

Evaluation des propriétés anticancéreuses de nouvelles glycomolécules dérivées de benzodiazépines.

S. El Haddar*, C. Jarmoumi[#], Y. Bakri*, EM. Essassi[#], P. Martin⁺, M. Massoui[#], A. Benjouad*[#]

*Laboratoire de Biochimie et Immunologie, Faculté des Sciences - Rabat,

[#]Pôle de Compétence Pharmacochimie, Faculté des Sciences-Rabat

⁺Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (EA 2465), IUT de Béthune-France.

Résumé

Nous avons étudié l'activité anticancéreuse potentielle de neuf nouvelles glycomolécules obtenues par greffage régiospécifique de 1,4-benzodiazépine sur des monosaccharides. L'effet cytotoxique *in vitro* de ces différents composés a été évalué sur trois lignées cancéreuses, RD (Rhabdomyosarcome embryonnaire), Hep-2 (Carcinome du Larynx) et Vero (cancer de rein de singe vert). La cytotoxicité cellulaire a été mesurée en utilisant le test MTT ; la mitomycine est utilisée comme témoin positif. Parmi les neuf produits synthétiques, trois (BD2M, BD207 et BD239) ont montré un effet antiprolifératif important avec des IC50 inférieures à 3,12µg/ml. La relation structure-activité et le mécanisme d'action de ces molécules sont en cours d'investigation.

Mots clés : Cancer, Glycomolécules, Benzodiazépines, Lignées cellulaires, Cytotoxicité, Test MTT.

Introduction

Le cancer représente un problème majeur de santé publique, il atteint un grand nombre de personnes chaque année, et provoque le décès de plusieurs milliers. Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (2003), plus de 20 millions de personnes sont atteintes de cancer et 10 millions de nouveaux cas sont enregistrés chaque année, dont plus de la moitié dans les pays en développement [1].

La chimiothérapie reste le moyen le plus utilisé et le plus efficace contre les différentes formes de cancer [2]. Cependant, elle présente de nombreux problèmes, à savoir une faible spécificité des agents chimiothérapeutiques traditionnels [3,4,5]. La découverte de nouveaux agents anticancéreux, présentant éventuellement un mécanisme d'action différent de celui des anticancéreux disponibles, peut constituer une nouvelle piste pour lutter contre les cancers. Ces dernières années, la synthèse et les études biologiques des dérivés benzodiazépines ont confirmé leurs nombreuses propriétés pharmacologiques [6]. De nombreux travaux ont montré que les ligands des récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR) induisent une altération du cycle cellulaire et l'apoptose dans certains types de cellules cancéreuses [7,8,9,10]. Notre travail se situe dans cette optique et vise le développement d'agent anticancéreux dérivés de benzodiazépines par une approche originale de chimie combinatoire.

Matériel et Méthodes

A-Synthèse des glycomolécules

Nous nous sommes intéressés aux dérivés 1,4-benzodiazépine-2,5-diones[11,12,13,14] (**I**) et aux pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5,11-diones[15,16] (**II**) dont les applications peuvent être limitées par leur très faible hydrosolubilité. Pour augmenter ce paramètre et optimiser la biodisponibilité, nous avons procédé au greffage régiospécifique d'un groupement polyhydroxylé **Su** porteur ou non d'une chaîne alkyle R₃, conduisant respectivement aux familles de composés **III** et **IV** [18,19].

La chaîne hydrophobe R₃ introduite sur la partie glucidique **Su** peut conférer un caractère amphiphile facilitant la formation d'agrégats organisés, notamment sous forme de micelles [18,19].

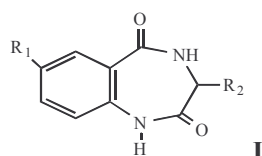
B- Analyse de l'activité cytotoxique des Benzodiazépines

L'effet cytotoxique des Benzodiazépines a été évalué sur trois lignées cellulaires cancéreuses (deux lignées humaines RD et Hep-2 ; et une lignée animale Vero), à grand pouvoir prolifératif. Les lignées sont manipulées sous une hotte stérile à flux laminaire vertical puis cultivées dans le milieu **DMEM** à 37°C sous atmosphère contrôlée (5 % CO₂, 95 % air atmosphérique, 90 % d'hygrométrie).

Les produits à tester sont solubilisés dans le DMSO. Une série de dilutions est effectuée avec le milieu de culture, pour obtenir une gamme de concentrations variables: 100µg/ml, 50 µg/ml, 25µg/ml, 12.5µg/ml, 6.25µg/ml, 3.12µg/ml. L'analyse de la viabilité

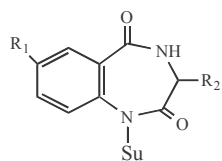
cellulaire est faite par test MTT et l'indice de cytotoxicité est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante [20] :

$$\% \text{ IC} = [1 - (T/C)] \times 100$$



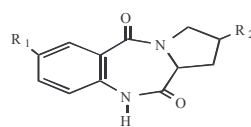
I

exemple : **BD2M** : 7-chloro-1,4-benzodiazépine-2,5 dione



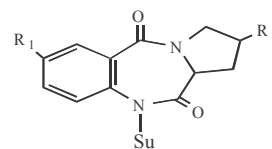
III

exemple : **BD207**: 7-Chloro-N-(3'-O-hexadécyl-6'-désoxy-D-glucopyranos-6'-yl)-1,4-benzodiazépine-2,5-dione



II

exemple : **BD262**: 7-Chloro-N-(5'-désoxy-1',2'-O-isopropylidène-β-D-ribofuranoside de méthel-5'-yl)-pyrrolo-[2,1-c]-[1,4]benzodiazépine-5,11-dione



IV

$R_1 = H, Cl$; $R_2 = H, CH_3, OH$; $R_3 = H, C_8H_{17}, C_{12}H_{25}, C_{16}H_{33}$

Su : 3'-O-D-glucopyranos-6'-yl, 3'-O-alkyl-D-glucopyranos-6'-yl, D-ribofuranos-5'-yl, xylit-1'-yl et glycé-1'-yl.

Résultats et discussion

Les résultats de l'activité antiproliférative des différents dérivés benzodiazépines vis-à-vis de différentes lignées cellulaires cancéreuses (Hep-2, RD) sont résumés dans les figures 1 et 2. Les courbes montrent le pourcentage de cytotoxicité en fonction des concentrations des produits. Ces résultats montrent que les dérivés BD2M, BD207 et BD239 présentent un effet inhibiteur total de la croissance cellulaire à des concentrations situés entre 12.5 µg/ml et 25 µg/ml avec des DC50 (dose entraînant 50% de cytotoxicité) < 3,12 µg/ml. Cet effet est observé sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses utilisées. En revanche les autres dérivés comme le LB240C4 ont un effet cytotoxique relativement plus faible avec une DC50 supérieure à 100µg/ml.

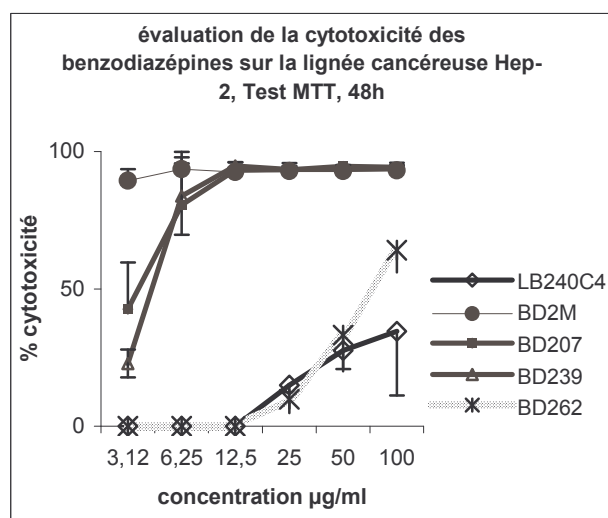


Fig 1 : Courbe dose-effet, représentant l'activité antiproliférative des benzodiazépines sur la lignée cellulaire cancéreuse humaine Hep-2, évaluée après 48h d'exposition (n=3).

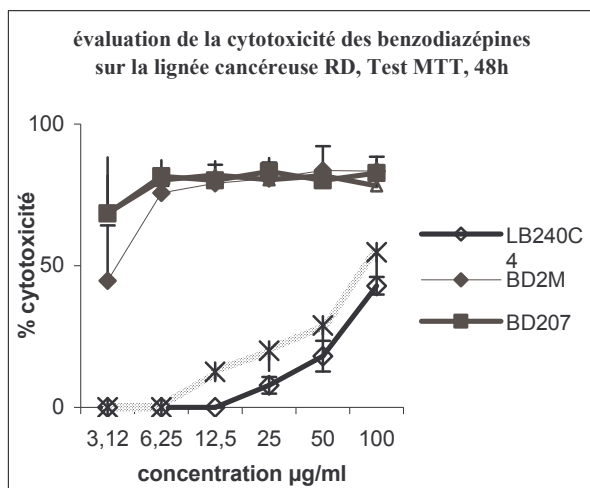


Fig 2 : Courbe dose-effet, représentant l'activité antiproliférative des benzodiazépines sur la lignée cellulaire cancéreuse humaine RD, évaluée après 48h d'exposition (n=3).

Ces résultats montrent que trois dérivés benzodiazépines BD2M, BD207 et BD239 sont doués d'une puissante activité anticancéreuse *in vitro*, alors que des dérivés de la même famille présentent une activité modeste même à forte concentration. Ceci témoigne d'une part de la spécificité de l'effet observé et ouvre la perspective d'une étude approfondie de ces molécules. Les études de relation structure-activité et du mécanisme d'action des molécules les plus actives qui sont en cours devront conduire à mieux valoriser ces produits comme agents anticancéreux potentiels.

Bibliographie

- Jacques T. et Gaelle M. Toujours plus de cancer en France ? Médecine-Santé/Cancer 16/01/2004
- David R. 2005. How to develop a successful cancer drug-molecules to medicines or targets to treatments? European Journal of Cancer, **41**, 676-682.
- Ricky W., Astrid A., and Scott W. 2002. Lowe Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. Cell, Vol. **108**, 153-164.
- One step at a time Nature. 2005. News and Views Cancer **436**, 468-469.
- Alberts B. Johnson A. Lewis J. Raff M. Roberts K. Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th edition 2002.
- Wanda N., Barbara S., Adam O., Joanna W., Maria W., and Tadeusz G. 2001. Synthesis and Antiproliferative Activity *in vitro* of Novel 1,5-

Benzodiazepines. Part III Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **334**, 3-10

7- Marina Landau et al. 1998. Antiproliferative and Differentiating Effects of Benzodiazepine Receptor Ligands on B16 Melanoma Cells Biochemical Pharmacology, Vol. **56**, pp. 1029-1034.

8- Andreas P. Sutter et al. 2004. Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells and enhance chemosensitivity to paclitaxel, docetaxel, doxorubicin and the Bcl-2 inhibitor HA14-1. Journal of Hepatology vol. **41**, pp. 799-807

9- Kerstin Maaser. 2005. Mechanisms of mitochondrial apoptosis induced by peripheral benzodiazepine receptor ligands in human colorectal cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications vol. **332**, pp. 646-652.

10- Kerstin M. Andreas P. Antje K. Michael H. Patricia G. Hans S. 2004. Cell cycle-related signaling pathways modulated by peripheral benzodiazepine receptor ligands in colorectal cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications **324**, pp. 878-886.

11- Rudolph U., Crestani F., Benke D., Brünig I., Benson J. A., Fritschy J.-M., Martin J. R., Bluethmann H. et Möhler H., Nature, 1999, **401**, 796-800.

12- Farese A., Peytou V., Condom R., Sinet M., Patino N., Kirn A., Moog C., Aubertin A. M. et Guedj R., Eur. J. Med. Chem., 1996, **31**, 497-505.

13- Webb R., Barker P., Baier M., Reynolds M., Robarge K., Blackburn B., Tischler M. et Weese K., Tetrahedron Lett., 1994, **35**, 2113-2116.

14- Blackburn B., Lee A., Baier M., Kohl B., Olivero A., Matamoros R., Robarge K. et McDowell R., J. Med. Chem., 1997, **40**, 717-729.

15- Giovanni P., Cacciari B., Guiott, Leoni A, Romagnoli R, Thurston DE et Gambari R., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, **8**, 3019-3024.

16- Barkley M.D., Cheatham S., Thurston D. E. et Hurley L. H., Biochemistry., 1986, **25**, 3021-3031.

17- Wagner J., Wagner M. L. et Hening W. A., Annals Pharmacotherapy., 1998, **32**, 680-691.

18- Bouhlal, D.;

Gode, P.; Goethals, G.; Massoui, M.; Villa, P.; Martin, P. C. Carbohydrate Research, **329**(1), (2000) 207-214.

19- Bouhlal, D.; Martin, P.; Massoui, M.; Nowogrocki, G.; Pilard, S.; Villa, P.; Goethals, G. Tetrahedron: Asymmetry, **12**(11), (2001) 1573-1577.

20- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, vol. **65**, 55-63