide pour la poursuite des investigations et pour l'exploration de nouvelles approches thérapeutiques dans la lutte contre le cancer.

En tant que pharmaciens, nous encourageons nos collègues, qu'ils soient des médecins ou pharmaciens à essayer de faire des comparaisons entre les nouveaux articles.

Référence bibliographique

[1]: Effets secondaires des médicaments anticancéreux en milieu hospitalier de Bamako, 2009
Thèse disponible sur : <https://www.keneya.net/fmpos/theses/2010/med/pdf/10M91.pdf>

[2]: Alimentation et prévention du cancer (2019) VIDAL. Available at:
<https://www.vidal.fr/sante/nutrition/alimentation-problemes-sante/alimentation-prevention-cancer.html> (consulte le 09 Juin 2023).

[3]: Wolf H. Fridman , Catherine Sautès-Fridman / Med Sci (Paris) 2014 ; 30 : 359–365

[4]: Tumeurs du cerveau - cancer info. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/content/download/144827/1809470/file/Tumeurs-du-cerveau_2010.pdf (consulte le 10 July 2023).

[5]: Suhail, Y., Cain, MP, Vanaja, K., Kurywchak, PA, Levchenko, A., & Kalluri, R. (2019). Biologie systémique des métastases cancéreuses. *Systèmes cellulaires* , 9 (2), 109-127.

[6]: van Zijl, F., Krupitza, G. et Mikulits, W. (2011). Étapes initiales de la métastase : invasion cellulaire et transmigration endothéliale. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* , 728 (1-2), 23-34.

[7]: Mittal, V. (2018). Transition mésenchymateuse épithéliale dans les métastases tumorales. *Revue annuelle de pathologie : mécanismes de la maladie* , 13 , 395-412.

[8] : Gérard, L. (no date) ‘Quelques notions d’actualité en cancérogenèse’, in *Cancer et travail. Comprendre et agir pour éliminer les cancers professionnels*, pp. 15–25.

[9]: Understanding cancer: Hallmarks of cancer – CCRA. Disponible sur: <https://www.ccr-acrc.ca/wp-content/uploads/2020/08/Understanding-Cancer-Hallmarks-of-Cancer.pdf>
(Consulte: 21 Juin 2023).

[10]: Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

[11] : professional, C.C. medical Carcinoma: Types, treatment & what it is, Cleveland Clinic. Disponible sur: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/23180-carcinoma> (consulte le 10 juin 2023).

[12]: Birmingham, J. A., Moroz, V., Marec-Berard, P., Gaspar, N., Laurence, V., Martin-Broto, J., ... & Brennan, B. (2019). International Randomised Controlled Trial for the Treatment of Newly Diagnosed Ewing Sarcoma Family of Tumours–EURO EWING 2012 Protocol.

[13]: Les cancers du sang ou cancers Hématologiques, Institut Curie. Disponible sur: <https://curie.fr/dossier-pedagogique/les-cancers-du-sang-ou-cancers-hematologiques>. (Consulter: 5 juin 2023).

[14] : cer?disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Types-et-stades-des-cancers>. Consulter le 30 Décembre 2022

[15] : Les types de cancers Accueil. Disponible sur: <https://www.cancer.be/le-cancer/jeunes-et-cancer/les-cancers/les-types-de-cancers>. Consulter le 29 Avril 2023

[16] : fondation pour la recherche sur le cancer. Cancer : les facteurs de risque (<https://www.fondation-arc.org/cancer/facteurs-risque-cancer>). Dernière mise à jour: 23-02-2023

[17]: Cancer .World Health Organization. Disponible sur: <https://www.who.int/health-topics/cancer> Consulter le 22 Mai 2023).

[18]: Fridman, W. H., & Sautès-Fridman, C. (2014). Le microenvironnement tumoral-Matrice nourricière, champ de bataille et cible thérapeutique des cancers. *médecine/sciences*, 30(4), 359-365.

Chapitre 17 Item 287 – UE 9 – Facteurs de risque, prévention et dépistage des cancers

[19]: Brochure : Le cancer. Disponible sur: <https://www.fondation-arc.org/support-information/brochure-le-cancer> (consulte le 9 juin 2023)

[20]: Gale, R.P. (2023) Diagnostic du cancer - cancer, Manuels MSD pour le grand public. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/cancer/pr%C3%A9sentation-des-cancers/diagnostic-du-cancer>. (consulter le 12 juin 2023).

[21]: Deyra, M. (2022) Conceptions et systèmes de conceptions d'enfants âgés de 6 à 11 ans portant sur les déterminants de la santé et du cancer, Accueil - Archive ouverte HAL.: Disponible sur : <https://hal.science/tel-03349491v2>. 2021

[22]: New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018 | UICC. (consulter le 5 janvier 2023)

[23] Le Matin d'alger 'L'Algérie compte près de 480 000 malades du cancer'. (Consulté le 7 Janvier 2023). Disponible sur: <https://www.lematindz.net/news/23236-lalgerie-compte-pres-de-480-000->

[24] : Etude de la toxicité cardiaque des médicaments anti-cancéreux, 2011 These disponible sur : https://theses.hal.science/tel00938753/file/these_A_RICHARD_Carole_2011.pdf

[25]: Antoni, D., Bockel, S., Deutsch, É., & Mornex, F. (2016). Radiothérapie et thérapies ciblées/immunothérapie. *Cancer/Radiothérapie*, 20 (6-7), 434-441.

[26]: Vial, N., Vallard, A., Jmour, O., Rehailia-Blanchard, A., Mrad, M. B., Trone, J. C., ... & Magné, N. (2019). Innovations en radiothérapie: un regard sur 2018. *Bulletin du Cancer*, 106(1), 48-54.

[27] : Hennequin, C., & Mazon, J. J. (2013). *Radiobiologie de la curiethérapie*. *Cancer/Radiothérapie*, 17(2), 81-84.

[28] : R.gervais – G willoquet avec la colloboration de marc talbert « guide pharmaco » 12 eme edition p 319

[29]: FAURE, Sébastien. *Anticancéreux cytotoxiques*. *Actualités pharmaceutiques*, 2010, vol. 49, no 497, p. 51.

[30]: Marion, A. Alkylants, *Pharmacomédicale.org*. Available at: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/alkylants#> (Consulter le 29 Mai 2023)

[31]: Apache2 debian default page: It works. disponible sur : <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille11/TECTHERCANCERS.htm> (consulter: le 29 Mai 2023)

[32] : Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines.2010

These disponible sur le site : <https://theses.hal.science/tel-00703474/document>. (Consulter le 29 Mai 2023)

[33]: What are antimetabolite medicines for cancer? WebMD. Disponible sur: <https://www.webmd.com/cancer/antimetabolite-medications-overview>. (Consulter le 29 Mai 2023).

[34] : Synthèses et évaluations biologique d'agents alkylants hétérocycliques, 2008 These disponible sur:

<https://aurore.unilim.fr/theses/nxfile/default/deb2da7c-7663-4781-9819ad2cf07f19ac/blobholder:0/2008LIMO4055.pdf>

[35] : Les antimétabolites ARCAGY. Disponible sur: <https://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/traitements-systemiques/chimiotherapie/les-medicaments/les-antimetabolites.html/>

[36] : Author links open overlay panelSébastien Faure (2010) *Anticancéreux cytotoxiques*, *Actualités Pharmaceutiques*. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0515370010707308>

[37]: *Immunothérapie Accueil*. Disponible sur: <https://www.cancer.be/les-cancers/traitements/immunoth-rapie>. (Consulter le 3 Mai 2023)

[38]: Kayashima, H., Toshima, T., Okano, S., Taketomi, A., Harada, N., Yamashita, YI, ... & Maehara, Y. (2010). L'immunothérapie néoadjuvante intratumorale utilisant l'IL-12 et les cellules dendritiques est une stratégie efficace pour contrôler la récurrence du carcinome hépatocellulaire murin chez les souris immunodéprimées. *Le Journal of Immunology* , 185 (1), 698-708

[39]: What is immunotherapy? (2022) Cancer.Net. Disponible sur: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/what-immunotherapy>

[40]: Antoni D, Bockel S, Deutsch E, Mornex F. Radiothérapie et thérapies

ciblées/immunothérapie. *Cancer/Radiothérapie*. 1 oct 2016 (consulté le 06 Janvier 2023);20(6):434-41. Disponible sur:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1278321816303602>

[41]: Lee, S. Immunothérapie, Société canadienne du cancer. Disponible sur: <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/immunotherapy> Consulté le 31 mai 2023

[42]: Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy (no date) Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy - Creative Biolabs. Disponible sur: <https://www.creative-biolabs.com/immuno-oncology/chimeric-antigen-receptor-car-t-cell-therapy.htm>. (consulté le 01 juin 2023)

[43] : La Thérapie Cellulaire Car-t, une forme d'immunothérapie en plein essor (1970) Global Biopharmaceutical Company - Bristol Myers Squibb. Disponible sur: <https://www.bms.com/fr/media/life-and-science/science/cancer-therapie-cellulaire-car-t-forme-immunotherapie-en-plein-essor>. (Consulté le 01 juin 2023)

[44]: Iaso cancer (no date) IASO Cancer – Immuntherapien gegen Krebs. Disponible sur: <https://iaso-cancer.com/fr/therapie-cellulaire-dendritique-tcd/>

[45]: Therapeutic Cancer Vaccines. *Nature reviews cancer*, Disponible sur: <https://sci-hub.st/10.1038/s41568-021-00346-0>.

[46] : Les Thérapies notes d'analyse Ciblées dans le traitement. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/content/download/161182/2059278/file/Les-therapies-ciblees-dans-le-traitement-du-cancer-en-2015_Note-d-analyse-2016.pdf

[47] : Cancer, I.N.D. Thérapies Ciblées : Modes d'action, Thérapies ciblées : modes d'action - Thérapies ciblées et immunothérapie spécifique. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie-specifique/Therapies-ciblees-modes-d-action> (consulté : le 6 Juin 2023)

[48]: collège national des enseignants en cancérologie (CNEC) Ouvrage coordonné par le Pr Philippe Giraud et le Pr Jean Tredaniel *Cancérologie*, 2ème Edition actualisée 13 août 2019

[49] : Faure, S. (2015). Thérapies ciblées anticancéreuses (1/2). Actualités pharmaceutiques, 54(546), 57-61.

[50] : Cancérologie-collection medicine KB-audrey bellesoeur et al 2013 (p140), Modèle 10

[51]: J. Calot, S. Limat, C. Fernandez,G. Aulagner. Pharmacie clinique, pratique en oncologie. 4e édition. 2012..Chapitre 5 thérapeutique du cancer, p35,1336 pages .Elsevier Masson2016.

[52]: Gallon, É. (2012). Cancer du sein et sentiment de guérison: impact de l'hormonothérapie lors de l'après-cancer chez la femme ménopausée (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).

Disponible sur :https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=GALLON

[53]: Hormone therapy for cancer National Cancer Institute.Disponible sur: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy#how-hormone-therapy-is-used-against-cancer>. (consulter le 15 Mai 2023)

[54]: Vuillet-A-Ciles, H., Lagarde, A., & Buxeraud, J. (2014). L'hormonothérapie anticancéreuse. Actualités Pharmaceutiques, 53(540), 25-29.

Disponible sur :

[55]: Bellesoeur, A., Cabel, L., Hutt, É., & Moustarhfir, M. (2013). Cancérologie. Éditions Vernazobres-Gregio.disponible sur : <https://sci-hub.st/10.1016/j.actpha.2014.09.006>

[56]: Cancer, I.N.D. (no date a) Différents types d'hormonothérapie, Différents types d'hormonothérapie - Hormonothérapie. Available at: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Hormonotherapie/Differents-types-d-hormonotherapie>. (Consulté le 3 Juin 2023)

[57] : L'hormonothérapie - cancer de La Prostate (2023) PROCURE. Disponible sur: <https://www.procure.ca/cancer-de-la-prostate/options-de-traitements/hormonotherapie>. (Consulte le 3 Juin 2023)

[58] : Hauptman, PJ, & Kelly, RA (1999). Digitale. Circulation , 99 (9), 1265-1270.

[59]: Laurent, C. Digitaliques, Pharmacomédicale.org. Disponible sur :

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/digitaliques>

(Consulte: 17 Jun 2023).

[60] : Bianca , H. (2016) Les Digitaliques, Herzklappenhilfe. Disponible sur:

<https://www.valves-cardiaques.ch/pour-les-patients/service/conseils/les-digitaliques/>

(Consulte: 17 June 2023).

[61] : DEA, D. D. E. A., & DE, M. P. L. O. Evaluation de l'activité cardiotonique du desantyl-tanginine chez le COBAY , 2014

These disponible sur :

http://biblio.univantanarivo.mg/pdfs/ratovonarindraKanto_M2_14.pdf

[62] :Haux, J. (1999). La digitoxine est un agent anticancéreux potentiel pour plusieurs types de cancer. *Hypothèses médicales* , 53 (6), 543-548.).

[63]: A Structural View on the Functional Importance of the Sugar Moiety and Steroid Hydroxyls of Cardiotonic Steroids in Binding to Na,K-ATPase - Scientific Figure on ResearchGate. Disponible sur:

https://www.researchgate.net/figure/Two-dimensional-structure-of-digoxigenin-associated-with-D-digitoxose-sugars-used-in_fig1_235363806 [consulte 17 Juin, 2023]

[64] : (Pharmacopée européenne 6 ème edition TOME P-1) Centre national d'information sur la biotechnologie (2023). Résumé des composés PubChem pour CID 441207, Digitoxin. [consulte le 05Mai 2023] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Digitoxin> .

[65]: Digoxin National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Digoxin> (consulte le 5 Mai 2023).

[66] : (Digoxine) masse molaire ChemicalAid. Disponible sur :

<https://www.chemicalaid.com/tools/molarmass.php?formula=C41H64O14&hl=fr> (Consulte le 19 Jun 2023)

[67]: ESTIMATION DE LA POSOLOGIE OPTIMALE DE LA DIGOXINE AL'AIDE D'UNPROGRAMME DE MODELISATION PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION 1995. these disponible sur : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02117869/document>

[68]: Gheorghiade, M., Adams Jr, KF et Colucci, WS (2004). La digoxine dans la prise en charge des troubles cardiovasculaires. *Circulation* , 109 (24), 2959-2964.

[69] : Impact des antibiotiques céfprozil et céfoxitine sur le microbiote *Eggerthella lenta*, lié au métabolisme du cardiotonique digoxine Par Jérémie Auger, Décembre, 2018 Disponibles sur :<file:///C:/Users/dell/Desktop/Article%20chaphore%202%20N05.pdf>).

[70]: Ayoub Bensakhria et al. (2018) Les digitaliques " Analytical toxicology, Analytical Toxicology. Disponible sur: <https://analyticaltoxicology.com/les-digitaliques/> (consulte le 22 juin 2023).

[71]: Delprat, B., Bibert, S., & Geering, K. (2006). Les protéines FXYD: nouveaux régulateurs de la Na, K-ATPase. *médecine/sciences*, 22(6-7), 633-638.

[72]: Clausen, MV, Hilbers, F. et Poulsen, H. (2017). La structure et la fonction des isoformes Na, K-ATPase dans la santé et la maladie. *Frontières en physiologie* , 8 , 371.

[73]: (Effets de la digoxine sur les modifications aiguës de la réfraction auriculaire induites par la fibrillation auriculaire Christian Sticherling, MD; Hakan Oral, MD; Julie Horrocks, PhD; Steven P. Chough, MD; Robert L. Baker, MD; Michael H. Kim, MD; Kristina Wasmer, MD; Frank Pelosi, MD; Bradley P. Knight, MD; Gregory F. Michaud, MD; S. Adam Strickberger, MD; Fred Morady, MD Accepté: 3 Juillet 2000

Publié: 7 Avril 2015 par McGill University Libraries sur le site <http://circ.ahajournals.org/>

Circulation 14 Novembre 2000 Article disponible sur le site ;

<https://sci-hub.st/10.1161/01.CIR.102.20.2503>).

[74]: Théone, S., Carballo, S., Carballo, D., & Marti, C. (2016). Digoxine et fibrillation auriculaire en 2016. *Revue Médicale Suisse* , 12 (535), 1758-1760.

[75]: Pautas É, Lopez C, Gouronnec A, Gravelaine S, Peyron I, Lapostolle F. Mise au point sur la prise en charge des intoxications digitaliques chez le sujet âgé. À propos d'un cas traité par anticorps antidigitaliques. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 2012; 10(4) :355-63

[76]: Clausen, MV, Hilbers, F. et Poulsen, H. (2017). La structure et la fonction des isoformes Na, K-ATPase dans la santé et la maladie. *Frontières en physiologie* , 8 , 371.

[77] : thèse de l'intoxication digitalique non médicamenteuse : un risque non négligeable à UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 FACULTÉ DE MÉDECINE 2010, disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733018v1/document>).

[78] : Auger, J. (2018). Impact des antibiotiques céfprozil et céfoxitine sur le microbiote *Escherichia coli*, lié au métabolisme du cardiotonique digoxine.

[79]: Ziff, O. J., & Kotecha, D. (2016). Digoxin: The good and the bad. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(7), 585-595.

[80] : Wang Y, Ma Q, Zhang S, Liu H, Zhao B, Du B, Wang W, Lin P, Zhang Z, Zhong Y and Kong D (2020) Digoxin Enhances the Anticancer Effect on Non-Small Cell Lung Cancer While Reducing the Cardiotoxicity of Adriamycin. *Front. Pharmacol.* 11:186

[81]. Kanji, S., & MacLean, R. D. (2012). Cardiac glycoside toxicity: more than 200 years and counting. *Critical care clinics*, 28(4), 527-535.

[82]. Elbaz et al.: Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics. *Experimental Hematology & Oncology* 2012 1:4.

[83].Baran SW, Bratcher N, Dennis J, Gaburro S, Karlsson EM, et al. Emerging Role of Translational Digital Biomarkers Within Home Cage Monitoring Technologies in Preclinical Drug Discovery and Development. 14 February 2022.*Front. Behav. Neurosci.* 15:758274.

[84] :Préclinique > définition Fondation Synergie Lyon Cancer. Disponible sur: <https://www.synergielyoncancer.fr/glossaire/preclinique> (Consulte le 4 Juin 2023)

[85]: L'éthique des Modèles Animaux dans les Essais Précliniques CRSP. Disponible sur: <https://crsp.dz/scienceau-19-fevrier/>

[86]: l'évaluation du rapport benefic/risque des médicaments en europe : etude d'un cas pratique avec un traitement contre la sclerose en plaque, 2014

These disponible sur :

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732312v1/document>

[87]: Claire Peltier, F. Étude préclinique : étude des Propriétés du Futur Médicament, Futura. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cycle-medicament-1125/page/3/>. (Consulte le 05 Juin 2023)

[88]: Le développement préclinique ou la première évaluation Leem. Disponible sur: <https://www.leem.org/le-developpement-preclinique-ou-la-premiere-evaluation.> . (Consulte le 5 Juin 2023)

[89]: What are in-vivo models for research? Blog. Disponible sur: <https://blog.biobide.com/what-are-in-vivo-models-for-research#:~:text=In%2Dvivo%20models%20are%20animals,similarhumans.> (Consulte le 6 Juin 2023)

[90]:Essais in vitro CHU de Liège. Disponible sur : https://www.chuliege.be/jcms/c2_17580999/fr/toxicologie-clinique-medicolegale-environnementale-et-en-entreprise/essais-in-vitro. (Consulte le 6 Juin 2023)

[91]: R&D services: Cell Engineering, ex vivo and in vitro models Labtoo. Disponible sur: <https://www.labtoo.com/en/page/cell-culture-and-cell-lines-ex-vivo-and-in-vitro-models>

[92]: Développement de médicaments: Préclinique, in vivo, ADME, Labtoo. Disponible sur: <https://www.labtoo.com/fr/page/d%C3%A9veloppement-de-m%C3%A9dicaments-d%C3%A9couverte-de-m%C3%A9dicaments-et-toxicologie-pr%C3%A9clinique-in-vivo.> (Consulte le 6 Juin 2023)

[93] : Costentin, J. and Vaudry, H. (1970) In vivo veritas : Du Caractère indispensable de l'expérimentation animale pour la mise au point de Nouveaux médicaments, L'animal et l'homme : de l'exploitation à la sauvegarde - In vivo veritas : du caractère indispensable de l'expérimentation animale pour la mise au point de nouveaux médicaments. Disponible sur: <https://books.openedition.org/cths/15760?lang=fr.> (Consulte le 6 Juin 2023)

[94]: Etudes in vivo (sur les animaux) - BBEMG - belgian bioelectromagnetics group (2020) BBEMG. Disponible sur: <https://www.bbemg.uliege.be/fr/etudes-in-vivo-sur-les-animaux/>. (Consulte le 6 Juin 2023)

[95]: Cancer, I.N.D. L'essentiel sur la recherche contre les cancers, L'essentiel sur la recherche contre les cancers - Regarder les cancers autrement. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Regarder-les-cancers-autrement/L-essentiel-sur-la-recherche-contre-les-cancers>. (Consulte le 5 Juin 2023)

[96] : Qu'est-ce que la recherche en cancérologie? (no date) Accueil. Disponible sur: <https://www.fondation-arc.org/cancer/quest-ce-que-la-recherche-en-cancerologie>. (Consulte le 5 Juin 2023)

[97]: Cancer, I.N.D. (no date a) A Quoi Sert La Recherche, A quoi sert la recherche - Comprendre la recherche. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Comprendre-la-recherche/A-quoi-sert-la-recherche>. (Consulte le 5 Juin 2023)

[98]: Gircor, L. (2022) Améliorer l'étude in vitro des cellules cancéreuses, Gircor. Disponible sur: <https://www.gircor.fr/ameliorer-letude-in-vitro-des-cellules-cancereuses/>

[99]: Anne Trafton & MIT News Office The fluid that feeds tumor cells, MIT News/Massachusetts Institute of Technology. Disponible sur: <https://news.mit.edu/2019/fluid-pancreatic-tumor-cells-0416>

[100]: Tosca, E. M., Ronchi, D., Facciolo, D., & Magni, P. (2023). Replacement, Reduction, and Refinement of Animal Experiments in Anticancer Drug Development: The Contribution of 3D In Vitro Cancer Models in the Drug Efficacy Assessment. *Biomedicines*, 11(4), 1058.

[101]: López-Lázaro, M. (2015). Two preclinical tests to evaluate anticancer activity and to help validate drug candidates for clinical trials. *Oncoscience*, 2(2), 91.98

[102]: Méthodes de marquage de la prolifération cellulaire, Institut Français de l'Éducation

Par jauzein 09/11/2015 Fabien Galy

http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/maladies-et-traitements/neurone_therapie/cellules_souches_nerveuses/marquage_brdu

(consulte le 9 Juin 2023)

[103]: Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., ... & Posch, A. (2013). Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 433(2), 105-111.

[105] : Western blot Molecular Devices. Disponible sur: (consulte le 9 Juin 2023) <https://fr.moleculardevices.com/technology/western-blot> (Accessed: 11 July 2023).

[106]: Western blotting, abacam Western Blot Introduction et Optimisation 20 février 2013. Guillaume Boucher, PhD Superviseur - Support Scientifique

Disponible sur :<http://docs.abcam.com/pdf/events/western-blot-introduction-et-optimisation.pdf>

[106] : Jawerth, N. (2020). Comment la RT-PCR en temps réel permet-elle de détecter le virus de la COVID-19?. Bulletin de l'AIEA

Disponible sur :<https://www.iaea.org/sites/default/files/6120811fr.pdf>

[107] : Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P. Y., Février, F., ... & Bifani, P. (2007). La PCR en temps réel: principe et application en infectiologie. *Antibiotiques*, 9(3), 205-211.

[111] Fluorescence Activated Cell Sorting: what is FACS and FACS analysis, AKADEUM LIFE SEINCE

Disponible sur:

<https://www.akadeum.com/technology/facs-fluorescence-activated-cell-sorting>

[108]: Zafrani, L., & Monneret, G. (2017). Comprendre la cytométrie en flux. *Médecine Intensive Réanimation*, 26(6), 517.

[109]: Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide 11-11032-03 rev. A December 2002 Disponible sur:

<https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>

[110] : Constantin, F. (2010). Analyse de l'expression d'antigènes cibles pour l'immunothérapie dans divers cancers (Doctoral dissertation, Université Laval).

<https://www.collectionscanada.gc.ca/obj/thesescanada/vol2/QQLA/TC-QQLA-26775.pdf>

[111] : Genton, C. Y. (2006). L'immunohistochimie: Son principe, ses applications et ses limites. *Clinics in Mother and Child Health*, 3(1), 477-482.

[112]: A. Tiab, M. Abdou, S. Fournier. L'immunohistochimie : des lunettes pour mieux voir ?, Institut Central (ICHV), Hôpital du Valais, Sion caduceus express, Mai 2013, vol 15, N 5 Mai 2013, vol 15, N 5

[113]:IHC (immunohistochemistry) tests. Disponible sur: <https://www.breastcancer.org/screening-testing/ihc-immunohistochemistry-tests>. (consulte le 10 juin 2023)

[114]: J.p. Immunohistochimie (IHC): [Www.anticorps-Enligne.fr](http://www.anticorps-Enligne.fr), Anticorps, kits ELISA, protéines pour la recherche en sciences de la vie. Disponibler sur: <https://www.anticorps-enligne.fr/resources/17/1216/immunohistochimie-ihc/>

[115]: Vázquez, C. L., & Colombo, M. I. (2009). Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods in enzymology*, 452, 85-95.

[116]: Kimmelman, J., & Henderson, V. (2016). Assessing risk/benefit for trials using preclinical evidence: a proposal. *Journal of Medical Ethics*, 42(1), 50

[117]: Partie, I. I. S6 (R1): Évaluation au stade préclinique de la sécurité des produits pharmaceutiques issus de la biotechnologie. ISBN:15-114041-80. Le 22 janvier 2016

[118] : Allain, A.: P. (2017) Étude chez l'animal ou étude préclinique, Pharmacorama. Disponible sur:
<https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/medicaments-generalite/etapes-etude-medicament/etude-animal-etude-preclinique>. (Consulte le 13 Juin 2023)

[119] : Zhang, H., Qian, DZ, Tan, YS, Lee, K., Gao, P., Ren, YR, ... & Semenza, GL (2008). La digoxine et d'autres glycosides cardiaques inhibent la synthèse de HIF-1 α et bloquent la croissance tumorale. *Actes de l'Académie nationale des sciences*, 105 (50), 19579-19586. Disponible sur :<https://sci-hub.st/https://doi.org/10.1073/pnas.0809763105>

[120] :Wei, D., Peng, JJ, Gao, H., Li, H., Li, D., Tan, Y. et Zhang, T. (2013). La digoxine régule à la baisse NDRG1 et VEGF par l'inhibition de HIF-1 α dans des conditions hypoxiques dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain A549. *Journal international des sciences moléculaires*, 14 (4), 7273-7285. Disponible sur : <https://sci-hub.st/https://doi.org/10.3390/ijms14047273>

[121]: Gayed, BA, O'Malley, KJ, Pilch, J. et Wang, Z. (2012). La digoxine inhibe la densité des vaisseaux sanguins et l'expression de HIF-1 α dans les tumeurs prostatiques xénogreffes C4-2 résistantes à la castration. *Sciences cliniques et translationnelles*, 5 (1), 39-42.

Disponible sur : <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00376.x>

[122] : Zhang, XH, Wang, XY, Zhou, ZW, Bai, H., Shi, L., Yang, YX, ... & Zhang, XC (2017). La combinaison de digoxine et de GSK2606414 exerce une activité anticancéreuse synergique contre la leucémie in vitro et in vivo. *Biofacteurs*, 43 (6), 812-820.

Disponible sur : <https://sci-hub.st/https://doi.org/10.1002/biof.1380>

[123]: Wang, Y., Hou, Y., Hou, L., Wang, W., Li, K., Zhang, Z., ... & Kong, D. (2021). La digoxine exerce une activité anticancéreuse sur les cellules cancéreuses pulmonaires humaines non à petites cellules en bloquant la voie PI3K/Akt. *Rapports sur les sciences biologiques*, 41 (10), BSR20211056.

Disponible sur :

<https://portlandpress.com/bioscirep/article-abstract/41/10/BSR20211056/229832>

Annexes

Annexe I :

Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth

Huafeng Zhang^{a,b}, David Z. Qian^{a,b}, Yee Sun Tan^{a,c}, Kang Ae Lee^{a,c}, Ping Gao^d, Yunzhao R. Ren^a, Sergio Rey^{a,c}, Hans Hammers^a, Daniel Chang^a, Roberto Pilli^a, Chi V. Dang^{b,d}, Jun O. Liu^a, and Gregg L. Semenza^{a,b,c,d,f,g,1}

^aVascular Program, Institute for Cell Engineering, ^bDepartment of Oncology, ^cMcKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, ^dDepartment of Medicine, ^eDepartment of Pharmacology, ^fDepartment of Pediatrics, and ^gDepartment of Radiation Oncology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205

This contribution is part of the special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Sciences elected in 2008.

Contributed by Gregg L. Semenza, September 30, 2008 (sent for review August 21, 2008)

A library of drugs that are in clinical trials or use was screened for inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Twenty drugs inhibited HIF-1-dependent gene transcription by >88% at a concentration of 0.4 μ M. Eleven of these drugs were cardiac glycosides, including digoxin, ouabain, and proscillaridin A, which inhibited HIF-1 α protein synthesis and expression of HIF-1 target genes in cancer cells. Digoxin administration increased latency and decreased growth of tumor xenografts, whereas treatment of established tumors resulted in growth arrest within one week. Enforced expression of HIF-1 α by transfection was not inhibited by digoxin, and xenografts derived from these cells were resistant to the anti-tumor effects of digoxin, demonstrating that HIF-1 is a critical target of digoxin for cancer therapy.

cancer therapy | hypoxia | tumor xenograft

Many human cancers contain regions of hypoxia because of rapid cell proliferation and the presence of intratumoral blood vessels that are structurally and functionally abnormal, resulting in both spatial and temporal heterogeneity of blood flow (1, 2). The presence of intratumoral hypoxia is significantly associated with increased risk of treatment failure, invasion, metastasis, and patient mortality (3). A principal mechanism by which cancer cells adapt to the hypoxic microenvironment is through the activity of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 is a transcription factor that regulates the expression of hundreds of genes in response to hypoxia, including *VEGF*, which encodes vascular endothelial growth factor, a key regulator of angiogenesis; *GLUT1*, which encodes glucose transporter 1; and *HK1* and *HK2*, which encode hexokinase, the first enzyme of the glycolytic pathway (4, 5). Expression of these proteins serves either to increase O₂ delivery (VEGF) or to allow metabolic adaptation to reduced O₂ availability (GLUT1, HK1, HK2). HIF-1 also controls the expression of genes involved in tumor cell immortalization, stem cell maintenance/de-differentiation, genetic instability, autocrine growth, invasion/metastasis, and treatment failure (6, 7).

HIF-1 is a heterodimeric protein that is composed of O₂-regulated HIF-1 α and constitutively expressed HIF-1 β subunits (8, 9). Under normoxic conditions, HIF-1 α is hydroxylated on proline residue 564 and/or 402 by proline hydroxylase domain protein 2 (PHD2), which is required for the binding of the von Hippel-Lindau protein (VHL), the recognition subunit of an E3 ubiquitin-protein ligase that targets HIF-1 α for proteasomal degradation (10). Under hypoxic conditions, PHD2 activity is inhibited, then HIF-1 α accumulates, dimerizes with HIF-1 β , and activates the transcription of target genes. VHL loss-of-function results in constitutive expression of HIF-1 α in the majority of clear cell renal carcinomas (11). HIF-2 α is also regulated by PHD2 and VHL, dimerizes with HIF-1 β , and transactivates an overlapping but distinct group of target genes (12).

Whereas VHL loss-of-function leading to dysregulated HIF-1 α expression is restricted to renal cell carcinoma and cerebellar hemangioblastoma, many common human cancers have mutations in phosphatidylinositol 3-kinase or upstream signaling pathways (13). These genetic alterations activate the mammalian target of rapamycin (mTOR), a serine-threonine protein kinase that activates p70 S6 kinase, which phosphorylates ribosomal protein S6 (RPS6) and induces increased translation of HIF-1 α mRNA into protein (14). Derivatives of rapamycin that inhibit mTOR are in clinical trials as anti-cancer agents and HIF-1 α overexpression has been shown to sensitize kidney cancers to these drugs (15).

The combination of increased synthesis and decreased degradation leads to increased HIF-1 α protein levels in many cancers (16, 17). HIF-1 α overexpression in tumor biopsies is associated with increased patient mortality in human cancers of the bladder, brain, breast, cervix, endometrium, oropharynx, lung, skin, and stomach, which reflects the large battery of HIF-1 target genes encoding proteins that play important roles in many key aspects of cancer biology (6, 7, 12). Based on these findings, there is considerable interest in identifying compounds that inhibit HIF-1 activity and testing their ability to inhibit tumor growth (6, 18). In the present study, we surveyed drugs that are already in clinical use to identify novel inhibitors of HIF-1.

Results

Cell-Based Screen for Inhibitors of HIF-1 Transcriptional Activity. To screen for inhibitors of HIF-1 by using a cell-based assay, we engineered a reporter cell line Hep3B-c1, which contains reporter genes for hypoxia-inducible expression of firefly luciferase and constitutive expression of *Renilla* luciferase. Human Hep3B hepatoblastoma cells were stably transfected with plasmid p2.1, in which expression of firefly luciferase coding sequences is driven by a 68-bp hypoxia response element (HRE) from the human *ENO1* gene inserted upstream of a basal SV40 promoter (Fig. 1A). The HRE contains essential binding sites for HIF-1, which mediates increased transcription in cells that are either exposed to hypoxia or co-transfected with an HIF-1 α expression vector (19). In addition to p2.1, Hep3B-c1 cells were stably co-transfected with pSVRenilla, in which expression of *Renilla* luciferase coding sequences is driven by the SV40 promoter alone (Fig. 1A). By determining the ratio of firefly/*Renilla* luciferase activity under nonhypoxic and hypoxic conditions, we

Author contributions: H.Z., D.Z.Q., and G.L.S. designed research; H.Z., D.Z.Q., Y.S.T., K.A.L., P.G., H.H., and D.C. performed research; Y.S.T., R.P., and J.O.L. contributed new reagents/analytic tools; H.Z., D.Z.Q., S.R., R.P., C.V.D., J.O.L., and G.L.S. analyzed data; and H.Z. and G.L.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence should be addressed at: Broadway Research Building, Suite 671, 733 North Broadway, Baltimore, MD 21205. Email: gsemenza@jhmi.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0809763105. Supplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0809763105 PNAS | December 16, 2008 | vol. 105 | no. 50 | 19579–19586

Fig: article, La digoxine et d'autres glycosides cardiaques inhibent la synthèse de HIF-1 α et bloquent la croissance tumorale. [119]

Annexe II :

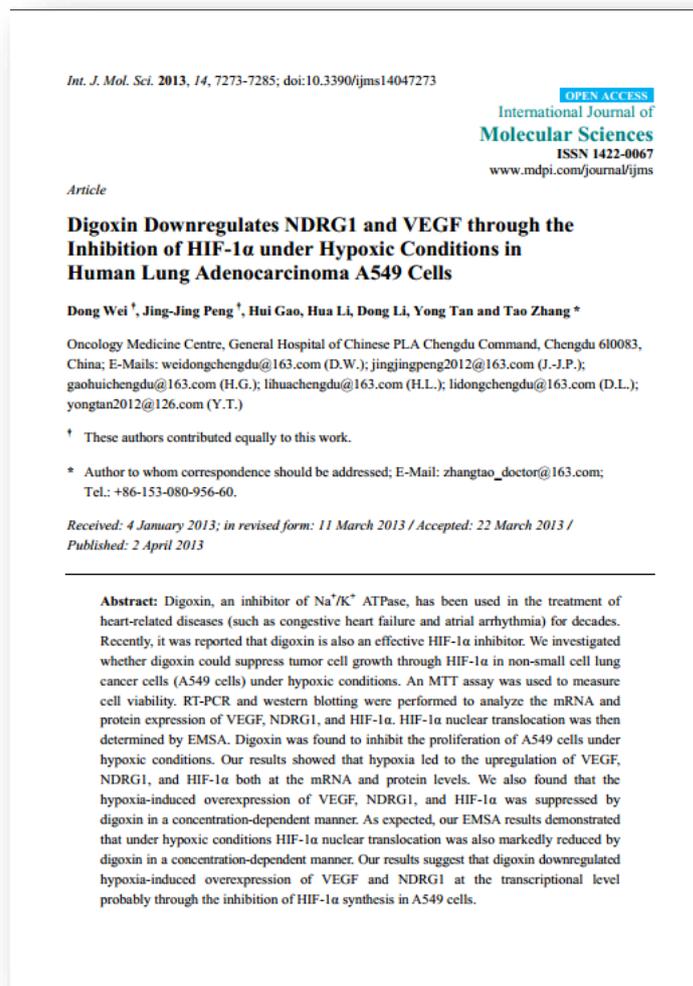


Fig: article, La digoxine régule à la baisse NDRG1 et VEGF par l'inhibition de HIF-1 α dans des conditions hypoxiques dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain A549.

[120]

Annexe III :

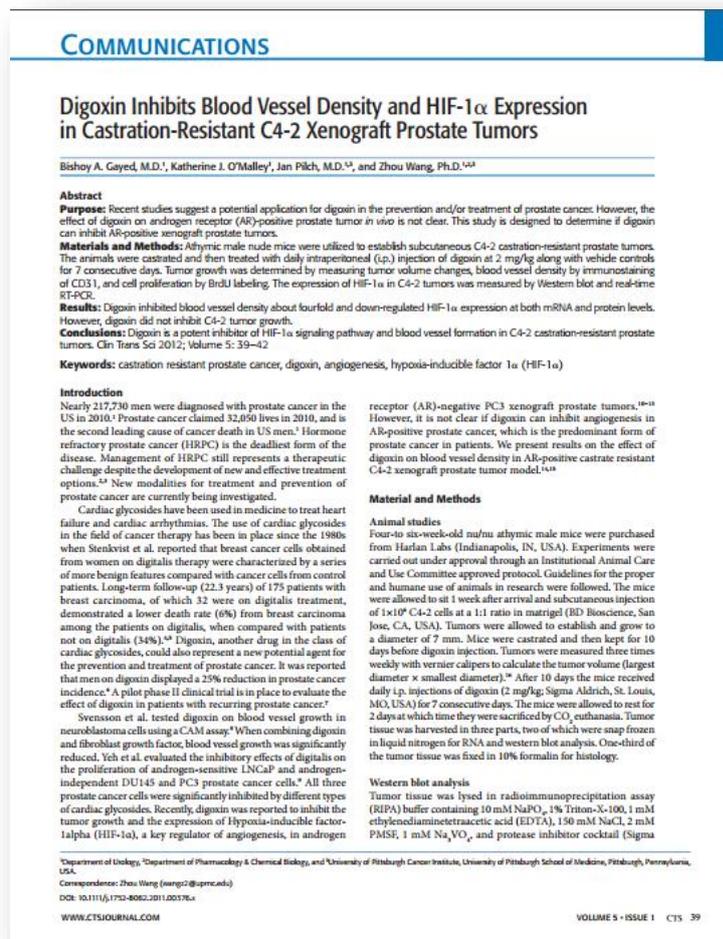


Fig: article, La digoxine inhibe la densité des vaisseaux sanguins et l'expression de HIF-1 α dans les tumeurs prostatiques xénotransplantées C4-2 résistantes à la castration. [121]

Annexe IV :

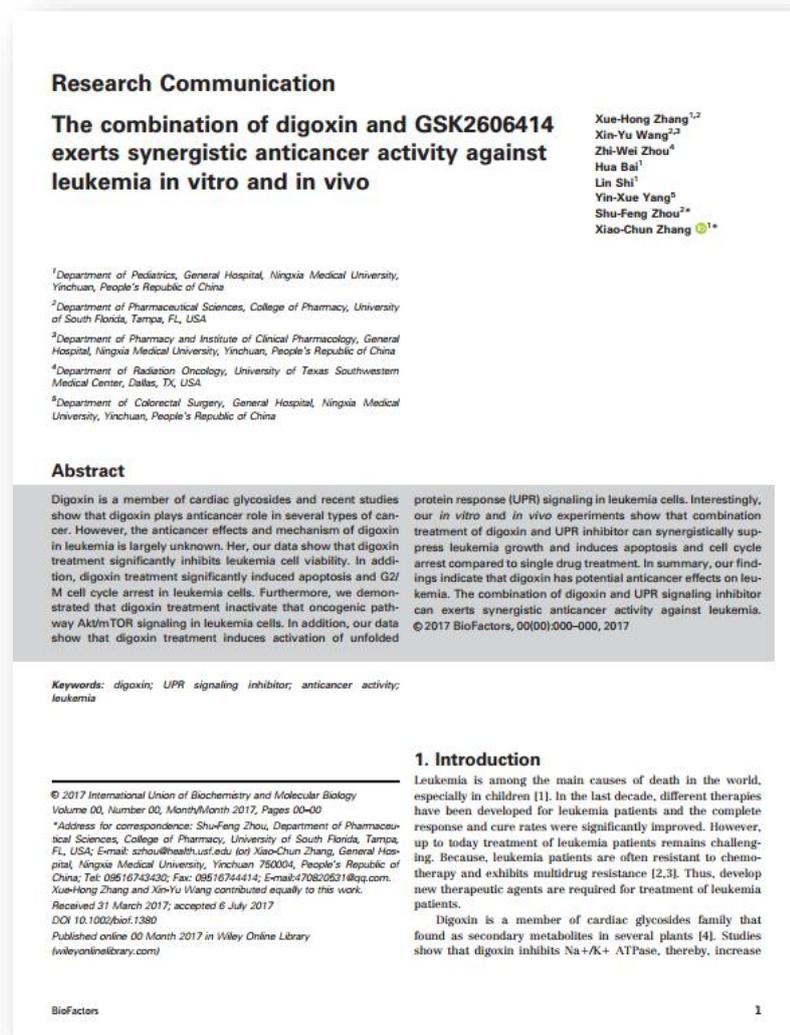


Fig: article, La combinaison de digoxine et de GSK2606414 exerce une activité anticancéreuse synergique contre la leucémie in vitro et in vivo. [122]

Annexe V :

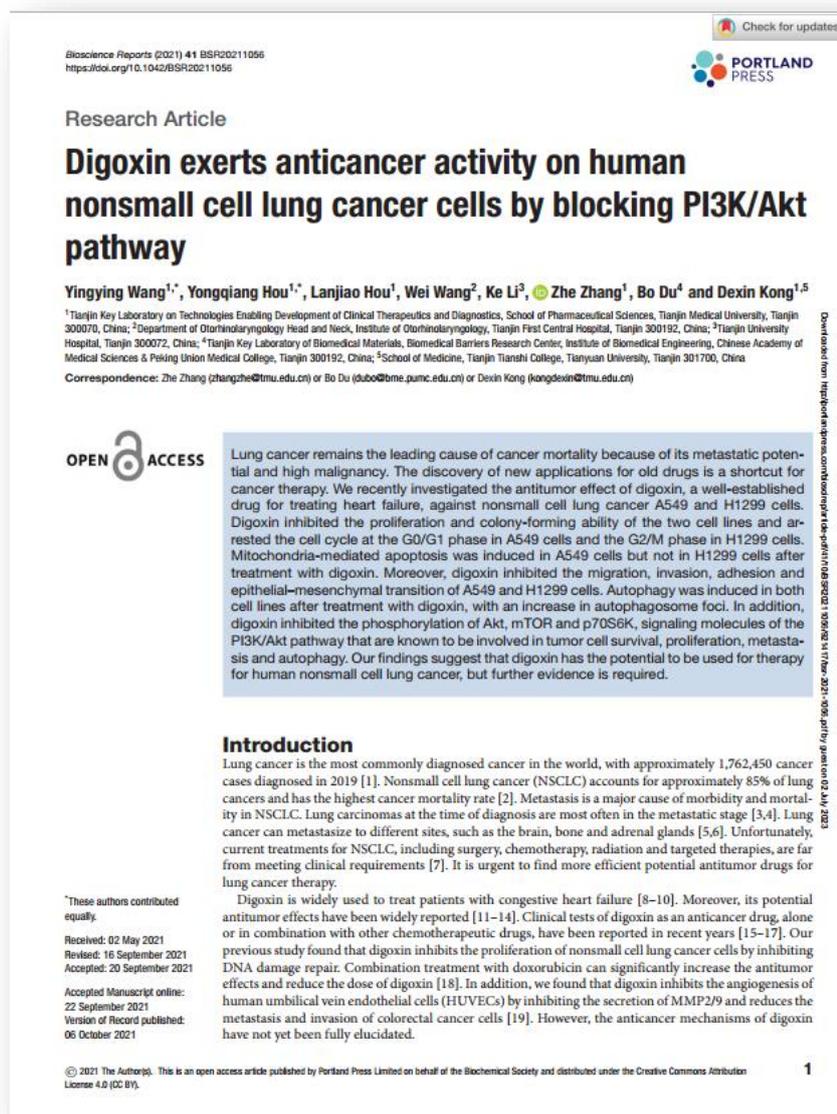


Fig: article, La digoxine exerce une activité anticancéreuse sur les cellules cancéreuses pulmonaires humaines non à petites cellules en bloquant la voie PI3K/Akt. [123]

Résumé

Le cancer reste l'une des principales causes de décès dans le monde, et malgré les avancées réalisées dans le domaine des traitements, de nombreuses formes de cancer restent difficiles à traiter de manière efficace. La recherche de nouveaux agents anticancéreux est d'une importance capitale dans le contexte actuel de lutte contre le cancer, ces recherche vise à identifier des composés ou des molécules qui peuvent cibler spécifiquement les cellules cancéreuses tele que la digoxine, La digoxine est un médicament de la classe des glycosides cardiotoniques, utilisé principalement pour traiter les problèmes cardiaques tels que l'insuffisance cardiaque congestive et certaines arythmies cardiaques. Elle est dérivée de la plante médicinale digitale pourpre (*Digitalis purpurea*).

L'étude bibliographique comparative de différents articles publié révèle des mécanismes potentiels par les quels la digoxine peut exercer des effets anticancéreux. Ces mécanismes comprennent: l'inhibition de la la voie Akt, l'inhibition de la synthèse de HIF-1a, l'activation de la signalisation UPR, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses et induire leur apoptose (c'est-à-dire leur mort programmée), l'inhibition de la métastase, ainsi que possède des effets anti-angiogéniques, c'est-à-dire qu'elle peut empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à la croissance tumorale.

Concernant l'étude des essais précliniques, la digoxine pourrait représenter une option prometteuse dans le traitement du cancer, et que des études cliniques supplémentaires sont nécessaires pour évaluer pleinement l'efficacité, la sécurité, les posologies optimales, les schémas de traitement et les éventuels effets secondaires de la digoxine chez les patients atteints de cancer.

Mots clés: cancer, digoxine, essais précliniques, anti-angiogéniques

Abstract

Cancer remains one of the leading causes of death worldwide, and despite advances in treatment, many forms of cancer remain difficult to treat effectively. The search for new anti-cancer agents is of vital importance in the current fight against cancer, and this research aims to identify compounds or molecules that can specifically target cancer cells such as digoxin. Digoxin is a drug in the cardiotonic glycoside class, used mainly to treat heart problems such as congestive heart failure and certain cardiac arrhythmias. It is derived from the medicinal plant foxglove (*Digitalis purpurea*).

In addition, our comparative study reveals potential mechanisms by which digoxin may exert anticancer effects. These mechanisms include: inhibition of the Akt pathway, inhibition of HIF-1 α synthesis, activation of UPR signalling, inhibition of cancer cell growth and induction of apoptosis (i.e. programmed death), inhibition of metastasis, as well as anti-angiogenic effects, i.e. it may prevent the formation of new blood vessels necessary for tumour growth.

Finally, the comparative literature review of preclinical trials suggests that digoxin may represent a promising option in the treatment of cancer, and that further clinical studies are required to fully evaluate the efficacy, safety, optimal dosages, treatment regimens and potential side effects of digoxin in cancer patients. In addition, the exact mechanism by which digoxin exerts its anti-cancer effects remain to be elucidated. Key words: cancer, digoxin, preclinical trials, anticancer agents.

Key words: cancer, digoxin, preclinical trials, anticancer agents.

الملخص:

لا يزال السرطان أحد الأسباب الرئيسية للوفاة في جميع أنحاء العالم، وعلى الرغم من التقدم في العلاج، لا يزال من الصعب علاج العديد من أشكال السرطان بشكل فعال. البحث عن عوامل جديدة مضادة للسرطان له أهمية قصوى في السياق الحالي لمكافحة السرطان، ويهدف هذا البحث إلى تحديد المركبات أو الجزيئات التي يمكن أن تستهدف الخلايا السرطانية على وجه التحديد مثل الديجوكسين، وديجوكسين هو فئة من أدوية الجليكوزيدات القلبية تستخدم بشكل أساسي لعلاج مشاكل القلب مثل قصور القلب الاحتقاني وبعض عدم انتظام ضربات القلب. وهو مشتق من النبات الطبي: القمعية الأرجوانية (*Digitalis purpurea*).

بالإضافة إلى ذلك، تكشف دراستنا المقارنة عن الآليات المحتملة التي يمكن من خلالها للديجوكسين ممارسة تأثيرات مضادة للسرطان. تشمل هذه الآليات: تثبيط مسار Akt، تثبيط إنتاج HIF-1a، تنشيط إشارات UPR، تثبيط نمو الخلايا السرطانية والحث على موت الخلايا المبرمج (أي الموت المبرمج)، تثبيط الورم الخبيث، وكذلك له تأثيرات مضادة لتولد الأوعية الدموية، أي يمكنه منع تكوين أوعية دموية جديدة ضرورية لنمو الورم.

أخيرًا، تشير الدراسة الببليوغرافية لمقارنة التجارب قبل السريرية إلى أن الديجوكسين قد يكون خيارًا واعدًا لعلاج السرطان، وأن هناك حاجة إلى دراسات سريرية إضافية لتقييم الفعالية والسلامة والجرعات المثلى وأنظمة العلاج والآثار الجانبية المحتملة للديجوكسين في مرضى السرطان. بالإضافة إلى ذلك، لا يزال يتعين توضيح الآليات الدقيقة التي يمارس بها الديجوكسين آثاره المضادة للسرطان.

الكلمات المفتاحية: السرطان، الديجوكسين، التجارب قبل السريرية، الأدوية المضادة للسرطان.