

Université de Montréal

# **Caractérisation de nouveaux analogues des cannabinoïdes**

par

Kahina Daheb

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maître (M.Sc)  
en sciences pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

Septembre, 2010

© Kahina Daheb, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

Caractérisation de nouveaux analogues des cannabinoïdes

Présenté par :  
Kahina Daheb

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Daniel Lévesque, président-rapporteur  
Pr. Patrice Hildgen, directeur de recherche  
Pr. Vanessa Mosqueira, membre du jury

## Résumé

Ce mémoire présente l'étude de certains effets pharmacologiques de nouveaux analogues synthétiques des cannabinoïdes. Un des objectifs de longue date des recherches sur les cannabinoïdes a été la découverte de puissants analogues synthétiques de substances naturelles, qui pourraient être développés comme médicaments. Cela nécessite, entre autres, qu'ils soient exempts d'effets psychotropes qui caractérisent l'usage récréatif du Cannabis. Le moteur derrière cet objectif a été la longue histoire de l'usage du Cannabis comme substance médicale, en particulier dans le traitement de la douleur et de l'inflammation.

Parmi les nombreux effets pharmacologiques des cannabinoïdes, deux sont d'un grand intérêt thérapeutique : l'effet antiprolifératif sur les cellules tumorales et l'effet anti-angiogène. Dans ce mémoire, l'étude de ces deux effets a été réalisée sur des cultures cellulaires tumorales et endothéliales humaines. Les tests de prolifération sur les deux types de cellules n'ont pas montré de cytotoxicité. Ce qui a permis de poursuivre l'étude de l'effet anti-angiogène, et qui a mis fin à l'étude de l'effet anti-tumoral.

L'inhibition de l'angiogénèse a été investiguée en réalisant des tests de recolonisation d'une zone dénudée dans une monocouche de cellules endothéliales et des tests de formation de microtubules sur matrice gélifiée. L'effet anti-angiogène n'a pas pu être évalué à cause de problèmes de contamination, néanmoins certaines molécules montrent un effet anti-migratoire.

L'absence de cytotoxicité et l'analogie structurale avec le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol encourage à continuer l'investigation des effets pharmacologiques de ces nouvelles molécules synthétiques. Il serait aussi pertinent d'étudier, dans une thèse de doctorat, les mécanismes d'actions moléculaires par lesquels agissent ces molécules.

**Mots-clés** : cannabinoïdes, récepteurs, cellules, prolifération, tumeurs, angiogénèse.

## Abstract

This thesis aims to assess the pharmacological effects of new synthetic cannabinoid analogs. A long-standing goal in cannabinoid research has been the discovery of potent synthetic analogs of the natural substances that might be developed as clinically useful drugs. This requires, among other things, that they be free of the psychotropic effects that characterize the recreational use of Cannabis. An important driving force for this goal is the long history of the use of Cannabis as a medicinal agent especially in the treatment of pain and inflammation.

Among the many pharmacological effects of cannabinoids, two are of great therapeutic value: the anti-proliferative effect on tumor cells and anti-angiogenic effect. In this thesis, the study of these two effects has been conducted on tumoral and endothelial culture cell. The proliferation tests on both types of cells showed no cytotoxicity. This allowed further study of the anti-angiogenic effect, and ended the study of anti-tumoral effect.

Inhibition of angiogenesis has been investigated by performing recolonization tests of a denuded area on endothelial cell monolayer and microtubules formation tests on gel matrix. This effect could not be evaluated because of contamination problems; however, some molecules show anti-migration effects.

The absence of cytotoxicity and structural analogy with  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol encourages the investigation in pharmacological effects of these new synthetic molecules. It would also be interesting to study in a doctoral thesis, the molecular mechanisms of action involved.

**Keywords:** cannabinoids, receptors, cells, proliferation, tumors, angiogenesis.

## Table des matières

Introduction .....	1
1. Les cannabinoïdes .....	1
1.1 Les endocannabinoïdes .....	1
1.2 Les phytocannabinoïdes .....	2
1.3 Les cannabinoïdes synthétiques .....	4
2. Les récepteurs cannabinoïdes .....	6
2.1 CB1 : récepteur cannabinoïde de type 1 .....	7
2.2 CB2 : récepteur cannabinoïde de type 2 .....	8
2.3 Les canaux TRP : <i>transient receptor potential</i> .....	8
2.4 GPR55 et GPR119 : nouveaux récepteurs cannabinoïdes .....	10
3. Effets des cannabinoïdes .....	10
3.1 Le système endocannabinoïde .....	10
3.2 Effet anti-tumoral .....	11
3.3 Effet anti-angiogène .....	13
3.3.1 Définition de l'angiogénèse .....	13
3.3.2 Mécanismes d'inhibition de l'angiogénèse .....	14
3.4 Relation tumeur/angiogénèse .....	15
3.5 Effet immuno-modulateur et anti-inflammatoire .....	15
4. Nouveaux analogues synthétiques des cannabinoïdes .....	19
5. Hypothèse et objectifs .....	21
Matériel et méthodes .....	22
6. Méthodes de culture cellulaire .....	22
6.1 Protocole de culture des HUVEC .....	22
6.1.1 Matériel .....	22
6.1.2 Méthode .....	23
6.1.2.1 Préparation des boîtes de culture en les traitant à la gélatine .....	23
6.1.2.2 Milieu de culture .....	23

6.1.2.3 Passages.....	24
6.2 Culture des cellules de glioblastomes « U87 et U373 ».....	24
6.2.1 Matériel.....	24
6.2.2 Méthode.....	25
6.2.2.1 Boîtes de culture.....	25
6.2.2.2 Milieu de culture.....	25
6.2.2.3 Passages.....	25
6.3 Culture des cellules endothéliales immortalisées EAhy 926.....	26
6.3.1 Matériel.....	26
6.3.2 Méthode.....	26
6.3.2.1 Milieu de culture.....	26
6.3.2.2 Passages.....	26
7. Test de prolifération au MTT.....	27
7.1 Protocole de comptage des cellules.....	28
7.2 Protocole expérimental du test de prolifération avec cellules endothéliales.....	28
7.2.1 Ensemencement des plaques Costars® à 96 puits.....	28
7.2.2 Dépôt des produits à tester.....	29
7.2.3 Dépôt du MTT.....	29
7.2.4 Solubilisation des cristaux formés par le MTT.....	29
7.2.5 Étude spectrophotométrique.....	30
7.3 Protocole expérimental du test de prolifération avec cellules de glioblastomes et EAhy 926.....	30
7.3.1 Ensemencement des plaques Costars® à 96 puits.....	30
7.3.2 Dépôt des produits à tester.....	30
7.3.3 Dépôt du MTT.....	30
7.3.4 Solubilisation des cristaux formés par le MTT.....	31
7.3.5 Étude spectrophotométrique.....	31
8. Test de recolonisation.....	31
8.1 Protocole expérimental.....	32

8.2 Analyse d'image sur logiciel WCIF ImageJ .....	33
9. Test de formation de microtubules sur matrice extra cellulaire.....	34
9.1 Protocole expérimental de Chemicon®.....	34
10. Essai de liaison spécifique par compétition.....	36
10.1 Matériel.....	36
10.2 Méthode .....	37
Résultats et discussion .....	40
11. Relation structure/activité.....	40
12. Effet anti-tumoral.....	46
13. Effet anti-angiogène .....	48
13.1 Effet sur la prolifération des cellules endothéliales.....	48
13.1.1 Inhibition de la cytotoxicité par le sérum fœtal bovin .....	50
13.2 Effet sur la migration des cellules endothéliales.....	51
13.3 Effet sur la capacité des cellules endothéliales à former des microtubules .....	53
14. Affinité aux récepteurs CB <sub>2</sub> .....	54
Conclusions .....	58

## Liste des tableaux

Tableau 1. Paramètres physicochimiques des molécules.....	43
---	----

## Liste des figures

Figure 1. Structures d'endocannabinoïdes .....	2
Figure 2. Feuille de Cannabis sativa .....	2
Figure 3. Structures de phytocannabinoïdes .....	3
Figure 4. Superposition des structures de THC, AEA et 2-AG .....	4
Figure 5. Structure du nabilone .....	5
Figure 6. Structures de cannabinoïdes synthétiques .....	6
Figure 7. Structure bidimensionnelle du récepteur CB <sub>1</sub> (d'après Shim J.Y. et al.).....	7
Figure 8. Structure bidimensionnelle du récepteur CB <sub>2</sub> (d'après Xie X.Q. et al.).....	8
Figure 9. Les thermo TRPs et leurs ligands naturels (d'après Szallasi A. et al.).....	9
Figure 10. Schéma d'un vaisseau sanguin (d'après le mémoire de Lejmi E.) .....	13
Figure 11. Principales étapes de l'angiogénèse (d'après la thèse de Hammady T.).....	14
Figure 12. Les endocannabinoïdes dans l'immunité innée (d'après Klein T.W. et al.) .....	16
Figure 13. Effets anti-inflammatoires de traitements à base de cannabinoïdes (d'après Klein T.W. et al.).....	18
Figure 14. Structures des nouveaux analogues synthétiques .....	20
Figure 15. Recolonisation 24h après dénudation d'une zone médiane (microscope inversé x10) .....	32
Figure 16. Courbe typique de compétition.....	38
Figure 17. Modélisation de 4 composés oxygénés. ....	40
Figure 18. Modélisation du composé oxygéné O2 .....	41
Figure 19. Modélisation des composés azotés .....	42
Figure 20. Equilibre d'ionisation de N2.....	44
Figure 21. Identification de pharmacophore sur le THC .....	45
Figure 22. Effet des composés oxygénés sur la prolifération des cellules U373 après 2 jours .....	46
Figure 23. Effet des composés azotés sur la prolifération des cellules U373 après 4 jours. ....	47
Figure 24. Effet des composés oxygénés sur la prolifération des U373 après 4 jours .....	47

Figure 25. Effet des composés oxygénés sur la prolifération des HUVEC après 4 jours....	48
Figure 26. Effet des composés azotés sur les cellules EAhy 926 après 2 jours. ....	50
Figure 27. Test de prolifération avec FBS dans le milieu de culture après 4 jours. ....	51
Figure 28. Effet des composés oxygénés sur la migration des cellules endothéliales.....	52
Figure 29. Test de formation de microtubules sur ECM avec les cellules EAhy926 (microscope inversé x10) .....	53
Figure 30. Courbes de compétition entre le [ <sup>3</sup> H] CP55, 940 et les molécules non marquées suivantes: WIN55212, 2, N1, N2, O1, O2, O3, O4, O5.....	55
Figure 31. Comparaison entre la structure de la molécule O3 et d'autres molécules ayant une haute affinité aux CB <sub>2</sub> .....	56

## Liste des abréviations

SNC : système nerveux central

THC:  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol

CBD: cannabidiol

CBN: cannabinol

AEA : arachidonylethanolamide ou anandamide

2-AG : 2-arachidonoylglycerol

EMAs : acide élmirique

OEA : oleyletanolamide

PEA : palmitoyletanolamide

CB<sub>1</sub> : récepteur cannabinoïde de type 1

CB<sub>2</sub> : récepteur cannabinoïde de type 2

TRPV<sub>1</sub>: *transient receptor potential vanilloid type 1 receptor*

K<sub>D</sub> : constante de dissociation

B<sub>max</sub> : densité de sites spécifiques

IC<sub>50</sub> : concentration inhibitrice 50%

GBM : glioblastomes multiformes

VEGF: facteur de croissance endothéliale vasculaire

EGF : facteur de croissance endothéliale

MPM2 : métallo-protéinase matricielle-2

TLRs : récepteurs de type Toll

NF- $\kappa$ B : facteur nucléaire Kappa-B

TNF : facteur de nécrose tumorale

NMDA : récepteur N-méthyl-D-aspartate

IL-1 $\beta$  : interleukine-1 $\beta$

HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine

FBS : sérum fœtal de veaux

ECM : matrice extra cellulaire

PBS : solution de tampon phosphate

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

HAT : mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine

RPM : rotations par minute

Boc : tert-butyloxycarbonyl

BSA : albumine de sérum bovin

*À mon père, qui a su me faire comprendre  
dès mon plus jeune âge l'importance des  
études et de s'y appliquer autant qu'on peut.*

*Et à ma fille, le bonheur de ma vie.*

## Remerciements

J'aimerais remercier :

Mon directeur de recherche, Pr. Patrice Hildgen, non seulement pour m'avoir fait découvrir un aspect très intéressant de la pharmacie, tout à fait différent de ce que je connaissais et qui mériterait d'être développé. Mais surtout pour son incroyable humanité et pour avoir su, mieux que quiconque, trouver les mots pour m'encourager à aller de l'avant et garder confiance en moi.

Jean-Michel Rabanel, pour m'avoir suivi durant toute ma maîtrise et avoir eu la patience et pris le temps de répondre à toutes mes questions.

Pr. Daniel Lévesque, qui a eu la gentillesse de réaliser une expérience primordiale pour mon projet dans son laboratoire.

Mon mari pour son soutien, ainsi que tous les membres de ma famille, mes amis et mes collègues qui m'ont aidée et soutenue.

# Introduction

Le chanvre, dont le nom scientifique est *Cannabis sativa*, est utilisé depuis l'antiquité comme plante médicinale. Selon la culture et la partie de la plante qui est employée d'autres noms lui ont été attribués tel que marijuana, kif, pot ou hachich. Récemment, il y a eu un regain d'intérêt pour ses nombreux effets thérapeutiques : sédatif, anesthésique, analgésique, anti-inflammatoire, anticonvulsivant, anti-tumoral, régulation des fonctions cognitives, homéostatiques, immunologiques, neurologiques...[1, 2]

En 1975, la substance psycho-active du cannabis, le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol (THC), a été reconnue comme un anticancéreux potentiel [2]. Depuis, il y a eu beaucoup de progrès dans la compréhension des propriétés pharmacologiques des cannabinoïdes. Cependant, ce n'est que dans les années 1990 que les premiers récepteurs spécifiques ont été identifiés sur des cellules de mammifères.[3]

Aujourd'hui, nous sommes confrontés à deux défis pharmacologiques d'actualité, qui sont de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables des effets psychotropes du Cannabis, et d'isoler les composants actifs responsables de ses effets thérapeutiques, afin de développer de nouvelles thérapies à base de cannabinoïdes dépourvues d'effets psychotropes.[4]

## 1. Les cannabinoïdes

On classe les cannabinoïdes selon leur origine, soit :

- Endogène : endocannabinoïdes
- Végétale : phytocannabinoïdes
- Synthétique : cannabinoïdes synthétiques

### 1.1 Les endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes sont les ligands endogènes des récepteurs cannabinoïdes [3]. Ils proviennent du métabolisme de l'acide arachidonique [2]. Ils sont synthétisés 'sur

demande' dans le système nerveux central (SNC) et les tissus périphériques puis ils sont inactivés enzymatiquement [5].

Voici quelques exemples d'endocannabinoïdes :

- Anandamide (AEA) (figure 1)
- 2-Arachidonoylglycérol (2-AG) (figure 1)
- Acide élimérique (EMAs)
- Palmitoléthanolamide (PEA)
- Oléyléthanolamide (OEA)

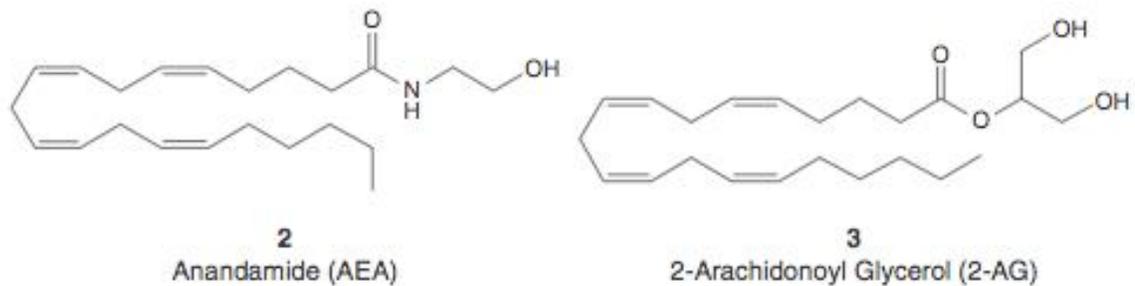


Figure 1. Structures d'endocannabinoïdes

## 1.2 Les phytocannabinoïdes

Les phytocannabinoïdes sont les substances actives extraites du chanvre et leurs dérivés [6] . On en dénombre environ 60, les plus connus sont: [4]



Figure 2. Feuille de Cannabis sativa

- **$\Delta^9$ -Tétrahydrocannabinol (THC)** : responsable des effets psychotropes et addictifs (figure 3)
- **Cannabidiol (CBD)** : représente plus de 60% des extraits de la plante, produit des effets anti-inflammatoires et démontre plutôt un effet antipsychotique, contrairement au THC (figure 3)
- **Cannabinol (CBN)** : produit des effets anti-inflammatoires (figure 3)

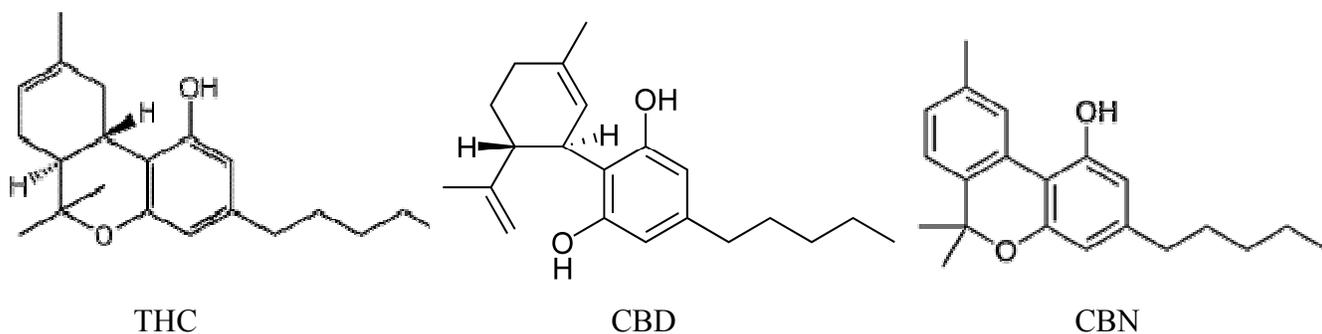


Figure 3. Structures de phytocannabinoïdes

Au premier abord, on penserait que les structures des deux endocannabinoïdes AEA et 2-AG, sont très différentes de celle du phytocannabinoïde THC et qu'il leur serait difficile d'agir sur les mêmes récepteurs. Mais en optimisant les structures du AEA et 2-AG et en les superposant sur la molécule de THC, on remarque des similitudes de structures (figure 4).

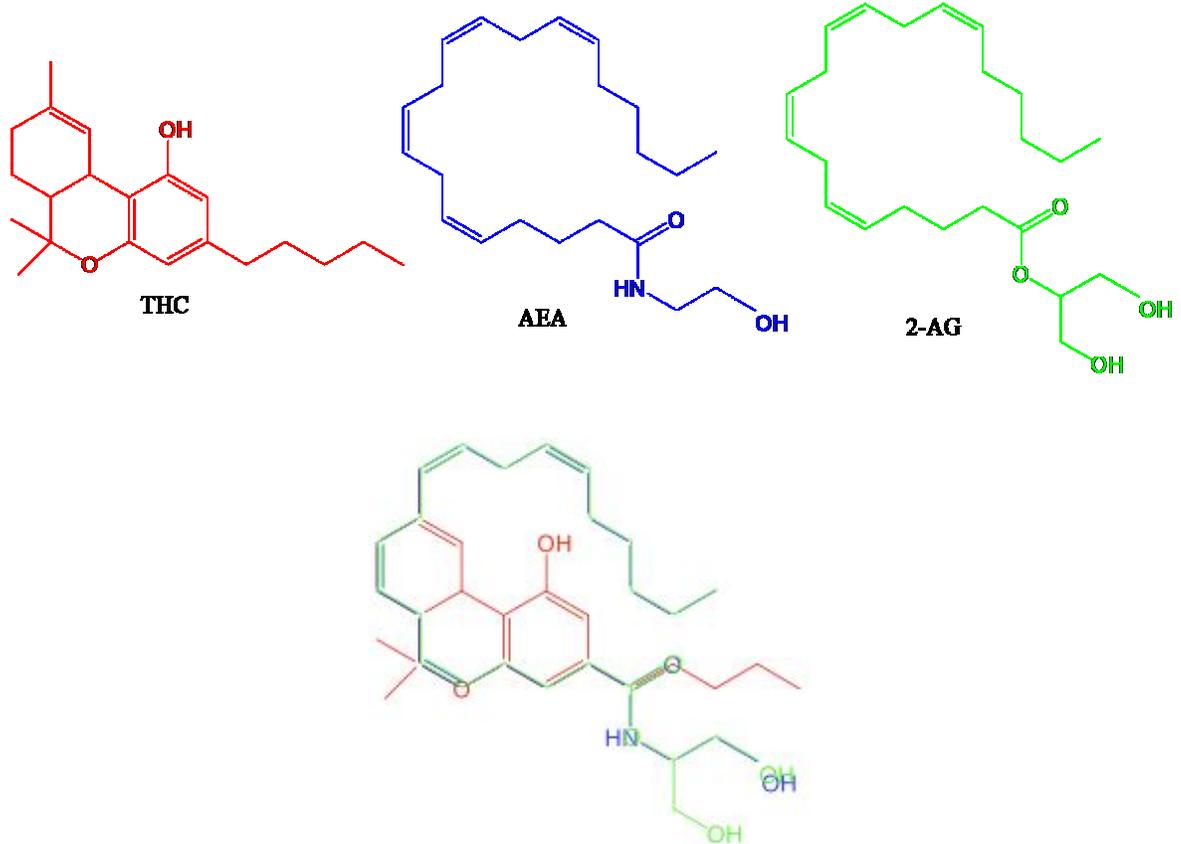


Figure 4. Superposition des structures de THC, AEA et 2-AG

### 1.3 Les cannabinoïdes synthétiques

Un des objectifs de longue date des recherches sur les cannabinoïdes a été la découverte de puissants analogues synthétiques de substances naturelles, qui pourraient être développés comme médicaments utiles dans des applications thérapeutiques. Cela nécessite, entre autres, qu'ils soient exempts des effets psychotropes qui caractérisent l'usage récréatif du Cannabis. Les cannabinoïdes synthétiques les plus connus sont :

Le **nabilone (Cesamet®)** est un analogue diméthylheptyl du THC, qui a été approuvé par la Food and Drug Administration en 1985, mais commercialisé aux USA

qu'en 2006. Il est utilisé pour le traitement, des nausées et vomissements qui ne répondent pas aux antiémétiques conventionnels en chimiothérapie, et des pertes de poids et anorexies des patients atteints du SIDA (figure 5). [7]

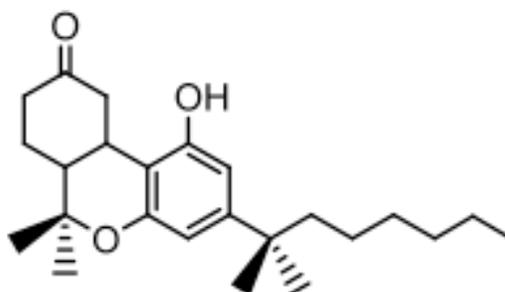


Figure 5. Structure du nabilone

Le **rimonabant (SR141716A)** de Sanofi-Aventis, est le premier antagoniste des récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB<sub>1</sub>) approuvé en Europe pour le traitement de l'obésité et la diminution des facteurs de risque cardiovasculaire et métabolique. Il a été retiré du marché en Octobre 2008 à cause de ses effets secondaires de dépression et anxiété [8]. Par la suite il y a eu d'autres tentatives pour trouver une molécule comportant les effets pharmacologiques du rimonabant, sans ses effets secondaire. Le taranabant, un antagoniste des récepteurs CB<sub>1</sub>, a été mené jusqu'en étude clinique par Merk, mais elles ont révélées des symptômes d'anxiété et dépression chez un petit pourcentage de patients, ce qui a mis fin aux études [9, 10]. Le développement d'autres antagonistes des récepteurs CB<sub>1</sub> comme l'ibipinabant (BMS/Solvay) [11], le surinabant (Sanofi-Aventis) [12], et l'otenabant (Pfizer) [13]a aussi été avorté.

L'**Acide ajulemique (AJA, CT3, ou IP751)** agit sur les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> [5], et possède des propriétés analgésiques sans montrer d'effets psychotropes [14] (figure 6).

Le terme 'cannabinoïde classique' réfère aux molécules tricycliques ressemblant au THC (comme la nabilone et l'acide ajulemique). Des efforts mis en œuvre pour simplifier

la structure tricyclique du THC, afin de garder ou améliorer son activité biologique, ont donnés naissance à une nouvelle classe de cannabinoïdes : ‘les cannabinoïdes non classiques’. Ces derniers n’ont pas de cycle pyranne [5]. Le plus connu est le **CP55, 940** qui se lie aux récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> et possède des effets immuno-modulateurs et diminue les dyskinésies orales [15, 16] (figure 6).

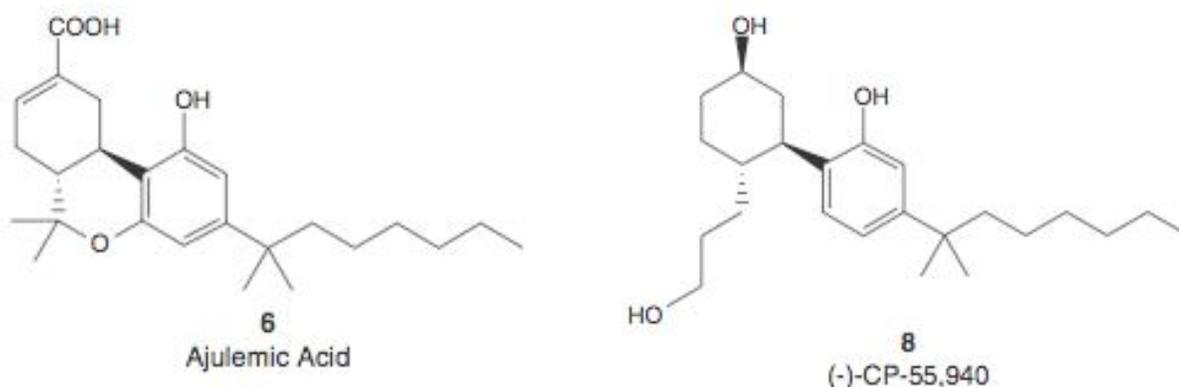


Figure 6. Structures de cannabinoïdes synthétiques

## 2. Les récepteurs cannabinoïdes

Les cannabinoïdes activent plusieurs types de récepteurs. À ce jour, trois d’entre eux ont été identifiés par clonage moléculaire : CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, et *transient receptor potential vanilloid type 1 receptor* (TRPV<sub>1</sub>). Les plus connus, CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>, sont des récepteurs couplés à des protéines G possédant 7 domaines trans-membranaires et partageant 44% d’identité protéique (figures 7 et 8).[17]

## 2.1 CB<sub>1</sub> : récepteur cannabinoïde de type 1

Les récepteurs cannabinoïdes de type 1 sont exprimés essentiellement dans le cerveau et quelques tissus périphériques (testicules, cœur, endothélium vasculaire, cellules immunes)[17]. Ils provoquent les effets psychotropes que l'on veut éviter. Leur rôle principal consiste en l'inhibition du relargage de neurotransmetteurs, comme la dopamine, le glutamate et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) [18]. L'importance fondamentale des CB<sub>1</sub> est que leurs antagonistes et agonistes inverses ont un grand potentiel dans la thérapie de l'addiction aux drogues et du syndrome métabolique (exemple : le rimonabant, ayant été commercialisé pour la thérapie de l'obésité) [17, 19]. Au Canada, un spray oro-muqueux contenant un agoniste du CB<sub>1</sub> est approuvé. Il s'agit du Sativex, qui est un extrait de plante de Cannabis, cultivée spécialement pour contenir à peu près la même proportion de THC et de cannabidiol, un cannabinoïde non psycho-actif qui module l'activité du THC *in vivo*. Le Sativex est utilisé pour alléger les douleurs neuropathiques et les paralysies spasmodiques dues aux scléroses multiples [20].

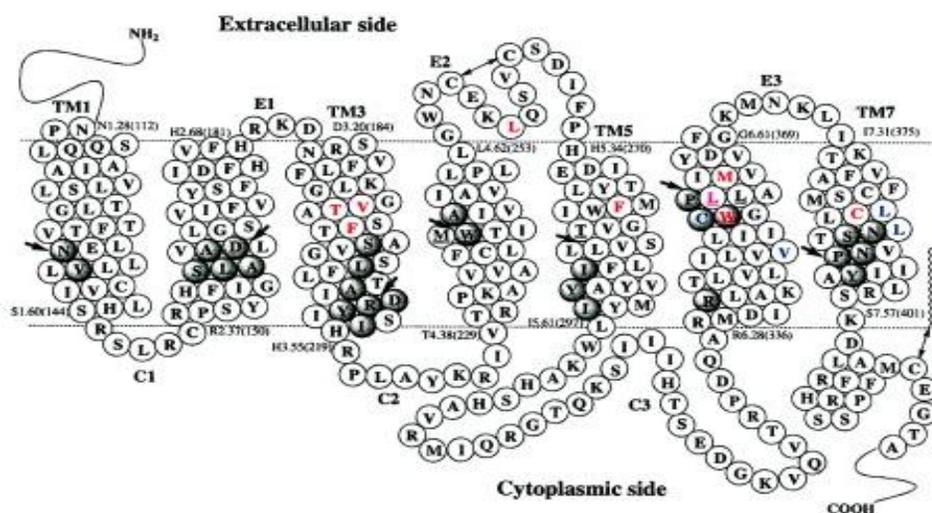


Figure 7. Structure bidimensionnelle du récepteur CB<sub>1</sub> (d'après Shim J.Y. et *al.*)

## 2.2 CB<sub>2</sub> : récepteur cannabinoïde de type 2

Les récepteurs cannabinoïdes de type 2 sont exprimés essentiellement par les cellules du système immunitaire, mais aussi par les cellules hématopoïétiques, par le SNC lors d'épisodes inflammatoires, et par les cellules endothéliales des glioblastomes [21]. Les agonistes des CB<sub>2</sub> diminueraient l'inflammation en favorisant la prolifération et le recrutement de cellules immunitaires, par des mécanismes encore mal connus [4, 22]

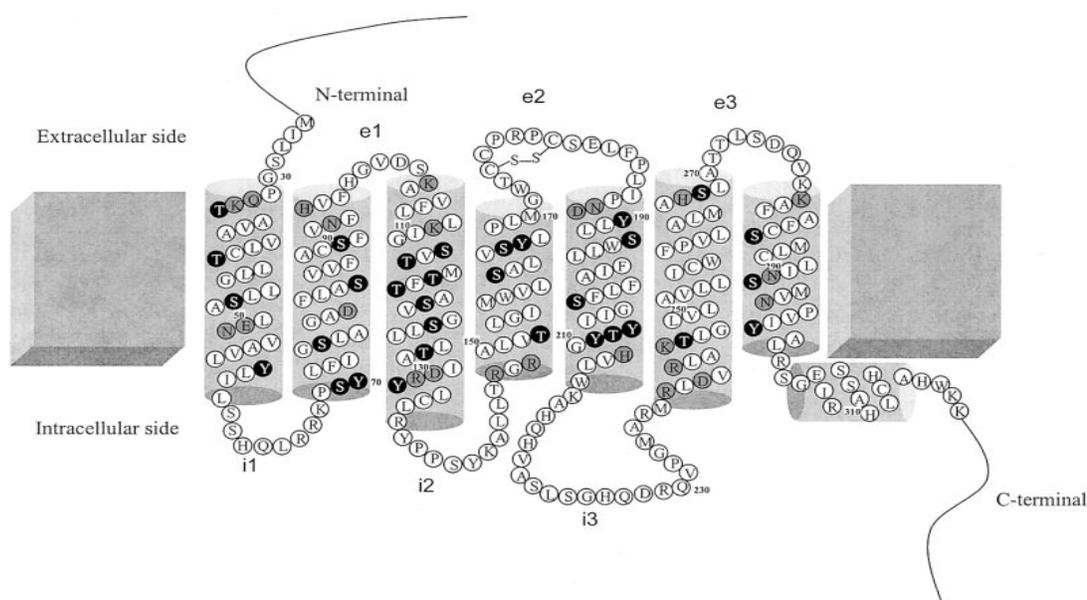


Figure 8. Structure bidimensionnelle du récepteur CB<sub>2</sub> (d'après Xie X.Q. et *al.*)

## 2.3 Les canaux TRP : *transient receptor potential*

Les TRP sont des canaux ioniques non-sélectifs avec une préférence pour le calcium. Ce sont des protéines constituées de six domaines trans-membranaires avec un espace entre les domaines 5 et 6. Les terminaisons amines et carboxyles sont dirigées vers le cytoplasme. Les canaux avec des ankyrines répétées – domaines protéiques répétés – dans leur chaîne amine terminal sont indiqués dans la figure 9. Les canaux TRP sont classés en plusieurs sous-familles, dont les récepteurs cités ci-dessous sont activés par certains cannabinoïdes : [23, 24]

- TRPV<sub>1</sub> et TRPV<sub>2</sub> *transient receptor potential vanilloid-type 1 and 2* : le TRPV<sub>1</sub> est activé par la capsaïcine, qui est responsable du goût piquant du piment rouge.
- TRPM<sub>8</sub> *transient receptor potential melastatin-type 8* : activé par le menthol, qui est l'ingrédient actif de la menthe verte.
- TRPA<sub>1</sub> *transient receptor potential ankyrin-type 1* : activé par des composés âcres comme le cinnamaldéhyde, les isothiocyanates et l'allicine, qui sont les ingrédients actifs de la cannelle, du raifort et de l'ail, respectivement.

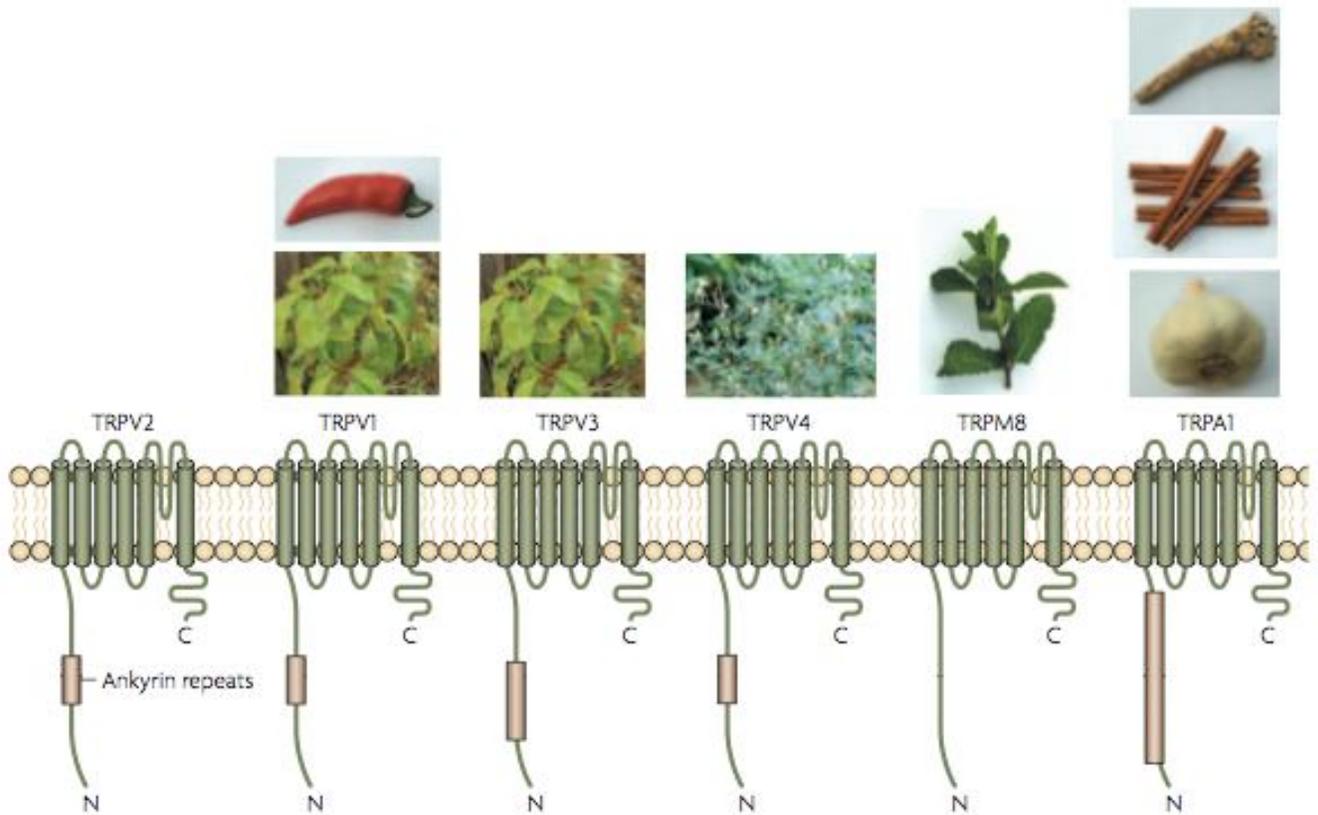


Figure 9. Les thermo TRPs et leurs ligands naturels (d'après Szallasi A. et *al.*)

Ces récepteurs sont appelés « canaux thermo TRPs » car ils sont aussi activés par les changements de température et sont surtout exprimés dans le système nerveux et les kératinocytes de la peau.

## **2.4 GPR55 et GPR119 : nouveaux récepteurs cannabinoïdes**

Les GPR55 et GPR119 sont deux récepteurs couplés à des protéines G, considérés comme de nouveaux récepteurs cannabinoïdes dont l'étude est en cours [17]. Le GPR55 est exprimé dans le cerveau et plusieurs tissus périphériques [5]. Le GPR119 est surtout exprimé dans le pancréas et le tractus gastro-intestinal. Il semble jouer un rôle dans la sécrétion de l'insuline par les cellules pancréatiques- $\beta$  [24].

## **3. Effets des cannabinoïdes**

### **3.1 Le système endocannabinoïde**

On nomme « système endocannabinoïde » l'ensemble :

- des récepteurs cannabinoïdes
- des endocannabinoïdes
- et des enzymes responsables de la biosynthèse et inactivation des endocannabinoïdes

C'est un système important qui régule plusieurs fonctions biologiques (cardiovasculaire, nerveuse, digestive, métabolique, reproductive et immune) et il intervient dans plusieurs pathologies (douleurs et inflammation, glaucome, désordres neurodégénératifs). Les études montrent qu'il exerce plusieurs effets, comme la diminution de la contractilité cardiaque, la vasorelaxation, la neuroprotection au cours d'épisodes neurologiques aigus et chroniques, et des effets anti-inflammatoires [2]. De ce fait, les cannabinoïdes ont un grand potentiel thérapeutique. Voici quelques uns de leurs effets ayant un intérêt clinique :

- Anti-tumoral
- Anti-angiogène
- Immuno-modulateur
- Anti-inflammatoire

### 3.2 Effet anti-tumoral

Les cannabinoïdes sont testés depuis plusieurs décennies comme traitement palliatif chez les patients cancéreux [2]. Aujourd'hui des capsules de THC (dronabinol, Marinol®) et ses analogues synthétiques (nabilone, Cesamet®) sont approuvées au Canada et dans plusieurs autres pays, pour traiter les nausées et vomissements associés à la chimiothérapie [25]. En plus de leurs effets palliatifs, un grand nombre de dérivés ont montré des effets antiprolifératifs sur plusieurs types de cellules tumorales en culture:

- naturels : comme le THC et le CBD
- synthétiques : WIN-55,212-2 et HU-210
- endogènes : AEA, 2-AG

Des études ont démontrés que l'administration de cannabinoïdes à des souris de souche *nude*, diminue la croissance de plusieurs types de tumeurs xéno greffées, comme les carcinomes du poumon, de la peau, de la thyroïde, les lymphomes et les glioblastomes. **Les glioblastomes multiformes (GBM)**, ou astrocytomes de stade IV, sont des tumeurs développées à partir de cellules astrocytaires, représentant la classe de tumeurs malignes primitives du cerveau la plus fréquente et la plus agressive. D'ailleurs leur traitement n'est que palliatif, et l'espérance de vie après le diagnostic est inférieure à un an [26].

Les cannabinoïdes ont un effet apoptotique sélectif sur les tumeurs, car ils agissent différemment sur les cellules cancéreuses, comparativement aux cellules saines :

- ils déclenchent des cascades enzymatiques différentes dans les cellules transformées [27]

- les récepteurs cannabinoïdes sont exprimés différemment sur les cellules transformées qualitativement et quantitativement [28]
- les cellules répondent différemment aux cannabinoïdes selon leur stade de différenciation [29]

De façon contradictoire aux résultats précédents il a été montré que les cannabinoïdes peuvent aussi induire la prolifération tumorale, par exemple :

- en induisant le clivage des précurseurs des facteurs de croissance endothéliale (EGF) à des concentrations de  $1/10^6$  des concentrations pro-apoptotiques (ce qui peut se produire dans les traitements intermittents) [30]
- si les tumeurs expriment les récepteurs cannabinoïdes, les cellules cancéreuses et immunitaires seront visées par les cannabinoïdes ce qui mènera à leur destruction [31]

Le fait que les mêmes composés ont parfois des effets opposés, pourrait aussi être expliqué par la multitude de voies qu'ils peuvent enclencher. En effet, les effets des cannabinoïdes sont provoqués non seulement par les récepteurs cannabinoïdes mais aussi par les TRPV<sub>1</sub> et les *lipid rafts* - domaines membranaire riches en cholestérol, sphingolipides, acide arachidonique et plasményléthanolamine [32]- qui semblent jouer un rôle dans la biosynthèse et le recyclage des endocannabinoïdes [2].

Il semblerait que les microenvironnements tumoraux régulent l'expression des récepteurs cannabinoïdes [2]. Par exemple, dans le cas des glioblastomes, on observe une augmentation d'expression des CB<sub>2</sub> en fonction de la malignité de la tumeur, alors qu'ils sont normalement absents du cerveau [33]. Selon une étude menée par Cudaback E. et al, l'augmentation de l'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> s'oppose à l'effet apoptotique des cannabinoïdes sur les astrocytomes. Ceci en déclenchant une autre voie signalétique que celle qui l'est lorsque l'expression des récepteurs est normale [34].

### 3.3 Effet anti-angiogène

#### 3.3.1 Définition de l'angiogénèse

L'angiogénèse est un mécanisme de néo-vascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant, elle se déroule en deux phases successives, la croissance de néo-vaisseaux et la stabilisation de ces derniers : [35]

1. Dans la phase initiale, la membrane basale et la matrice interstitielle entourant le vaisseau « mère » se résorbent. Les cellules endothéliales migrent à travers l'espace créé vers le signal angiogénique, qui est représenté par les facteurs proangiogénique comme le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et l'angiopoïétine-2. Enfin, elles prolifèrent pour former de nouveaux vaisseaux.

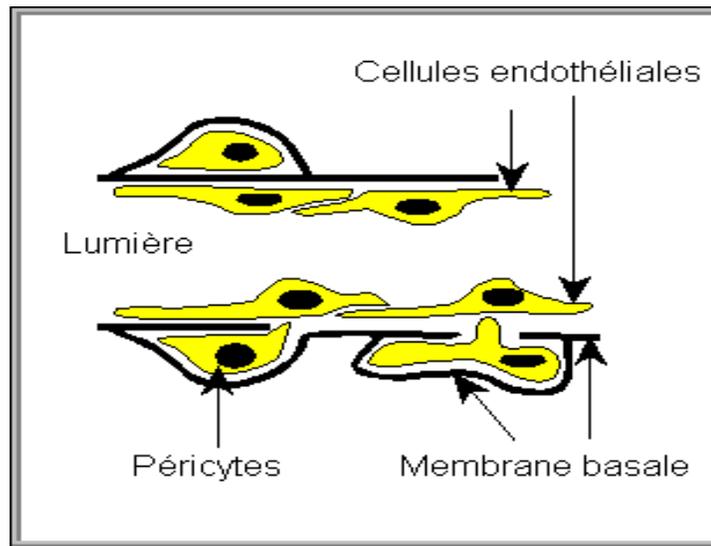


Figure 10. Schéma d'un vaisseau sanguin (d'après le mémoire de Lejmi E.)

2. La phase de stabilisation commence lorsque les cellules endothéliales arrêtent de proliférer, il y a formation d'une lame basale autour du nouveau vaisseau, qui est ensuite recouvert de péricytes.

Le processus de l'angiogénèse est impliqué dans de nombreuses pathologies comme la rétinopathie vasculaire, l'arthrite rhumatoïde et le cancer. [35]

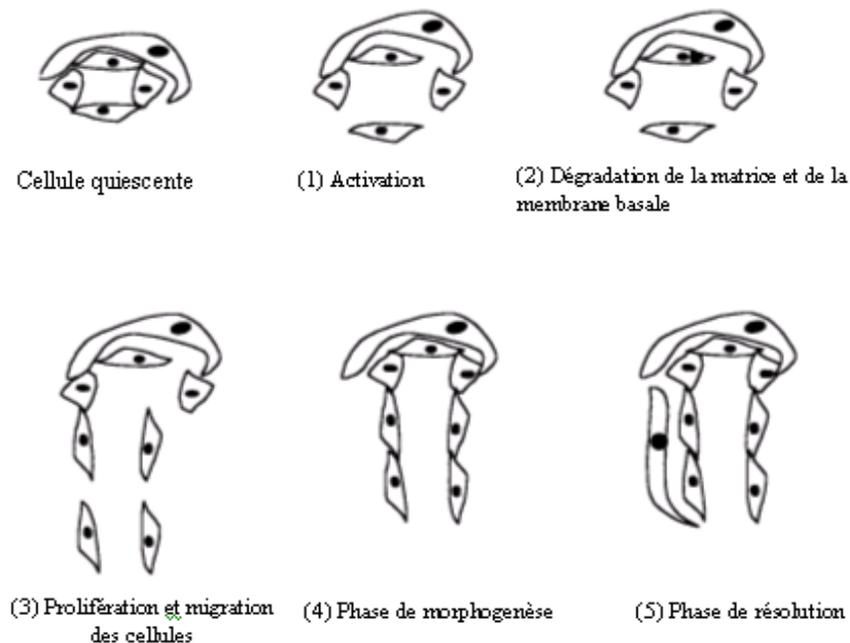


Figure 11. Principales étapes de l'angiogénèse (d'après la thèse de Hammady T.)

### 3.3.2 Mécanismes d'inhibition de l'angiogénèse

Il a été montré que les cannabinoïdes inhibent l'angiogénèse par, au moins, deux mécanismes impliquant les récepteurs CB: [36]

1. L'inhibition directe de la migration et/ou la prolifération des cellules endothéliales
2. La diminution de l'expression des facteurs proangiogéniques (VEGF, angiopoïétine-2) et la métallo-protéinase matricielle-2 (MPM2)

### **3.4 Relation tumeur/angiogénèse**

L'induction de l'angiogénèse par une tumeur est essentielle pour :

1. l'obtention des éléments nutritifs et de l'oxygène nécessaires à sa croissance
2. l'élimination des déchets
3. le passage de cellules métastatiques dans la circulation

Ainsi, les cellules cancéreuses augmentent spectaculairement leur production de facteurs proangiogéniques (VEGF, angiopoïétines 1 et 2), soit à la suite d'une stimulation par les conditions hypoxiques, ou encore par l'activation de certains oncogènes. On observe alors une baisse concomitante de production d'inhibiteurs de l'angiogénèse comme la thrombospondine et l'angiostatine. Les tumeurs en croissance produisent aussi des métalloprotéinases matricielles (MPMs) qui permettent la lyse puis la reconstitution tissulaire pendant l'angiogénèse et l'invasion. Il résulte de tous ces processus une néo-vascularisation intensive qui permet à la tumeur de croître dans le tissu hôte et, éventuellement, de coloniser des sites secondaires. [37]

### **3.5 Effet immuno-modulateur et anti-inflammatoire**

Lors de l'infection d'un tissu, le pathogène stimule les lymphocytes, les cellules dendritiques et les macrophages grâce à des récepteurs capables de les reconnaître comme les récepteurs de type Toll (TLRs). Ainsi, les cellules immunes activées produisent des cytokines et des chimiokines, qui attirent les leucocytes au foyer inflammatoire. Ces cellules libèrent aussi des endocannabinoïdes comme l'AEA et le 2-AG qui sont aussi chimiotactiques pour les leucocytes. Ces derniers, avec toutes les autres cellules immunes, envahissent le site de l'inflammation afin d'éliminer les micro-organismes et d'établir une réponse immune adaptée. Les cellules immunes activées sur-expriment les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>, ce qui amène à penser qu'ils participent alors à la réponse immune innée. Étant des récepteurs couplés à des protéines G (tout comme les récepteurs des chimiokines et autres

médiateurs lipidiques), leur liaison pendant la réponse immune mène probablement à la régulation de la production de médiateurs immuns.[38]

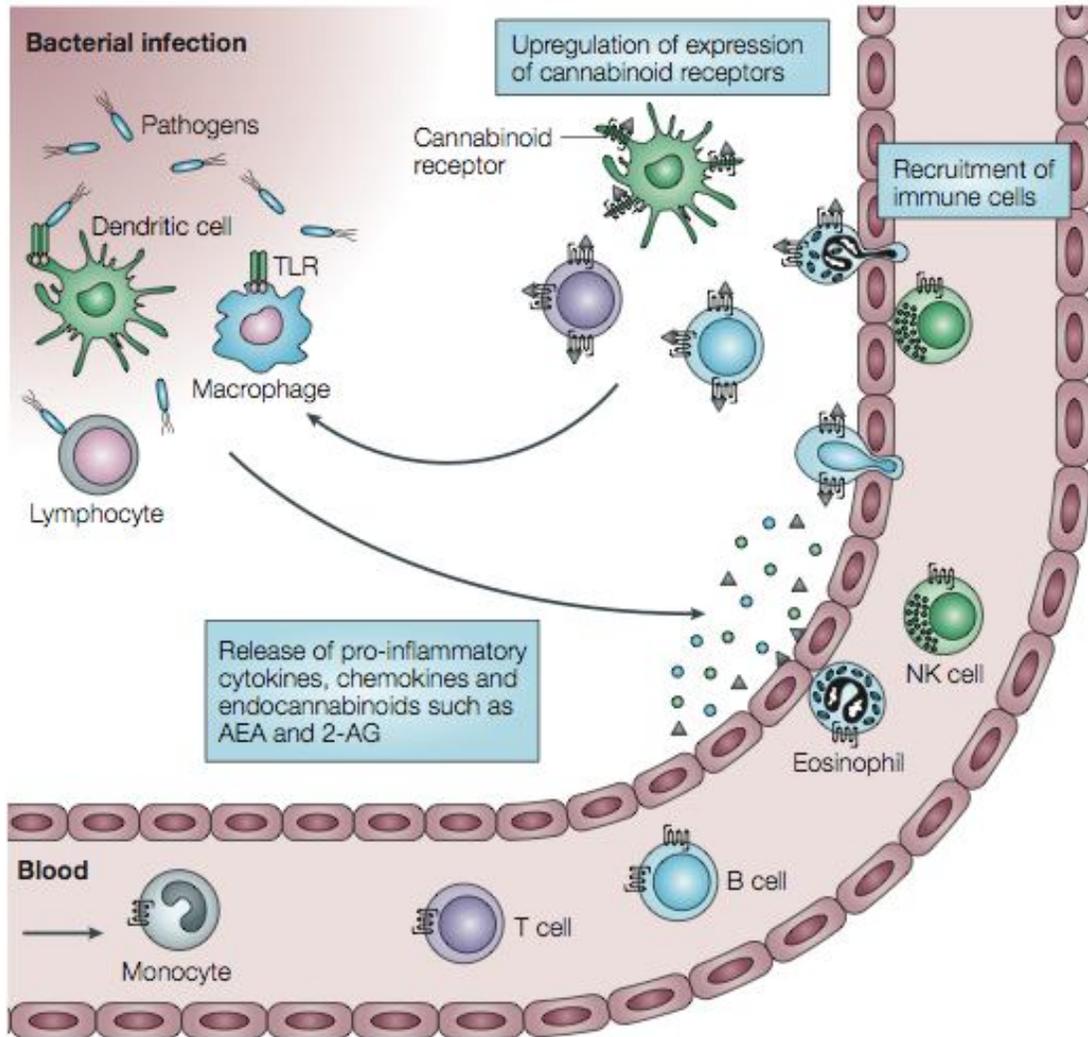


Figure 12. Les endocannabinoïdes dans l'immunité innée (d'après Klein T.W. et *al.*)

Les cannabinoïdes atténuent l'inflammation par plusieurs mécanismes dont beaucoup ne sont pas encore élucidés. L'un d'entre eux consiste en la diminution de la production d'agents pro-inflammatoires par des voies mal connues, qui ne semblent pas impliquer les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. Il semblerait, par exemple, que le CBD diminue

l'activité de la voie du facteur nucléaire Kappa-B (NF- $\kappa$ B) qui régule l'expression de gènes pro-inflammatoires. [39]

Ainsi, il serait possible d'utiliser les cannabinoïdes pour le traitement de plusieurs maladies inflammatoires, car ils : [38]

1. Atténuent les **symptômes de neuro-dégénérescence**, en se liant, au moins en partie, aux récepteurs cannabinoïdes. Il en résulte, une augmentation de libération des corticostéroïdes et une diminution des T helper 1 (T<sub>H</sub>1) ainsi que de la production de neuromédiateurs immuns (histamine, facteur de nécrose tumorale « TNF »)
2. Éliminent les **œdèmes cérébraux traumatiques**, en se liant, au moins en partie, aux récepteurs cannabinoïdes. Il en résulte une diminution du stress oxydatif, de liaison aux récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), et de la production de cytokines (TNF).

**Récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA):** le NMDA est un acide aminé synthétique qui a une affinité pour les récepteurs NMDA, qui produisent des effets excitants sur le cerveau quand ils sont stimulés par des ligands endogènes comme l'acide glutamique. Une stimulation excessive pourrait entraîner un processus pathologique d'altération et de destruction neuronale nommée excitotoxicité.

3. Suppriment la physiopathologie des **maladies inflammatoires de l'intestin** en se liant aux récepteurs cannabinoïdes. Il en résulte un ralentissement du transit gastro-intestinal, une diminution de production de prostaglandines et d'oxyde nitrique
4. Atténuent l'inflammation associée à l'**arthrite** par une voie indépendante des récepteurs cannabinoïdes. Il en résulte une diminution de production de prostaglandines, de cellules et de médiateurs immuns (interleukine-1 $\beta$  « IL-1 $\beta$  » et TNF)
5. Régulent partiellement les **maladies vasculaires inflammatoires** en se liant aux récepteurs cannabinoïdes et en provoquant une vasodilatation. Ceci se passe en même temps avec une diminution locale de production de médiateurs pro-

inflammatoires (myéloperoxydase, CXC-chimiokine ligand 8, IL-1 $\beta$ , TNF) par des mécanismes récepteurs cannabinoïdes dépendants et indépendants.

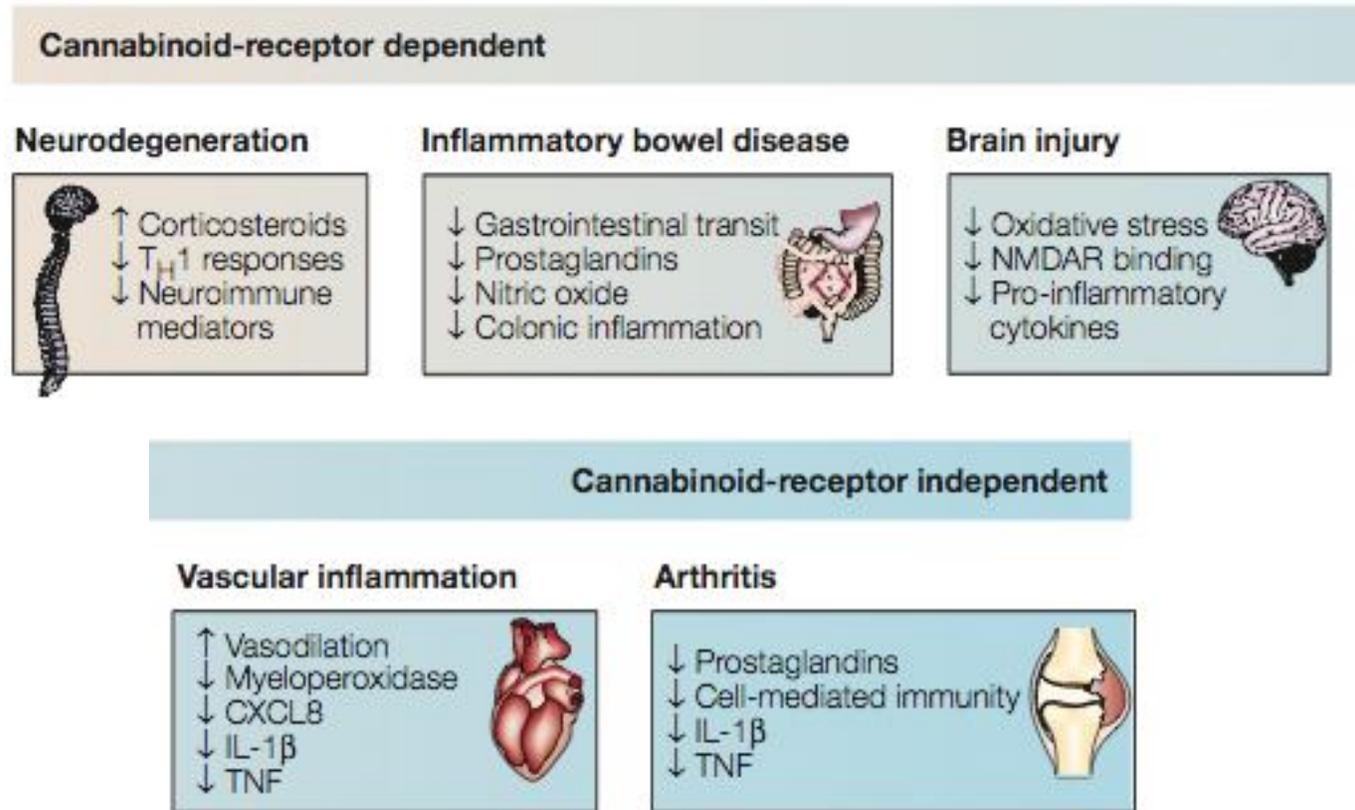


Figure 13. Effets anti-inflammatoires de traitements à base de cannabinoïdes  
(d'après Klein T.W. et *al.*)

#### 4. Nouveaux analogues synthétiques des cannabinoïdes

Une série de nouveaux analogues des cannabinoïdes, notamment du THC, a été synthétisée [40]. Cette série comporte cinq dérivés oxygénés dont deux à trois cycles trois à deux cycles :

- **O1** : 6a,7,8,10a-tétrahydro-2-méthoxy-6,6,9-triméthyl-6*H*-benzo[*c*]chromène
- **O2**: 2-méthyl-2-(4-méthylpent-3-ènyle)-2*H*-chromène
- **O3** : 6a,7,8,10a-tétrahydro-6,6,9-triméthyl-6*H*-benzo[*c*]chromène
- **O4**: 6-méthoxy-2-méthyl-2-(4-méthylpent-3-ènyle)-2*H*-chromène
- **O5**: (2-méthyl-2*H*-chromène-2-yl) méthanol

Ainsi que deux dérivés azotés à trois cycles :

- **N1** : *tert*-butyl 6a,7,10,10a-tétrahydro-6,6,9-triméthylphénanthridine-5(6*H*)-carboxylate
- **N2** : 5, 6,6a, 7, 10,10a-hexahydro-6, 6,9-triméthylphénanthridine

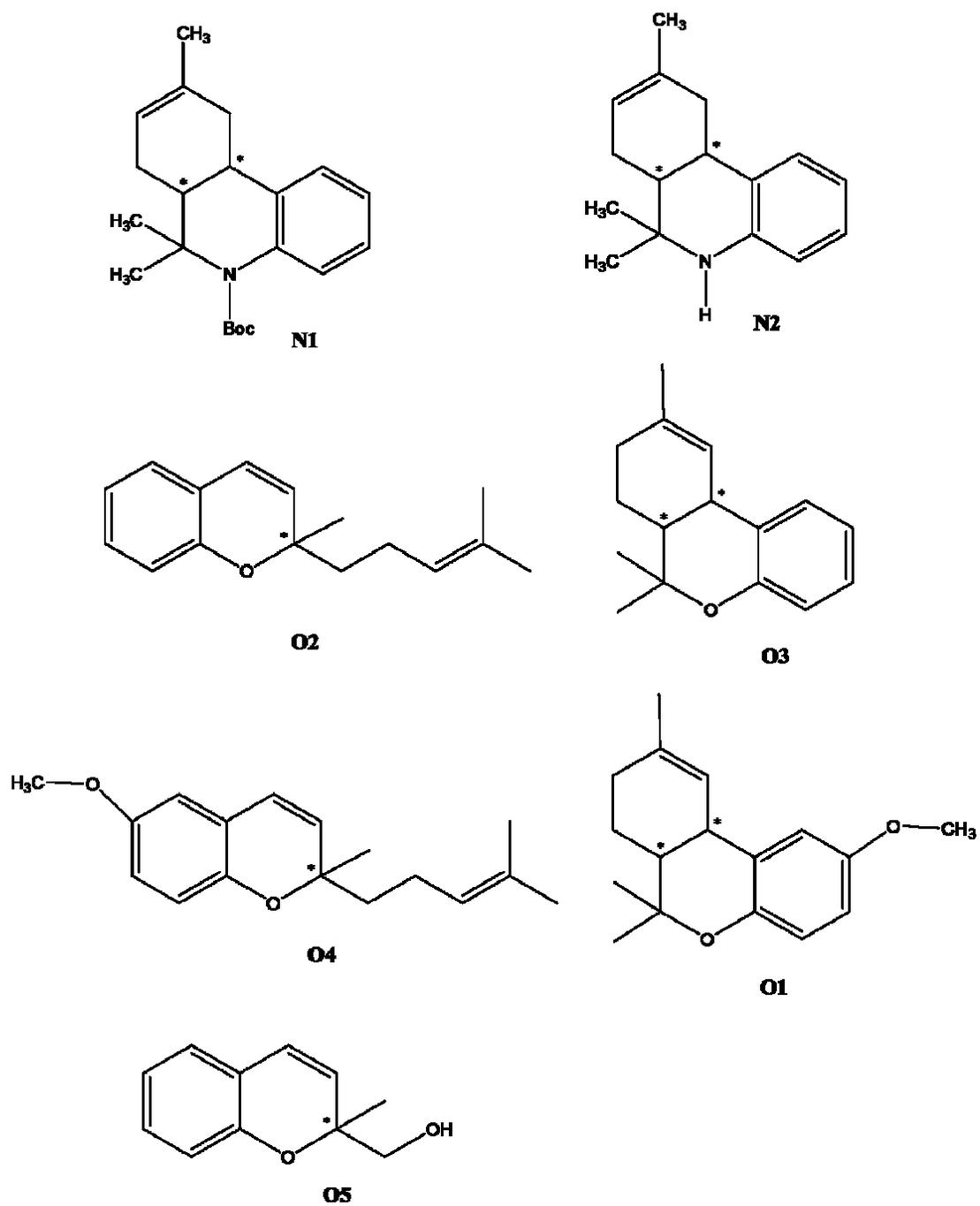


Figure 14. Structures des nouveaux analogues synthétiques

## 5. Hypothèse et objectifs

Les molécules O1, O2, O3, O4, O5, N1 et N2 ont été synthétisées dans le laboratoire du Pr. Françoise Zammato en France, en s'inspirant de la structure de cannabinoïdes connus. Nous postulons que : « *Ces nouveaux analogues synthétiques des cannabinoïdes ont des effets spécifiques sur les récepteurs CB<sub>2</sub>, en particulier l'inhibition de la croissance de certaines cellules tumorales, ainsi que des cellules endothéliales pendant la néo-angiogénèse* ».

La spécificité vis-à-vis des récepteurs CB<sub>2</sub> implique une absence d'activité sur les récepteurs CB<sub>1</sub> et de ce fait, l'élimination des effets psychotropes que l'on veut éviter. Afin d'augmenter l'affinité de ces molécules aux CB<sub>2</sub>, elles ont été synthétisées sans groupement hydroxyle phénolique, ni chaîne latérale, ou bien, avec de courtes chaînes, comme cela a été décrit dans la littérature [41, 42].

Afin de confirmer cette hypothèse, les objectifs suivants ont été identifiés pour les 7 molécules:

1. Vérifier l'effet d'inhibition de la prolifération sur culture de cellules de glioblastomes humains
2. Vérifier l'effet anti-angiogène sur culture de cellules endothéliales humaines en pratiquant des tests de :
  - i. prolifération *in vitro*
  - ii. migration par dénudation d'une monocouche de cellules endothéliales
  - iii. formation de microtubules sur matrice extra cellulaire
3. Établir des relations structure-propriétés physico-chimiques des nouvelles molécules
4. Test de liaison spécifique aux récepteurs CB<sub>2</sub>

# Matériel et méthodes

## 6. Méthodes de culture cellulaire

On a utilisé deux types de cellules de glioblastomes (U87, U373), et deux types de cellules endothéliales :

- cellules endothéliales immortalisées de la veine ombilicale humaine HUVEC.
- cellules endothéliales EAhy 926 (lignée cellulaire dérivée de la fusion des HUVEC avec des cellules cancéreuse du poumon A549).

Tout les types de cellules choisis expriment les récepteurs CB<sub>2</sub> selon la littérature [6, 36, 43].

### 6.1 Protocole de culture des HUVEC

#### 6.1.1 Matériel

- Lignée HUVEC (CRL 1730) immortalisée (ATCC, Manassas, VA, USA)
- Milieu de culture de base F12 (Kaighn's modified) (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Héparine (Grade I-A, de muqueuse intestinale de porc, H-3149 ou H3392, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- Supplément de croissance de cellules endothéliales (de tissu neural bovin, E-2759, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- Sérum fœtal de veaux (FBS) (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Mélange Pénicilline/Streptomycine (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Boîte de culture à surfaces traitées T75 bouchon jaune ventilé, ou Boîte de culture non traitées T75 bouchon rouge ventilé à traiter à la gélatine (Sarstedt, Montréal, QC, Canada)
- Solution sterile trypisne/EDTA (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)

## 6.1.2 Méthode

### 6.1.2.1 Préparation des boîtes de culture en les traitant à la gélatine

Pour préparer la solution de gélatine à 0,2 %, il faut dissoudre 10 mg de gélatine en poudre dans 50 ml de solution de tampon phosphate (PBS) préalablement chauffé au bain marie à 50 °C pendant 30 minutes. Après avoir filtré la solution de gélatine à 0,22 µm, on dépose 5 ml de solution de gélatine dans chaque boîte de culture, et on laisse reposer pendant 5 minutes sous hotte à flux laminaire. Puis on aspire le surplus de gélatine avec une pipette, surplus qui peut être réutilisé.

### 6.1.2.2 Milieu de culture

Le milieu de culture est constitué d'un milieu de base F12 auquel on ajoute 0,12 mg/ml d'héparine, 30 à 50 µg/ml de supplément de croissance pour cellules endothéliales, 1 % de mélange pénicilline/streptomycine et 15 % de sérum fœtal de veaux. La solution d'héparine doit être reconstituée préalablement, filtrée à 0,22 µm et séparée en aliquots à 0,5 ml.

Ainsi on a besoin des volumes suivants pour 50 ml de milieu de culture complet:

- Milieu F12 .....41 ml
- FBS .....7,5 ml
- Héparine.....0,5 ml
- Supplément de croissance de cellules endothéliales .....0,5 ml
- Pénicilline/Streptomycine.....0,5 ml

### 6.1.2.3 Passages

Le contenu d'une boîte de culture est divisé en deux lorsque les cellules sont à confluence, ce qui veut dire qu'elles forment un tapis de cellules.

Pour effectuer un passage, il faut commencer par jeter le milieu de culture contenu dans la boîte en l'aspirant sans toucher les cellules. Puis rincer la surface des cellules avec du milieu F12 pour enlever toute trace de sérum car il inhibe la trypsine. Détacher les cellules en ajoutant 2 ml de trypsine/EDTA et incuber pour 2 à 4 minutes à 37 °C, cela accélère l'action de l'enzyme pour détacher les cellules. Vérifier le détachement au microscope inversé. Lorsque les cellules sont toutes détachées, ajouter 8 ml de milieu de culture complet dans la boîte, et s'assurer d'une bonne dispersion des cellules dans le volume total de 10 ml, avant de l'aspirer et de les répartir équitablement dans deux nouvelles boîtes. Indiquer sur chaque boîte le nom de la lignée cellulaire, la date de début de culture, le numéro et la date du passage, et enfin incuber à 37 °C.

Généralement les passages s'effectuent tous les 3 à 4 jours.

Remarque : un passage peut prendre 7 à 15 jours même si la prolifération est correcte. Le ratio pour ensemercer une nouvelle boîte ne doit pas être plus dilué que  $\frac{1}{2}$  ou  $\frac{1}{3}$ , car les cellules semblent avoir du mal à pousser à plus faible concentration.

## 6.2 Culture des cellules de glioblastomes « U87 et U373 »

### 6.2.1 Matériel

- Lignée cellulaire U87 (ATCC, HTB-14) OU lignée cellulaire U373 (gracieusement offert par le laboratoire du Pr. JF Bouchard, Université de Montréal)
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) avec Na pyruvate (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Sérum fœtal de veaux (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)

- Acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Mélange Pénicilline/Streptomycine (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Boîte de culture T75 bouchon rouge ventilé (Sarstedt, Montréal, QC, Canada)
- Solution sterile trypisne/EDTA (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)

### 6.2.2 Méthode

La méthode est sensiblement la même que pour les HUVEC, voici les différences :

#### 6.2.2.1 Boîtes de culture

Il n'est pas nécessaire de traiter les boîtes de culture à la gélatine.

#### 6.2.2.2 Milieu de culture

Pour 50ml de milieu de culture complet :

- DMEM avec Na pyruvate ..... 44 ml
- FBS..... 5 ml
- Acides aminés non essentiels ..... 0,5 ml
- Pénicilline/Streptomycine.....0,5 ml

#### 6.2.2.3 Passages

Les cellules arrivent à confluence beaucoup plus rapidement que les HUVEC, le repiquage se fait environ une fois par semaine, et le changement de milieu deux fois par semaine. La technique est la même que pour les HUVEC.

## 6.3 Culture des cellules endothéliales immortalisées EAhy 926

### 6.3.1 Matériel

- Lignée EAhy926 (gracieusement offerte par le laboratoire Pr Claing, Université de Montréal)
- Milieu DMEM 4,5 g glucose, avec L-glutamine et pyruvate de sodium (Wisent, St-Bruno, QC, Canada)
- Mélange Pénicilline/Streptomycine (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)
- Boîtes de Pétri 10 cm (Fisher, Whitby, ON, Canada)
- Mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine (HAT) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- Solution stérile trypsine/EDTA 0,25 % (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)

### 6.3.2 Méthode

#### 6.3.2.1 Milieu de culture

- DMEM .....445 ml
- FBS .....50 ml
- Pénicilline/Streptomycine.....5ml
- HAT .....1 flacon

#### 6.3.2.2 Passages

Les divisions en deux boîtes se font environs tous les deux jours car les cellules prolifèrent rapidement.

Remarque : Le ratio pour ensemercer une nouvelle boîte ne doit pas être inférieur à  $\frac{1}{2}$  ou  $\frac{1}{4}$ , car les cellules semblent avoir du mal à pousser à plus faible concentration.

Lors de la congélation des cellules il est conseillé de mettre 1 million de cellules par tube de congélation.

## 7. Test de prolifération au MTT

Le MTT est un sel de tétrazolium, le bromure de 3,(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, qui a la propriété d'être réduit en formazan par les déshydrogénases mitochondriales, qui sont associées à l'activité métabolique cellulaire ; donc le taux de formazan présent dans le milieu est directement proportionnel au nombre de cellules vivantes. [44, 45]

Le formazan est facilement détectable par spectrophotométrie, et le pourcentage de prolifération cellulaire est obtenu comme suit :[46]

$$\text{Prolifération Cellulaire} = \frac{\text{D.O puit test} - \text{D.O puit de cellules lysées(0\%)}}{\text{D.O puit de milieu seul(100\%) - D.O puit 0\%}} \times 100$$

Sachant que :

- D.O : densité optique.
- Puits de cellules lysées : puits témoin représentant une absence de prolifération.
- Puits contenant le milieu seul (comprenant le véhicule du produit à tester): puits témoins représentant une prolifération maximale.

Tous les tests de prolifération ont été réalisés à des intervalles de concentration de :

- 0.006  $\mu\text{M}$  à 611  $\mu\text{M}$  pour N1
- 0.008  $\mu\text{M}$  à 877  $\mu\text{M}$  pour N2, O2 et O3
- 0.007  $\mu\text{M}$  à 775  $\mu\text{M}$  pour O1 et O4
- 0.011  $\mu\text{M}$  à 1136  $\mu\text{M}$  pour O5

Remarque : il est très important de préciser que pour avoir de bons résultats avec peu de variabilité entre les puits, il faut déposer le MTT lorsque les cellules forment un tapis au fond du puits (monocouche cellulaire), pour cela il faut adapter la quantité de cellules déposée dans chaque puits et le temps d'incubation en fonction du type de cellules utilisé.

## **7.1 Protocole de comptage des cellules**

Pour connaître la concentration de cellules dans notre milieu de culture, on commence par les détacher avec de la trypsine/EDTA comme pour le passage. Puis mélanger 500  $\mu$ l de suspension de cellules avec 500  $\mu$ l de bleu de trypan, et déposer 250  $\mu$ l de ce mélange sur l'hématocytomètre. Enfin compter le nombre de cellules dans les 4 carrés de l'hématocytomètre. Les calculs se font comme suit :

$$\text{Nombre de cellules/ ml} = \text{Nombre de cellules comptées} \times 2 \times 2500$$

On multiplie par 2 car on dilue au  $\frac{1}{2}$

On multiplie par 2500 car les 4 carrés de l'hématocytomètre contiennent un volume de  $\frac{1}{2500}$  ml

## **7.2 Protocole expérimental du test de prolifération avec cellules endothéliales**

### **7.2.1 Ensemencement des plaques Costars® à 96 puits**

Suspendre les cellules à partir d'une culture en flacon selon la méthode de passage citée ci-dessus en utilisant la trypsine à 0,05 % car les cellules endothéliales sont fragiles. Puis compter les cellules et les diluer afin d'obtenir une concentration de 100 000

cellules/ml. Mettre 100  $\mu$ l de la suspension dans chaque puits d'une plaque Costar® à 96 puits et incubé 3 jours à 37 °C.

### **7.2.2 Dépôt des produits à tester**

Aspirer le milieu de culture de la plaque Costar à 96 puits et le remplacer par 100  $\mu$ l de milieu frais sans FBS. Ajouter 10  $\mu$ l de produit à tester dans chaque puits selon le schéma de l'expérience, et centrifuger brièvement pendant 1 minute à 500 rpm, pour favoriser un contact homogène entre le produit à tester et les cellules.

### **7.2.3 Dépôt du MTT**

Enlever le milieu de culture. Laver avec 100  $\mu$ l de PBS stérile pour être sûr qu'il ne reste plus de produit. Mettre 100  $\mu$ l de milieu de culture frais. Ajouter 10  $\mu$ l de solution de lyse (détergent) dans certains puits, selon le schéma expérimental. Ajouter 10  $\mu$ l de MTT à 5 mg/ml, préparé préalablement en dissolvant 20 mg de poudre MTT dans 4 ml PBS stérile au vortex, puis en filtrant la solution à 0,22  $\mu$ m. Enfin incubé la plaque pendant 4 h à 37°C.

### **7.2.4 Solubilisation des cristaux formés par le MTT**

Mettre 50  $\mu$ l de solution de solubilisation dans chaque puits, puis placer les plaques à l'abri de la lumière, sous agitation toute la nuit.

La solution de solubilisation doit être préparée préalablement en mélangeant 5 ml de HCl 1 N, 5ml de Triton x 100 (10 %) et 40 ml d'isopropanol. Pour préparer la solution de HCl 1 N à partir du 12 N, on dilue 8,3 ml d'HCl 12 N dans 100 ml d'eau.

### **7.2.5 Étude spectrophotométrique**

Les microplaques sont placées dans le lecteur du spectrophotomètre SAFIRE® (Tecan, Autriche) et l'absorbance est lue à 570 nm.

## **7.3 Protocole expérimental du test de prolifération avec cellules de glioblastomes et EAhy 926**

### **7.3.1 Ensemencement des plaques Costars® à 96 puits**

Détacher les cellules à partir d'une culture en flacon selon la méthode de passage citée dans le protocole ci-dessus, avec 2 ml trypsine/EDTA à 0,25 % pour les cellules de glioblastomes et 0,05 % pour les EAhy 926, incuber 4 min environ, puis ajouter de 8 ml de milieu complet pour inhiber la trypsine. Centrifuger à 600 rpm pendant 3min, puis remplacer le milieu par un autre sans sérum, sans toucher le culot de cellules. Compter les cellules et diluer afin d'obtenir une concentration de 500 000 cellules/ml. Mettre 100 µl de la suspension obtenue dans chaque puits. Incuber quelques heures à 37 °C.

### **7.3.2 Dépôt des produits à tester**

Mettre 10 µl de produit à tester dans chaque puits selon le schéma de l'expérience. Centrifuger brièvement à 500 rpm pendant 1 minute, et incuber 3 jours.

### **7.3.3 Dépôt du MTT**

Enlever le milieu de culture de la plaque. Laver avec 100 µl de PBS stérile pour être sûr qu'il ne reste plus de produit. Mettre 100 µl de milieu de culture complet. Ajouter 10 µl de solution de lyse (détergent) dans certains puits, selon le schéma de l'expérience. Ajouter 10 µl de MTT à 5 mg/ml, préparé préalablement en dissolvant 20 mg de poudre MTT dans

4 ml PBS stérile au vortex, puis en filtrant la solution à 0,22  $\mu\text{m}$ . Enfin incuber la plaque pendant 4 h à 37 °C.

#### **7.3.4 Solubilisation des cristaux formés par le MTT**

Mettre 50  $\mu\text{l}$  de solution de solubilisation dans chaque puits, puis placer les plaques à l'abri de la lumière, sous agitation toute la nuit.

La solution de solubilisation doit être préparée préalablement en mélangeant 5 ml d'HCl 1 N, 5 ml de Triton x 100 (10 %) et 40 ml d'isopropanol. Pour préparer la solution d'HCl 1 N à partir du 12 N, on dilue 8,3 ml d'HCl 12 N dans 100 ml d'eau.

#### **7.3.5 Étude spectrophotométrique**

Les microplaques sont placées dans le lecteur du spectrophotomètre SAFIRE® (Tecan, Autriche) et l'absorbance est lue à 570 nm.

## **8. Test de recolonisation**

C'est un test qui consiste à créer manuellement une rigole dans une culture de cellules endothéliales en monocouche puis, 24 h après, on prend des photos. Sur ces dernières, on effectue une analyse d'image qui permet d'évaluer le pourcentage de recolonisation de la zone dénudée.

Ceci nous donne une idée du potentiel anti-angiogène de nos produits, car la migration est une étape clef de l'angiogénèse. Des inhibiteurs de la mobilité cellulaire peuvent affecter le processus d'angiogénèse. [47]

Les essais ont été effectués sur les EAhy 926 à deux concentrations, 0,2  $\mu\text{g/ml}$  et 20  $\mu\text{g/ml}$ , soit :

- 0,611  $\mu\text{M}$  et 61  $\mu\text{M}$  pour N1

- 0,877  $\mu\text{M}$  et 87  $\mu\text{M}$  pour N2, O2 et O3
- 0,775  $\mu\text{M}$  et 77  $\mu\text{M}$  pour O1 et O4
- 1,136  $\mu\text{M}$  et 113  $\mu\text{M}$  pour O5

On a choisi comme témoin négatif le paclitaxel dont la concentration inhibitrice non toxique est de  $10^{-8}$  M. [37]

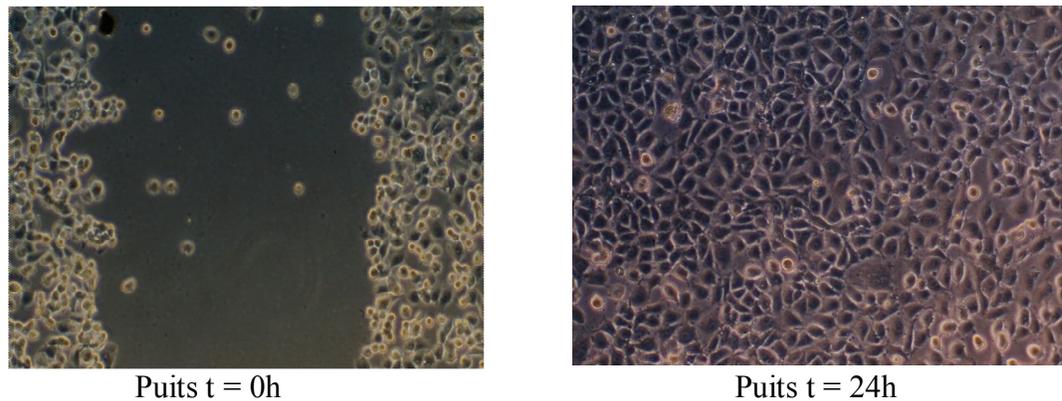


Figure 15. Recolonisation 24h après dénudation d'une zone médiane (microscope inversé x10)

## 8.1 Protocole expérimental

Ensemencement des plaques à 24 puits avec 100.000 cellules/puits. Incubation quelques heures pour que les cellules forment un tapis, de préférence ensemencer le matin et continuer l'expérience en fin de journée. Gratter le fond des puits avec un embout de 10  $\mu\text{l}$  pour former une rigole. Lavage 2 fois avec du milieu de culture. Mettre un milieu de culture sans sérum. Ajouter 5  $\mu\text{l}$  de produit à tester selon le schéma de l'expérience, et prendre une photo témoin  $t = 0\text{h}$ , avant d'incuber pendant 24 heures. Prendre en photo tous les puits 24 h après.

## 8.2 Analyse d'image sur logiciel WCIF ImageJ

- Commencer par ouvrir les photos témoins au temps 0h, en allant au menu « Fichier » (File) puis « Ouvrir » (Open)

- Dessiner une rigole sur la photo témoin en cliquant sur «  »
- Enregistrer la superficie et l'emplacement exact de la rigole sur la photo témoin en allant à la fonction « Plugins », et en choisissant le menu « Région d'intérêt » (ROI) puis « Multi-mesures ». lorsqu'on clique sur « Ajouter une surface » (Add < Sp >, un chiffre apparaît dans la fenêtre ouverte (exemple : R 1651-1000). Ce chiffre sert de référence au logiciel pour garder en mémoire la superficie et l'emplacement de la rigole sur la photo témoin, afin de la superposer sur les autres photos.
- Ouvrir les photos à analyser une par une, et cliquer sur la référence à côté de < Sp > (exemple : R 1651-1000).
- La rigole apparaîtra sur la photo.
- Pour faciliter le comptage de cellules, on peut effacer l'extérieur de la rigole, en allant à la fonction d'édition (Edit), puis « Effacer l'extérieur » (Clear outside).
- Pour procéder au comptage des cellules aller au menu « Plugins », puis « Analyse de particules » (Particule Analysis) et « compteur de cellules » (Cell Counter).
- En bas de la photo cliquer sur un type de couleur pour marquer les cellules (exemple : Red type).
- Marquer les cellules en cliquant sur chacune d'entre elles.
- Le nombre de cellule s'affiche sur l'écran, le prendre en note.
- Calculs :

$$\% \text{ de recolonisation} = \left( \text{Moyenne de cellules dans les puits tests} - \text{Moyenne de cellules dans les puits témoins } 0 \% \right) \times 100 / \text{Moyenne de cellules dans les puits témoins } 100 \%$$

**Puits 0%** : puits témoin contenant le paclitaxel et représentant une absence de recolonisation.

**Puits 100%** : puits témoin contenant le véhicule (DMSO) et représentant une recolonisation maximale.

## 9. Test de formation de microtubules sur matrice extra cellulaire

La matrice gélifiée ECMatrix<sup>TM</sup> est constituée de laminine, de collagène de type IV, de glycoprotéines de sulfate d'héparane, d'entactine et de nidogène. Elle contient aussi des facteurs de croissance (facteur de croissance transformant- $\beta$  « TGF- $\beta$  », facteur de croissance des fibroblastes « FGF ») et des enzymes protéolytiques (plasminogène, MPMs) qui sont activées dans certaines tumeurs. Cette composition favorise la formation de microtubules par les cellules endothéliales déposées sur la matrice.

Remarques : il faut changer d'embout à chaque manipulation pour qu'il soit vraiment froid, et laisser le mélange ECM/buffer constamment sur la glace.

Le kit doit être gardé au maximum 6 mois à -20°C. Une fois l'ECMatrix<sup>TM</sup> décongelé; on le conserve à 2-8°C une semaine. Il ne faut pas le recongeler.

### 9.1 Protocole expérimental de Chemicon®

L'ECMatrix<sup>TM</sup> se gélifie rapidement entre 22-35°C. Laisser toute la nuit sur de la glace ou au réfrigérateur à +4°C (de préférence sur la glace et dans le réfrigérateur, au cas où le réfrigérateur générerait des températures supérieures à 4°C). Garder les flacons contenant l'ECMatrix<sup>TM</sup> sur glace en tout temps. Utiliser des pipettes, plaques et tubes pré-refroidis durant les manipulations. L'ECMatrix<sup>TM</sup> non dilué est très visqueux, il peut être nécessaire de couper le bout des pipettes pour faciliter l'aspiration. L'ECMatrix<sup>TM</sup> gélifié peut se liquéfier à nouveau s'il est placé entre 0-4°C pour 24 à 48 heures ; cependant l'efficacité pourrait être diminuée.

1. Préparer l'ECMatrix comme suggérer ci-dessus. Laisser le tampon diluant sur la glace.
2. Ajouter 100 µl de tampon à 900 µl d'ECMatrix<sup>TM</sup> dans un tube « microfuge » stérile. Bien agiter lentement, ne pas pipeter d'air dans la solution. Il est préférable de travailler dans une chambre froide. Toujours garder la solution sur la glace pour éviter sa solidification.
3. Transférer 50 µl dans chaque puits de la plaque à 96 puits pré-refroidie. Les embouts de pipetage et la solution d'ECMatrix<sup>TM</sup> doivent impérativement être maintenus froids tout le temps afin d'éviter la gélification.
4. Incuber au minimum 1 heure à 37°C pour permettre la solidification de la solution.
5. Récolter les cellules endothéliales et les suspendre dans le milieu de culture. Utiliser un milieu de culture pour cellules endothéliales ou un milieu de culture cellulaire standard supplémenté de facteurs de croissance endothéliale. La présence de sérum (0,5 - 10 %) est optionnelle. Nous préférons l'EGM (*Endothelia Cell Growth Media*) à 150 µl par puits (plaque à 96 puits).
6. Ensemencer  $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  cellules par puits sur la surface de l'ECMatrix<sup>TM</sup> polymérisé.
7. Incuber à 37°C toute la nuit (4-12 h) dans un incubateur de culture cellulaire. Les cellules forment des réseaux tubulaires dont le développement est optimal au bout de 12 à 18 h, les premiers signent apparaissant entre 5-6 h. Après 24 h les cellules commencent à se résorber et mourir. Afin d'étudier les effets de facteurs proangiogéniques, le temps d'incubation doit être diminué à 4-8 h. les temps optimaux varient selon le type de cellule, leur âge et le milieu de culture.

8. Surveiller la formation de tubes sous microscope inversé à 40X-200X.

## 10. Essai de liaison spécifique par compétition

Cet essai à été réalisé dans le laboratoire du Pr. Daniel Lévesque.

### 10.1 Matériel

- Suspension de membrane de cellules CHO-K1 transfectée avec le CB2 humain (1,9 mg de protéines/ml) (Lonza, Walkersville, MD, USA)
- WIN55 212,2 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- AM 251 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- CP 55,940 [chaîne latérale-2,3,4-<sup>3</sup>H(N)] (activité spécifique : 174,6 Ci/mmmole, environ 390 000 dpm /tube /100 µl,  $K_D = 0,7$  nM)
- (Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- BSA (albumine de sérum bovin) (Fisher, Whitby, ON, Canada)
- Polyéthylénimine 0,5 % (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- Filtre GF/C Whatman (Fisher, Whitby, ON, Canada)
- Flacons à scintillation (Fisher, Whitby, ON, Canada)
- Liquide de scintillation (Amersham biosciences, GE healthcare, Canada)

## 10.2 Méthode

La quantification de la liaison du ligand radioactif sur les récepteurs se fait en trois grandes étapes : *incubation*, *séparation* et *mesure* [48].

La préparation du tampon d'incubation consiste à mélanger 50 mM de Tris-HCl ajusté à pH 7,5, 2,5 mM d'EDTA, 5 mg/ml de BSA et 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, ce dernier permet de favoriser la haute affinité du récepteur (forme active).

L'*incubation* consiste à mettre en présence une concentration fixe de récepteurs CB<sub>2</sub> (4 µg de protéines/ml) et de ligand radioactif [<sup>3</sup>H] CP 55,940 (1 nM) à laquelle on ajoute des concentrations croissantes de ligand non marqué. Ceci, dans le tampon d'incubation, durant 90 minutes, à température ambiante et en agitant de temps en temps.

Après décongélation rapide de la membrane, le démarrage de la réaction de compétition s'effectue en mettant les composés cités ci-dessous dans un tube en verre, résultant en un volume total de 1 ml:

- 0,6 ml de tampon d'incubation
- 0,1 ml de tampon (représentant la liaison totale), ou de composé à tester, ou de ligand non spécifique (AM 251)
- 0,1 ml de [<sup>3</sup>H]CP 55,940
- 0,2 ml de membrane (la réaction démarre avec l'ajout de la membrane)

Le contrôle choisi est le WIN55212, 2 qui est un agoniste des CB<sub>2</sub>. Sa courbe de compétition a été effectuée avec les concentrations suivantes en duplicata (2 tubes pour chaque concentration) : 1<sup>-10</sup> M, 1<sup>-9</sup> M, 3<sup>-9</sup> M, 1<sup>-8</sup> M, 3<sup>-8</sup> M, 6<sup>-8</sup> M, 9<sup>-8</sup> M, 1<sup>-7</sup> M, 3<sup>-7</sup> M, 6<sup>-7</sup> M, 9<sup>-7</sup> M, 1<sup>-6</sup> M, 6<sup>-6</sup> M, 9<sup>-6</sup> M, 1<sup>-5</sup> M. S'ajoutant à cela, 2 tubes contenant uniquement du tampon, représentant la liaison totale, et 2 tubes avec 2 µM de AM 251 qui est un

antagoniste des CB<sub>2</sub>, représentant la liaison non spécifique (NS). Ce dernier a été dilué dans l'eau au lieu du tampon pour éviter qu'il ne précipite.

Le AM 251 ayant une plus grande affinité pour les CB<sub>2</sub> que le [<sup>3</sup>H]CP 55,940 ( $K_i = 2290$  nM [49]), et se trouvant en beaucoup plus grande concentration dans le milieu que le [<sup>3</sup>H]CP 55,940, il déplacera complètement le [<sup>3</sup>H]CP 55,940 des sites de liaison spécifique qui sont les CB<sub>2</sub>, ne laissant ainsi de la radioactivité que sur les sites de liaison non spécifique.

L'expression *sites de liaison spécifique* sous-entend qu'il s'agit de récepteurs et celle de *liaison non spécifique* sous-entend qu'il s'agit de sites qui n'ont pas la qualité de récepteurs, avec généralement une affinité faible et un caractère non saturable. La liaison spécifique est déterminée en soustrayant la liaison non spécifique (NS) de la liaison totale, comme montré dans le graphique ci-dessous.

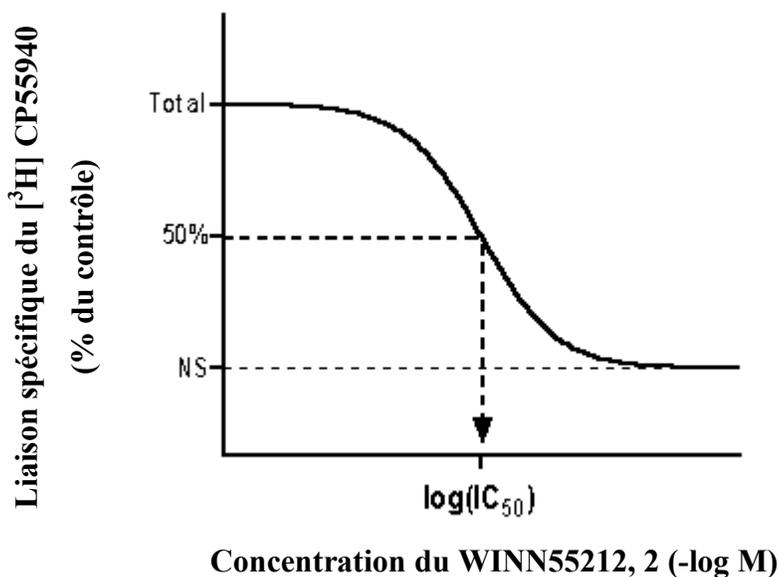


Figure 16. Courbe typique de compétition

Pareillement, les courbes de compétitions de chaque composé à tester ont été effectuées avec les concentrations suivantes en duplicata :  $1^{-10}$  M,  $1^{-9}$  M,  $1^{-8}$  M,  $3^{-8}$  M,  $6^{-8}$  M,  $1^{-7}$  M,  $3^{-7}$  M,  $6^{-7}$  M,  $1^{-6}$  M,  $1^{-5}$  M. S'ajoutant à cela, 2 tubes contenant uniquement du tampon, et 2 tubes avec 2  $\mu$ M de AM 251.

La *séparation* est effectuée par filtration sous filtres GF/C imbibés de 0,5 % de polyéthylénimine, suivie de 3 lavages avec tampon d'incubation à 4 °C sans BSA. Cette étape permet d'éliminer les molécules [ $^3$ H]CP 55,940 restées libres dans le tampon, et de garder celles liées aux récepteurs CB<sub>2</sub>. Chaque filtre est ensuite placé dans un flacon à scintillation, auquel on ajoute 10 ml de scintillant, puis on attend 1 à 2 heures pour que le filtre se dissolve complètement avant de passer à l'étape de mesure.

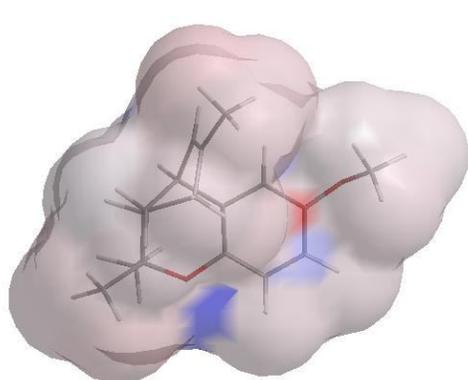
La *mesure* de la radioactivité s'effectue en comptant le nombre de coups par minutes dans le liquide à scintillation, à mesure de 4 minutes par échantillon, dans le *Counter* 1217 rack BETA de Perkin Elmer. Cette étape permet de quantifier les molécules [ $^3$ H] CP 55,940 liées aux récepteurs CB<sub>2</sub>.

L'affinité des molécules non marquées pour les récepteurs CB<sub>2</sub> sera appréciée en quantifiant leur pouvoir de déplacement du [ $^3$ H] CP 55,940. Pour cela on définit  $K_i$  (la constante de dissociation des molécules non marquées) on détermine sur leur courbe de compétition IC<sub>50</sub>, la concentration de ligand non marqué inhibant 50% de la liaison du radio-ligand. Pour cela, on construit un graphique comportant en abscisse les concentrations de ligand non marqué (C exprimée en  $-\log$  M), et en ordonnée la liaison spécifique du [ $^3$ H] CP 55,940 (exprimée en %). La valeur IC<sub>50</sub> est déterminée sur l'abscisse (figure 16).

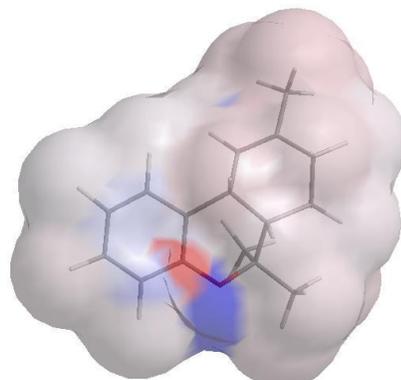
Plus la IC<sub>50</sub> est petite, meilleure est l'affinité du ligand froid pour le récepteur.

## Résultats et discussion

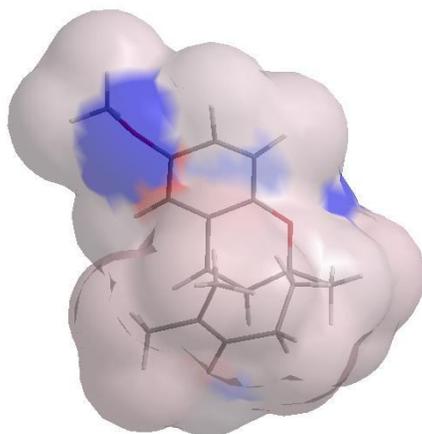
### 11. Relation structure/activité



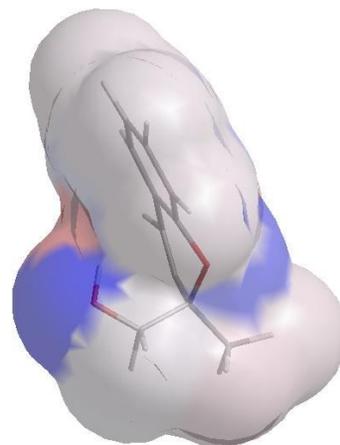
O1



O3



O4



O5

Figure 17. Modélisation de 4 composés oxygénés.

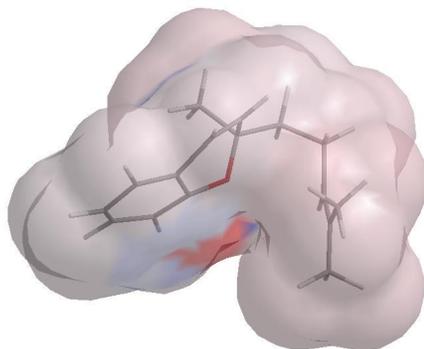


Figure 18. Modélisation du composé oxygéné O2

Les molécules montrées dans les figures 17, 18 et 19 ont été modélisées sur le logiciel Chemoffice®, afin d'estimer leur polarité de surface. Les couleurs bleue et rouge qu'on observe sur ces molécules représentent leur électronégativité et électropositivité relatives en surface, respectivement. La seule molécule possédant un dipôle assez marqué est O5. On y distingue bien le pôle électronégatif du pôle électropositif et le reste de la molécule est blanc (non polaire). Alors que dans les autres molécules les charges partielles sont assez réparties. On y observe des dégradés de couleurs.

Ces données montrent que ces molécules ont un caractère lipophile très prononcé, et que la moins lipophile est O5. En effet, cela s'explique en observant la structure chimique de cette dernière, car c'est la seule molécule qui possède un groupement hydroxyle qui peut former des liaisons hydrogènes facilement.

Les molécules étudiées sont des mélanges racémiques. Mais, O2 a été modélisé comme étant un énantiomère R pour voir l'effet de la stéréochromie sur le comportement de la molécule. C'est la raison pour la quelle nous observons dans la figure 17 que la zone polaire est dirigée vers l'intérieure de la molécule, ce qui rend difficile la formation de liaisons hydrogènes avec des solvants polaires et qui confirme encore une fois que c'est une molécule lipophile.

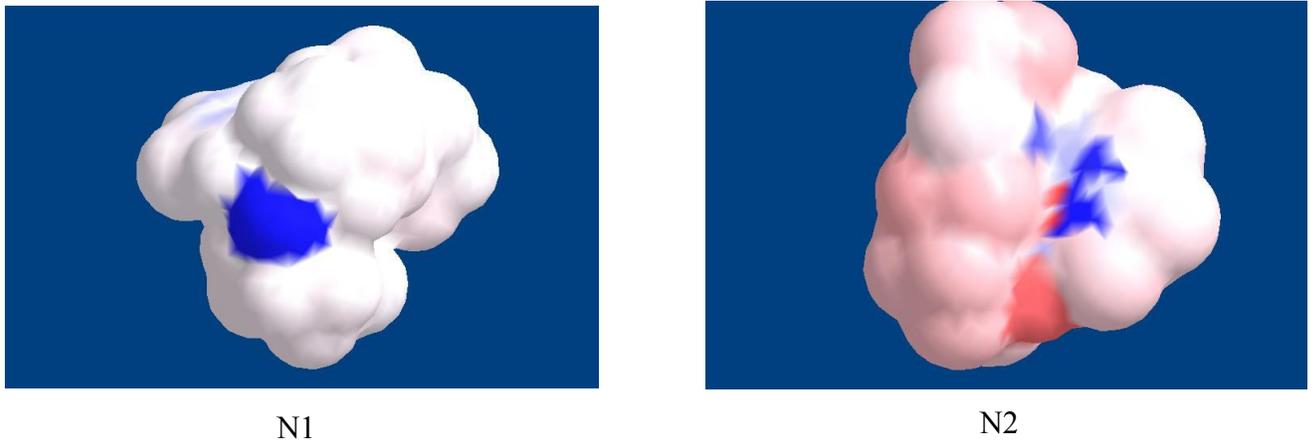


Figure 19. Modélisation des composés azotés

La comparaison des deux molécules azotées est intéressante (figure 19). N2 possède un dipôle évident, et N1 montre très peu de polarité en surface, alors que leurs structures chimiques ne diffèrent que par la présence d'un groupement tert-butyloxycarbonyl (Boc) dans N1. Justement, ce Boc fait toute la différence car il protège l'azote, et l'empêche de s'ioniser. Alors que l'azote du N2 peut facilement prendre un hydrogène pour devenir un groupement ammoniums.

Dans le tableau 1, les paramètres physico-chimiques des molécules O1, O2, O3, O4, O5, N1, et N2 ont été calculés à l'aide de logiciels éprouvés utilisant des techniques de fragmentation et des calculs quantochimiques [50]. Ces calculs sont basés sur la nature et l'électronégativité des éléments dans la molécule, sur les dipôles, les énergies, les longueurs et les angles de liaison. Les logiciels sont ChemOffice® de Cambridge soft et Sparc online calculator. Les paramètres retenus sont ceux qui ont une importance pour l'absorption et la pharmacocinétique des médicaments :

Conditions : température = 25°C ; pression = 1 atm.

<b>Paramètres estimés</b>	<b>O1</b>	<b>O2</b>	<b>O3</b>	<b>O4</b>	<b>O5</b>	<b>N2</b>	<b>N1</b>
<b>MM (g/mol)</b>	258,4	228,3	228,3	258,4	176,2	227,3	327,5
<b>pKa</b>						4,63	
<b>logP</b> (octanol/eau)	3,63	4,25	3,76	4,13	1,80	3,38	4,49
<b>Solubilité dans l'eau (mg/l)</b>	0,23	0,13	0,49	0,0695	643,1	5,81	0,038
<b>Diffusion dans l'eau (cm<sup>2</sup>/sec)</b>	5,35. 10-6	5,49.10-6	5,66. 10-6	5,2. 10-6	6,99. 10-6	5,67.10-6	4,65. 10-6
<b>Point d'ébullition (°C)</b>	337,83	313,29	311,22	339,63	294,64	329,17	385,83
<b>Point de fusion (°C)</b>	169,74	81,98	123,72	137	105,49	202,18	234,24

Tableau 1. Paramètres physicochimiques des molécules.

Selon les points de fusions et d'ébullition estimés ces molécules devraient être des solides, mais nous les avons reçues sous forme d'huiles, cela peut être du à des résidus de solvants ou une mauvaise purification des produits. Les données de ce tableau confirment encore une fois que ce sont des molécules lipophiles (logP élevé et solubilité faible dans l'eau). La molécule ayant le logP le plus petit et la solubilité la plus élevée est O5. Ce qui s'explique par son petit poids moléculaire et la présence de son groupement hydroxyle. On remarque aussi que la seule molécule ionisable dans l'eau est N2, ce qui s'explique car c'est la seule molécule de la série qui possède un azote du type amine secondaire.

L'équilibre d'ionisation est le suivant:

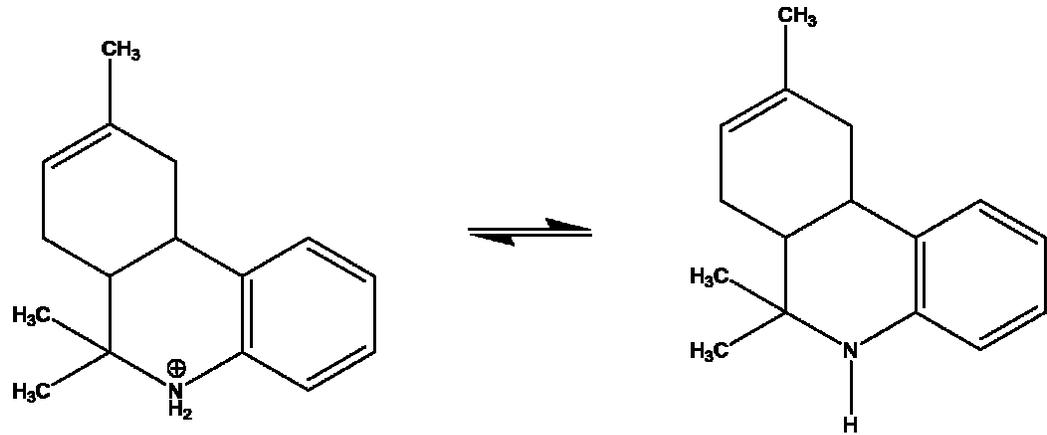
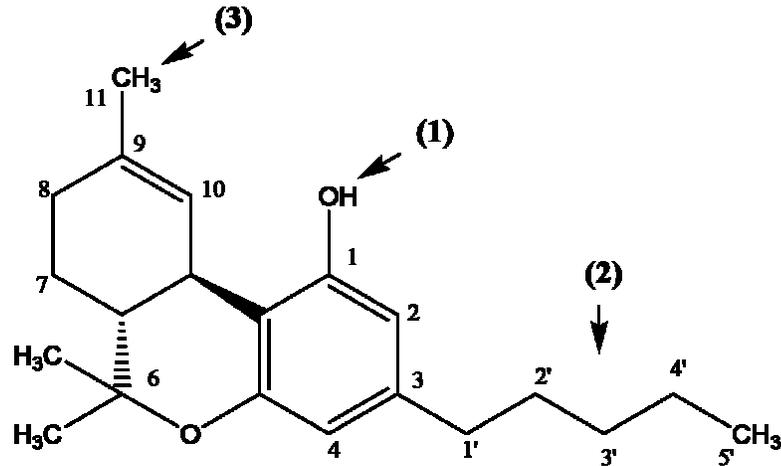


Figure 20. Equilibre d'ionisation de N2

Il serait donc possible de l'administrer sous forme de sels (chlorhydrate par exemple)

Les études de chimie médicinale sur les cannabinoïdes tricycliques, ont identifié le groupement hydroxyle phénolique en 1 (voir (1) dans la figure 21), la chaîne latérale en C-3 et le groupement méthyle 11 (voir (2) et (3) dans la figure 21), comme appartenant au pharmacophore. Ceci dicte l'affinité, la sélectivité et l'efficacité des molécules aux récepteurs cannabinoïdes. L'introduction d'un hydroxyle en position C-9 ou C-11 en stéréochimie- $\beta$  augmente aussi l'affinité et la sélectivité aux récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. La stéréochimie de la jonction des trois cycles est très critique pour l'interaction avec les CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. En effet, le composé actif de la marijuana, le (-)- $\Delta^9$ -THC qui possède deux carbones asymétriques, C-6 et C-10, de configuration R, est 5 à 100 fois plus actif que son (+)- énantiomère synthétique dans la production de certains effets pharmacologiques. Les molécules étudiées dans ce mémoire possèdent aussi des carbones asymétriques (voir figure 14 dans l'introduction), mais ce sont des mélanges racémiques, donc nous ne pouvons pas évaluer l'influence de la stéréochimie. [41]



**(6aR,10aR)-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-benzo[c]chromen-1-ol**

Figure 21. Identification de pharmacophore sur le THC

Le développement de ligands sélectifs des récepteurs CB<sub>2</sub> est d'un grand intérêt, car il permettrait d'éviter les effets psychotropes provoqués par les récepteurs CB<sub>1</sub>. Il serait possible de cibler les CB<sub>2</sub> en : [5, 42]

5. Limitant le passage des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique, pour qu'elles n'exercent leurs effets que sur les récepteurs CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> périphériques.
6. Développant des ligands sélectifs des récepteurs CB<sub>2</sub>. En enlevant ou masquant les groupements qui augmentent l'affinité des molécules aux CB<sub>1</sub>, comme le groupement hydroxyle phénolique, ou en diminuant la longueur de la chaîne latérale, car ce sont des groupements clefs qui contrôlent l'affinité et la sélectivité aux CB<sub>1</sub>.

Il est à noter que les molécules étudiées dans ce mémoire n'ont pas d'hydroxyle phénolique, ni de chaînes latérales en C-3, ou bien, possèdent de courtes chaînes, ce qui pourrait être favorable à une meilleure affinité aux CB<sub>2</sub>.

Certains nouveaux ligands bicycliques, dont le HU-308, montrent une forte affinité aux récepteurs CB<sub>2</sub>. Ce qui encourage l'étude des molécules bicycliques O2, O4 et O5.

## 12. Effet anti-tumoral

Les tests MTT effectués avec 2 jours de contact n'ont montré aucune toxicité (figure 22).

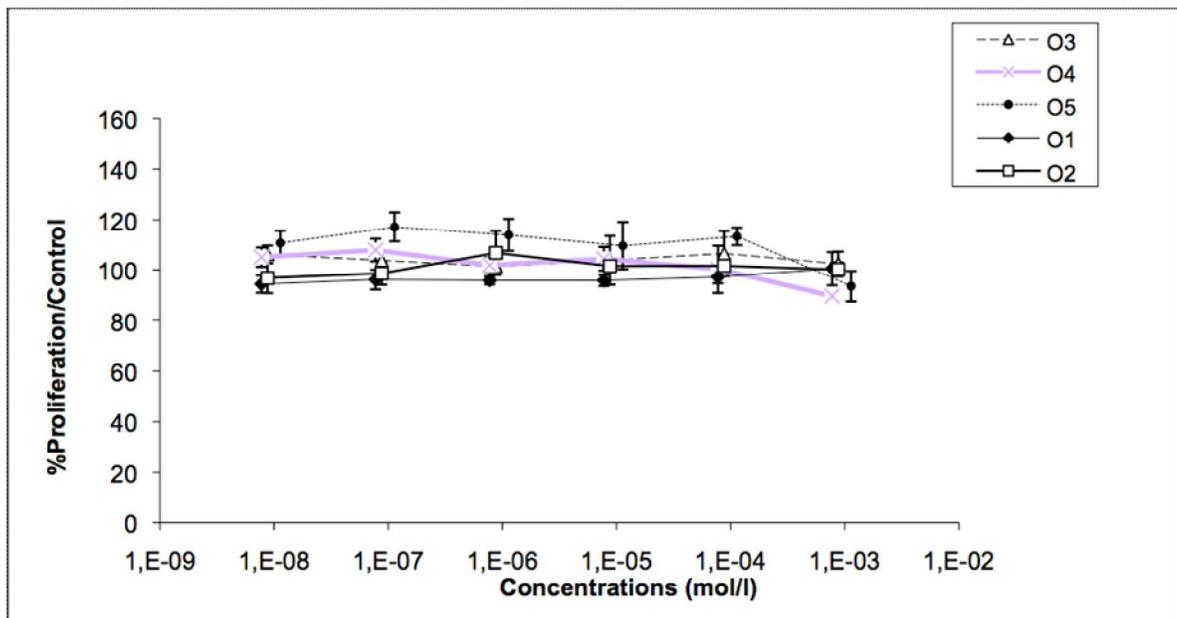


Figure 22. Effet des composés oxygénés sur la prolifération des cellules U373 après 2 jours

Dans les figures 23 et 24, on voit une toxicité à la plus haute concentration pour certains composés. On remarque aussi qu'aux concentrations inhibitrices à 50% (IC<sub>50</sub>) du THC et CBD, qui sont respectivement de 0.60  $\mu$ M et 25  $\mu$ M [51, 52], le pourcentage de prolifération des cellules est supérieur à 80 % pour toutes les molécules. On en conclut que

les différents dérivés testés n'ont pas d'effet toxique particulier sur les cellules de glioblastomes.

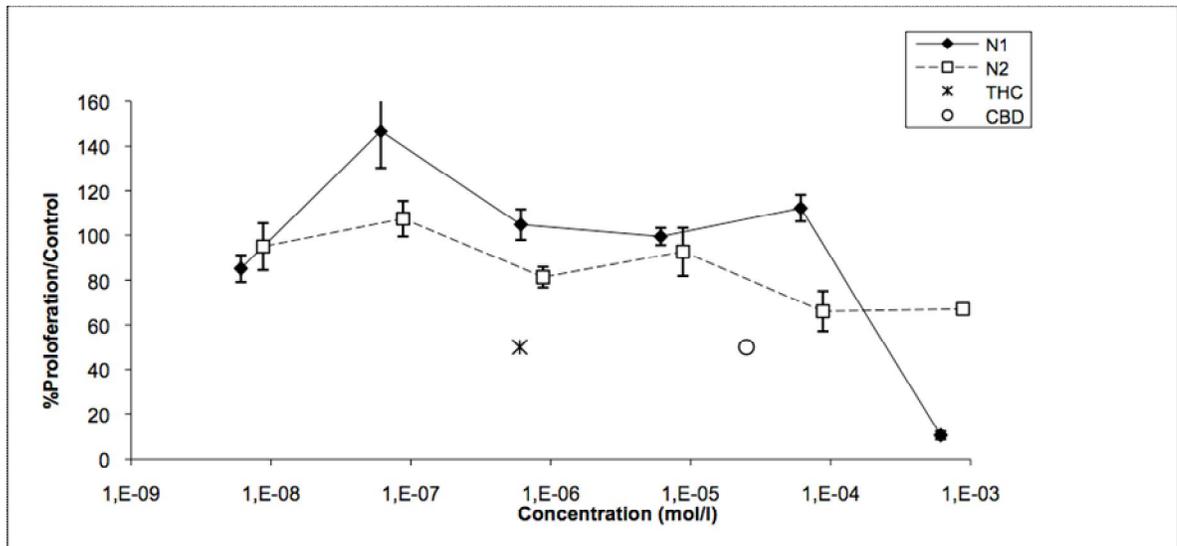


Figure 23. Effet des composés azotés sur la prolifération des cellules U373 après 4 jours

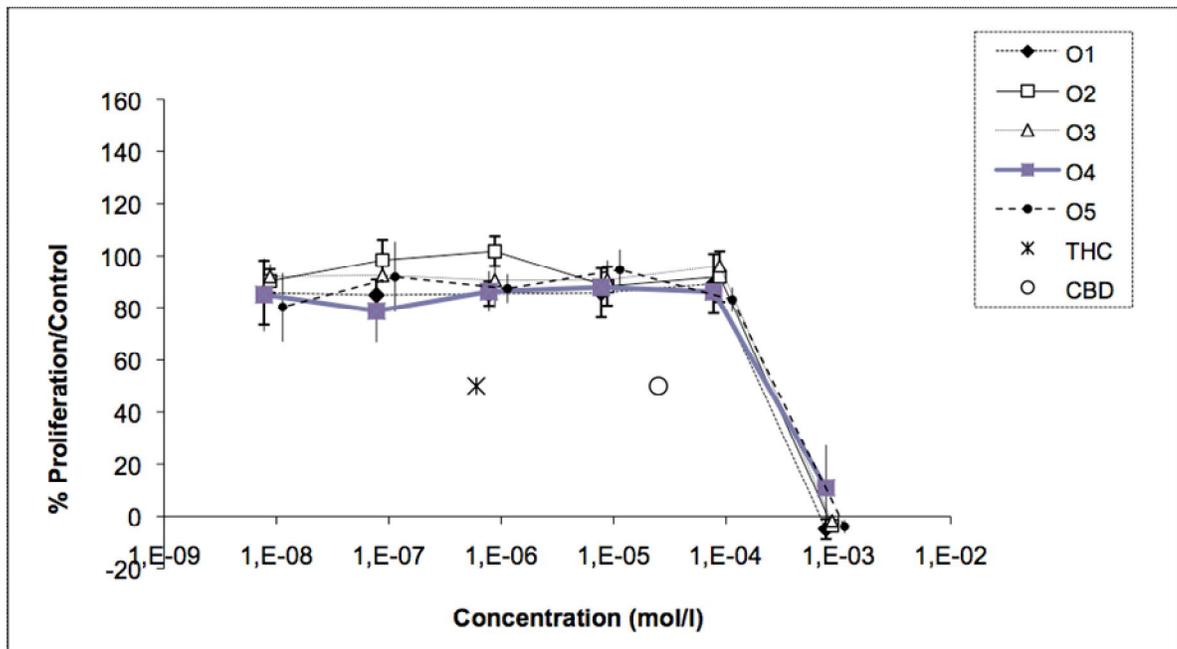


Figure 24. Effet des composés oxygénés sur la prolifération des U373 après 4 jours

### 13. Effet anti-angiogène

Dans le paragraphe de l'introduction, nous avons vu que les cannabinoïdes peuvent inhiber l'angiogénèse en agissant sur la *prolifération* des cellules endothéliales leurs *migration* ou la *morphogénèse*. Ainsi pour tester l'effet anti-angiogène de nos produits nous avons testé chacune de ces étapes.

#### 13.1 Effet sur la prolifération des cellules endothéliales

Tous les composés n'ont montré une toxicité qu'à la plus haute concentration de 0,2 mg/ml (figure 25), soit :

611  $\mu$ M pour N1

877  $\mu$ M pour N2, O2 et O3

775  $\mu$ M pour O1 et O4

1136  $\mu$ M pour O5

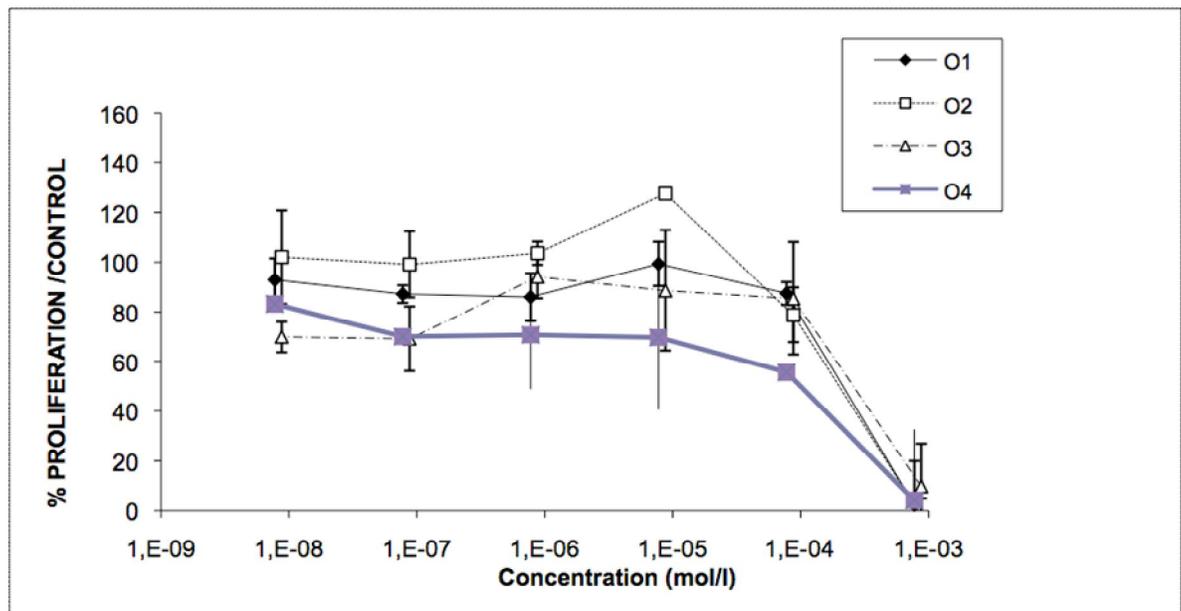


Figure 25. Effet des composés oxygénés sur la prolifération des HUVEC après 4 jours.

Cette toxicité est très probablement due au DMSO, car dans ces dilutions il est à une concentration de 1 % dans le milieu de culture, et il est connu qu'il commence à être toxique pour les cellules à partir d'une concentration de 0,1 %. En conclusion, nos molécules n'inhibent pas l'étape de prolifération des cellules endothéliales dans le processus de l'angiogénèse.

On observe toutefois que les composés azotés ont montré une toxicité au bout de 2 jours seulement (figure 26). Ce qui peut être expliqué par le fait qu'en général les composés azotés sont plus réactifs que les composés oxygénés, car l'azote crée beaucoup plus facilement des liaisons hydrogènes que les groupements éthers que l'on retrouve dans les composés oxygénés.

Cette observation n'a pas été faite lors des expériences avec les cellules de glioblastomes, ce qui peut être expliqué par le fait que les cellules de glioblastomes sont naturellement plus résistantes que les cellules endothéliales. On remarque parfois des écarts-types assez importants, qui sont probablement dus au fait qu'on aitensemencé le nombre de cellules indiqué dans l'ancien protocole, sans vérifier si ce nombre de cellules permettait toujours d'obtenir un tapis de cellules avant de déposer le MTT. En effet, il est possible qu'après plusieurs passages les cellules aient diminué leur rythme de croissance. Ce phénomène n'a pas été observé avec les cellules de glioblastome, ce qui peut s'expliquer, encore une fois, par le fait qu'elles soient beaucoup plus résistantes que les cellules endothéliales.

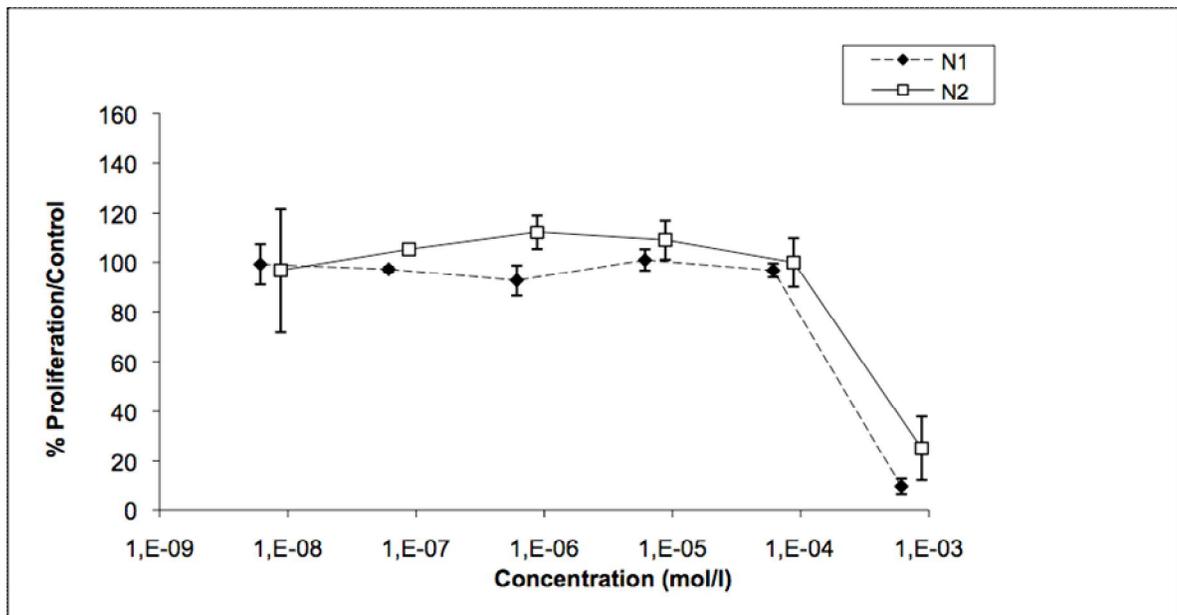


Figure 26. Effet des composés azotés sur les cellules EAhy 926 après 2 jours.

### 13.1.1 Inhibition de la cytotoxicité par le sérum fœtal bovin

Nous avons observé que le FBS inhibait l'effet de nos produits (figure 27). En effet, il est rapporté dans la littérature que la présence de FBS dans le milieu de culture inhibait les cannabinoïdes [53].

Pour tenter d'expliquer cela, nous avons estimé le caractère hydrophobe de nos molécules sur le logiciel *Sparc online calculator*. Nous avons constaté que leur Log P est très élevé, il se situe entre 2.97 et 4.78.

Le log P étant le coefficient de partage entre l'octanol et l'eau, on en déduit que ces molécules sont très peu soluble en milieu aqueux et très lipophiles, ce qui favorise de fortes

liaisons aux protéines plasmatiques. Ce qui peut expliquer pourquoi le sérum inhibe leur effet, et de ce fait, pourquoi nous avons du procéder à nos expériences *in vitro* sans sérum.

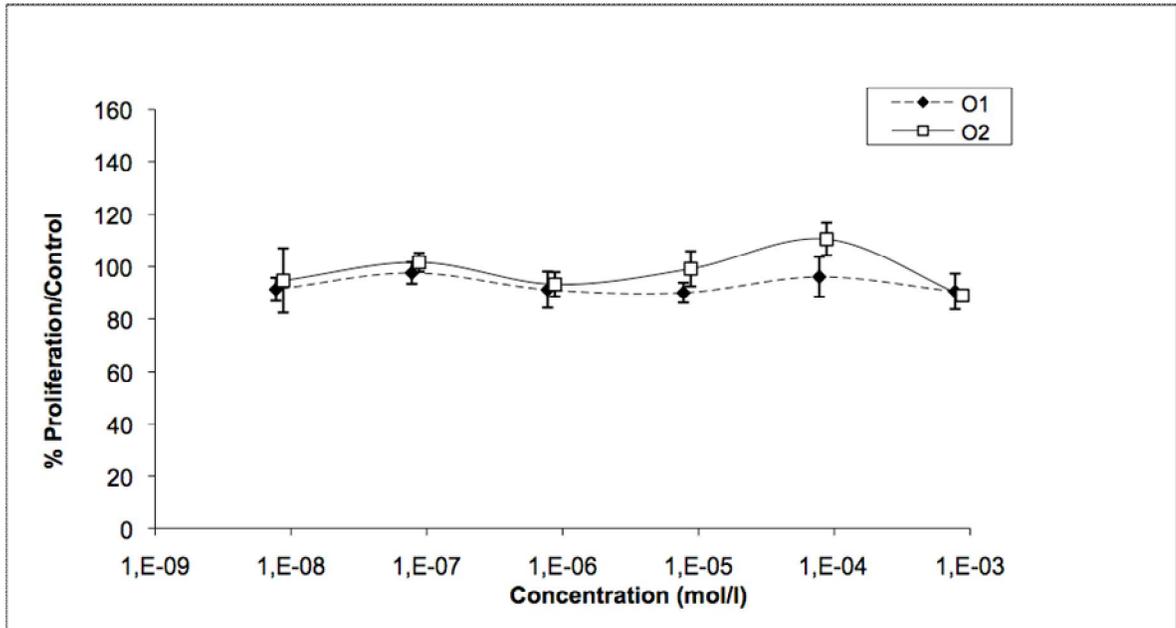


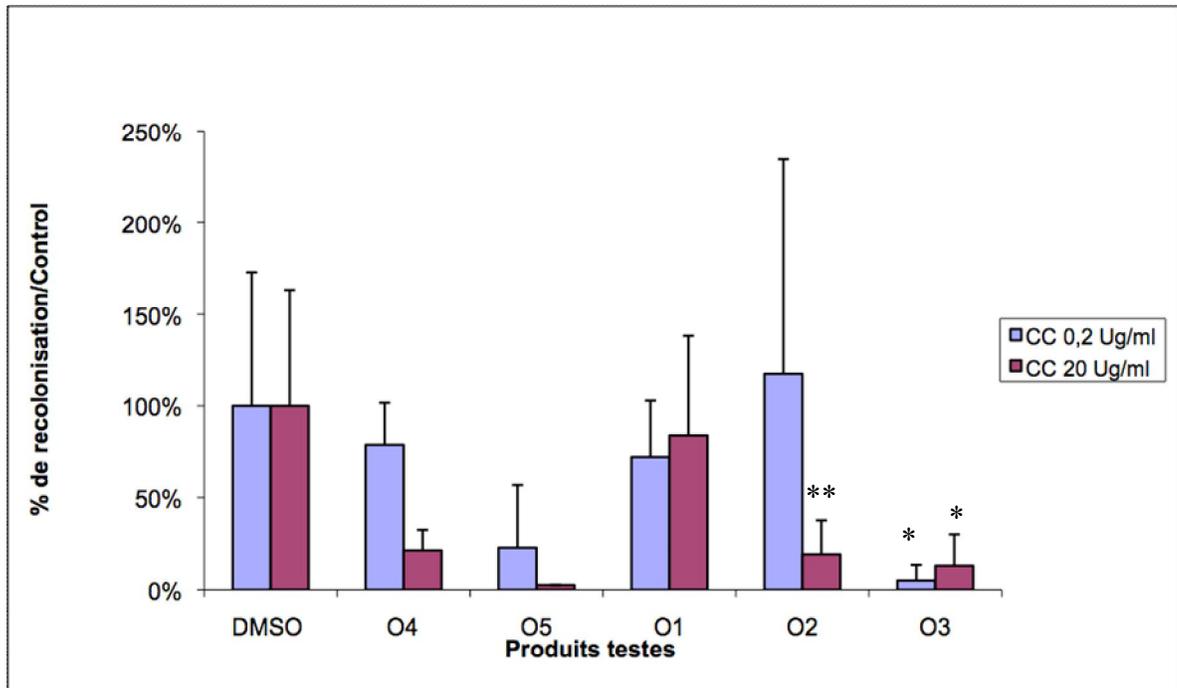
Figure 27. Test de prolifération avec FBS dans le milieu de culture après 4 jours.

Les très faibles quantités de sérum utilisées dans les expériences peuvent sembler ne pas représenter les conditions réelles. Au contraire, elles peuvent être plus représentatives de ces conditions, car l'interstitium est un microenvironnement encombré, où la présence de substances comme le collagène et les glycoaminoglycanes (GAGs) limitent l'espace accessible aux protéines plasmatiques.[2, 54]

### 13.2 Effet sur la migration des cellules endothéliales

On a constaté que les composés oxygénés avaient un certain effet inhibiteur de la migration (figure 28). En particulier O2 et O3 pour lesquels les résultats sont statistiquement significatifs. Mais, pour en tirer des conclusions formelles il nous faudrait plus de données, ce qui n'a pas été possible d'obtenir, car même après avoir fixé les

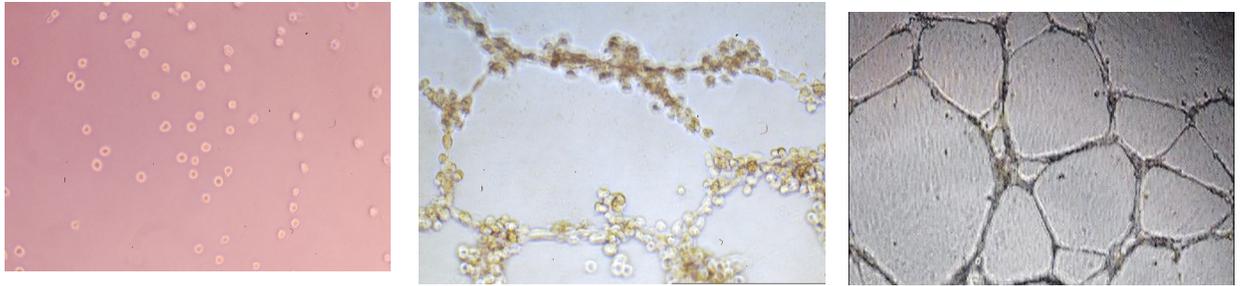
conditions expérimentales, on obtient toujours de l'inhibition dans certains puits témoins contenant seulement du milieu de culture. On en a conclu que ce test n'est pas suffisamment reproductible ; il serait préférable de faire un test de migration différent, ou bien, de passer directement du test de prolifération à celui d'inhibition de l'angiogénèse.



Paired t-test: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

Figure 28. Effet des composés oxygénés sur la migration des cellules endothéliales

### 13.3 Effet sur la capacité des cellules endothéliales à former des microtubules



Puits t = 0h

t = 6h

t = 8h (photo Chemicon®)

Figure 29. Test de formation de microtubules sur ECM avec les cellules EAhy926 (microscope inversé x10)

En comparant la photo prise 6 heures après le début de l'expérience avec celle du fabricant du kit Chemicon®, on remarque que nos cellules migrent et s'organisent en réseaux, mais elles ne s'allongent pas comme dans la photo témoin pour former des microtubules. Il ne nous a pas été possible de tirer des conclusions des puits tests, puisque l'expérience ne fonctionnait pas dans les puits témoins.

Pour déceler l'origine du problème nous avons effectué l'expérience dans un autre laboratoire avec nos cellules, qui étaient les HUVEC au départ, et les BAEC (*Bovine Aortic Endothelial Cells*) des cellules cultivées dans le laboratoire en question. L'expérience a fonctionné avec les BAEC mais pas avec les HUVEC, nous en avons conclu que nos cellules étaient défectueuses, alors nous avons retenté l'expérience dans notre laboratoire avec une lignée de cellules EAhy926 fournie par le laboratoire en question, car ils avaient déjà obtenu des résultats avec cette lignée. Ceci n'a pas fonctionné non plus. La seule

conclusion pouvant en découler est qu'il y aurait eu une contamination dans la culture cellulaire de notre laboratoire due à des mycoplasmes ou des virus, mais n'ayant pas le kit de détection, nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse.

## **14. Affinité aux récepteurs CB<sub>2</sub>**

L'affinité des molécules étudiées aux récepteurs CB<sub>2</sub> a été évaluée par compétition avec un ligand radio-marqué, le [<sup>3</sup>H] CP55, 940 dont, la constante de dissociation, K<sub>D</sub> = 0.7 nM.

Dans la figure 30, on observe que le WIN55212, 2 a un K<sub>i</sub> = 12,4 nM ce qui démontre que la réaction de compétition a bien fonctionné, puisqu'il est rapporté dans la littérature qu'il possède un K<sub>i</sub> allant de 0,28 à 16,2 nM pour les CB<sub>2</sub> [55]. Par contre, nos molécules n'ont pas démontré d'affinité aux récepteurs CB<sub>2</sub>, dans l'intervalle de concentration testé.

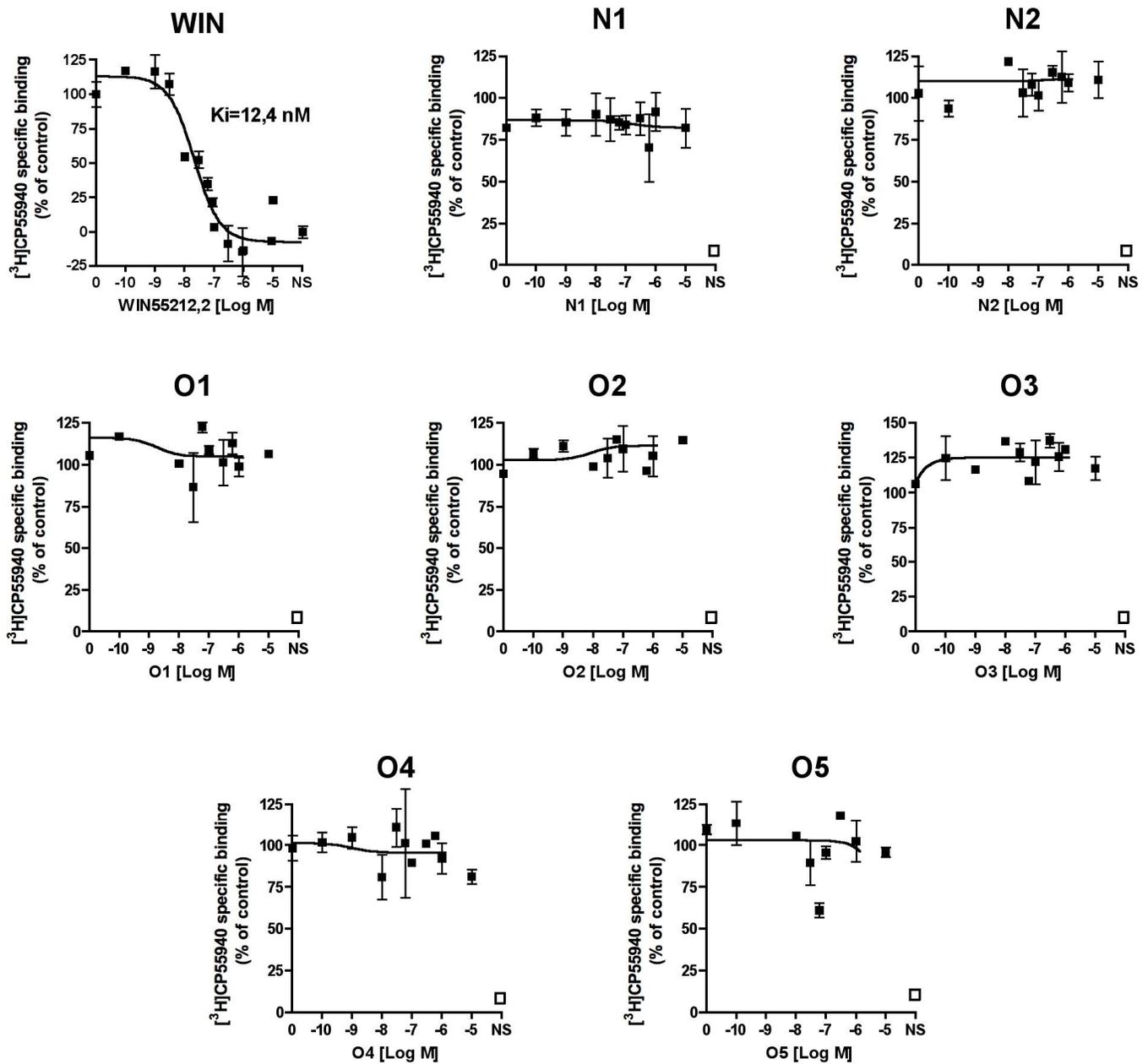


Figure 30. Courbes de compétition entre le [<sup>3</sup>H] CP55, 940 et les molécules non marquées suivantes: WIN55212, 2, N1, N2, O1, O2, O3, O4, O5

Ce résultat est inattendu vu les structures de ces molécules.

Par exemple, la molécule O3 est très semblable à des molécules ayant une haute affinité aux récepteurs CB<sub>2</sub>, avec un K<sub>i</sub> allant de 3 à 9 nM. En observant la figure 31, on remarque que la molécule O3 ne possède pas de chaîne latérale contrairement aux autres molécules. Or, il a été observé que l'affinité aux CB<sub>2</sub> augmentait avec le raccourcissement de la chaîne latérale. Donc, O3 devrait avoir plus d'affinité que ces molécules pour les CB<sub>2</sub>. [41, 42]

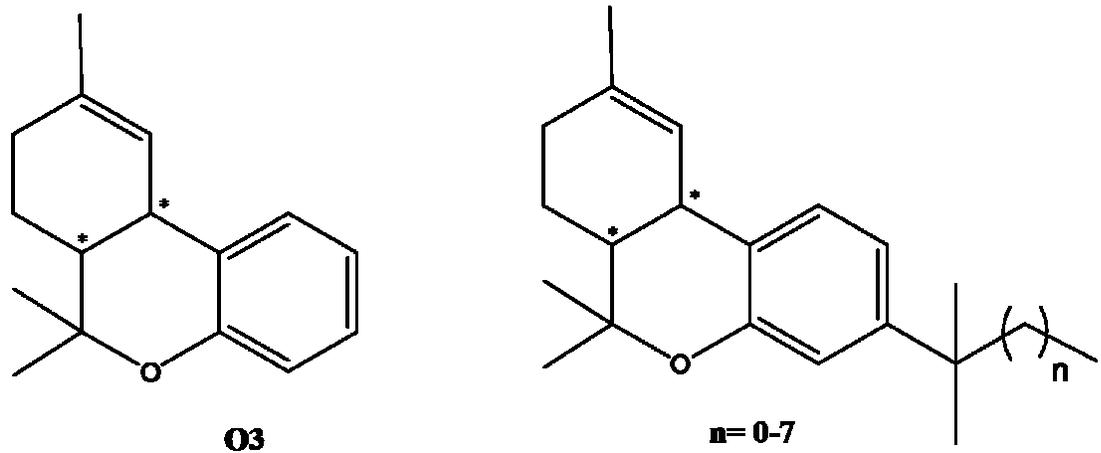


Figure 31. Comparaison entre la structure de la molécule O3 et d'autres molécules ayant une haute affinité aux CB<sub>2</sub>.

On peut, peut être, expliquer ce résultat par une dégradation des lots utilisés pour cet essai. En effet, la réalisation de cette expérience en début de projet de maîtrise n'a pas été possible pour des raisons techniques. Alors, les molécules ont été stockées à 4°C pendant environ deux ans avant d'être testées. Ce qui amène à émettre un certain doute sur leur stabilité.

De ce fait, il serait préférable de répéter cette expérience avec des molécules nouvellement synthétisées, ainsi que de mesurer leur affinité pour les récepteurs CB<sub>1</sub>, qui n'a pas, non plus, été possible pour des raisons techniques.

## Conclusions

Les composés étudiés ne sont pas cytotoxiques ; néanmoins, aux fortes concentrations, les composés azotés sont plus toxiques que les oxygénés.

Les molécules étudiées n'ont pas inhibé la prolifération des cellules tumorales. Cela montre qu'elles n'ont pas d'effets anti-tumoraux directs sur les cellules cancéreuses, mais elles pourraient quand même avoir un effet anti-tumoral en inhibant, par exemple, la migration des cellules cancéreuses métastatiques.

On ne peut pas tirer de conclusions formelles de nos tests de formation de microtubules sur matrice gélifiée à cause d'une contamination présumée, néanmoins certaines molécules montrent un effet anti-migratoire, ce qui encourage à continuer les recherches dans ce sens.

La démarche expérimentale utilisée a été focalisée sur l'étude des effets pharmacologiques, ce qui est fort pertinent. Cependant, il serait possible de l'optimiser en ayant une approche plus systématique par l'utilisation de logiciels d'arrimage virtuel pour identifier les groupements clef du pharmacophore qui contrôlent l'affinité et la sélectivité des cannabinoïdes à leurs récepteurs. Ceci permettrait de cibler, pour la synthèse, les molécules qui ont le plus fort potentiel d'activité pharmacologique sans avoir les effets spécifiquement psychotropes. Puis on pourrait commencer la partie expérimentale *in vitro* par des tests de liaison spécifique ou *binding*, qui sont des tests qui permettent de mesurer l'affinité de chacune des molécules aux récepteurs CB<sub>1</sub> et/ou CB<sub>2</sub> par méthode de saturation en utilisant des radio-ligands connus. Ceci permettrait, déjà, d'éliminer les molécules qui ont une forte affinité aux CB<sub>1</sub>. Enfin, les tests d'activité pharmacologiques pourraient être effectués :

1. Tests de liaison spécifique aux récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>
2. Test d'inhibition de la prolifération sur culture de cellules de glioblastomes humains et de cellules endothéliales humaines

3. Test de formation de microtubules sur matrices extra cellulaire (angiogénèse)

## Bibliographie

1. Kreitzer, F.R. and N. Stella, *The therapeutic potential of novel cannabinoid receptors*. Pharmacol Ther, 2009. **122**(2): p. 83-96.
2. Flygare, J. and B. Sander, *The endocannabinoid system in cancer--Potential therapeutic target?* Seminars in Cancer Biology, 2008. **18**(3): p. 176-189.
3. Bifulco, M., et al., *Endocannabinoids as emerging suppressors of angiogenesis and tumor invasion (review)*. Oncol Rep, 2007. **17**(4): p. 813-6.
4. Mackie, K. and N. Stella, *Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players*. AAPS J, 2006. **8**(2).
5. Thakur, G.A., et al., *Latest advances in cannabinoid receptor agonists*. Expert Opin Ther Pat, 2009. **19**(12): p. 1647-73.
6. Vaccani, A., et al., *Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism*. British Journal of Pharmacology, 2005. **144**(8): p. 1032-1036.
7. Burstein, S.H. and R.B. Zurier, *Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation*. AAPS J, 2009. **11**(1): p. 109-19.
8. Oesch, S. and J. Gertsch, *Cannabinoid receptor ligands as potential anticancer agents--high hopes for new therapies?* J Pharm Pharmacol, 2009. **61**(7): p. 839-53.
9. Addy, C., et al., *Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamic properties of taranabant, a novel selective cannabinoid-1 receptor inverse agonist, for the treatment of obesity: results from a double-blind, placebo-controlled, single oral dose study in healthy volunteers*. J Clin Pharmacol, 2008. **48**(4): p. 418-27.
10. Addy, C., et al., *The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 68-78.
11. Lange, J.H., et al., *Synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of novel 3,4-diarylpyrazolines as potent and selective CB(1) cannabinoid receptor antagonists*. J Med Chem, 2004. **47**(3): p. 627-43.
12. Rinaldi-Carmona, M., et al., *SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(3): p. 905-14.
13. Griffith, D.A., et al., *Discovery of 1-[9-(4-chlorophenyl)-8-(2-chlorophenyl)-9H-purin-6-yl]-4-ethylaminopiperidine-4-carboxylic acid amide hydrochloride (CP-945,598), a novel, potent, and selective cannabinoid type 1 receptor antagonist*. J Med Chem, 2009. **52**(2): p. 234-7.
14. Burstein, S.H., et al., *Ajulemic acid: A novel cannabinoid produces analgesia without a "high"*. Life Sciences, 2004. **75**(12): p. 1513-1522.
15. Madsen, M.V., et al., *The cannabinoid CB1 receptor agonist CP55,940 reduces acute oral dyskinesia induced by the dopamine D-1 receptor agonist SKF81297 in Cebus monkeys*. Nordic Journal of Psychiatry, 2004. **58**(2): p. 100-100.

16. Kraft, B., W. Wintersberger, and H.G. Kress, *Cannabinoid receptor-independent suppression of the superoxide generation of human neutrophils (PMN) by CP55 940, but not by anandamide*. Life Sciences, 2004. **75**(8): p. 969-977.
17. Brown, A.J., *Novel cannabinoid receptors*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(5): p. 567-75.
18. Fernandez-Ruiz, J., *The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(7): p. 1029-40.
19. Shim, J.Y., W.J. Welsh, and A.C. Howlett, *Homology model of the CB1 cannabinoid receptor: Sites critical for nonclassical cannabinoid agonist interaction*. Biopolymers, 2003. **71**(2): p. 169-189.
20. Snider, N.T., V.J. Walker, and P.F. Hollenberg, *Oxidation of the endogenous cannabinoid arachidonoyl ethanolamide by the cytochrome p450 monooxygenases: physiological and pharmacological implications*. Pharmacol Rev. **62**(1): p. 136-54.
21. Schley, M., et al., *Predominant CB2 receptor expression in endothelial cells of glioblastoma in humans*. Brain Research Bulletin, 2009. **79**(5): p. 333-337.
22. Xie, X.Q., J.Z. Chen, and E.M. Billings, *3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor*. Proteins-Structure Function and Genetics, 2003. **53**(2): p. 307-319.
23. Szallasi, A., et al., *The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 357-372.
24. De Petrocellis, L. and V. Di Marzo, *Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels*. J Neuroimmune Pharmacol. **5**(1): p. 103-21.
25. Wang, T., et al., *Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review*. CMAJ, 2008. **178**(13): p. 1669-78.
26. Velasco, G., et al., *Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas?* Neuropharmacology, 2004. **47**(3): p. 315-23.
27. Carracedo, A., et al., *Ceramide sensitizes astrocytes to oxidative stress: protective role of cannabinoids*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 435-40.
28. Islam, T.C., et al., *High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signalling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2003. **17**(9): p. 1880-90.
29. Ligresti, A., et al., *Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 677-87.
30. Hart, S., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 1943-50.
31. Blazquez, C., et al., *Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2633-5.
32. McFarland, M.J. and E.L. Barker, *Anandamide transport*. Pharmacology & Therapeutics, 2004. **104**(2): p. 117-135.

33. Sanchez, C., et al., *Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor*. *Cancer Res*, 2001. **61**(15): p. 5784-9.
34. Cudaback, E., et al., *The expression level of CB1 and CB2 receptors determines their efficacy at inducing apoptosis in astrocytomas*. *PLoS One*. **5**(1): p. e8702.
35. Vailhe, B., D. Vittet, and J.J. Feige, *In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis*. *Laboratory Investigation*, 2001. **81**(4): p. 439-452.
36. Blazquez, C., et al., *Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids*. *FASEB J*, 2003. **17**(3): p. 529-31.
37. Belotti, D., et al., *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(11): p. 1843-9.
38. Klein, T.W., *Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(5): p. 400-11.
39. Kozela, E., et al., *Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(3): p. 1616-26.
40. Goujon, J.Y., F. Zammattio, and B. Kirschleger, *Expeditious preparation of various Delta(9)-6a,10a cis and trans 2-substituted tetrahydrocannabinoids*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 2002(13): p. 1564-1567.
41. Thakur, G.A., et al., *Structural requirements for cannabinoid receptor probes*. *Handb Exp Pharmacol*, 2005(168): p. 209-46.
42. Poso, A. and J.W. Huffman, *Targeting the cannabinoid CB2 receptor: modelling and structural determinants of CB2 selective ligands*. *Br J Pharmacol*, 2008. **153**(2): p. 335-46.
43. Sarafian, T., et al., *Clarifying CB2 receptor-dependent and independent effects of THC on human lung epithelial cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **231**(3): p. 282-90.
44. Marshall, N.J., C.J. Goodwin, and S.J. Holt, *A CRITICAL-ASSESSMENT OF THE USE OF MICROCULTURE TETRAZOLIUM ASSAYS TO MEASURE CELL-GROWTH AND FUNCTION*. *Growth Regulation*, 1995. **5**(2): p. 69-84.
45. Mossman, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - Application to proliferation and cyto-toxicity assays*. *Journal of Immunological Methods*, 1983. **65** ((1-2)): p. 55-63.
46. Panoyan, A., R. Quesnel, and P. Hildgen, *Injectable nanospheres from a novel multiblock copolymer: cytocompatibility, degradation and in vitro release studies*. *Journal of Microencapsulation*, 2003. **20**(6): p. 745-758.
47. Hotchkiss, K.A., et al., *Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): Association with impaired repositioning of the microtubule organizing center*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002. **1**(13): p. 1191-1200.
48. Landry, Y., Gies, J-P., *Pharmacologie des cibles vers l'indication thérapeutique*. 2009.
49. Abood, M.E., Pertwee, R. G., *Cannabinoids*. 2005. 770 pages.
50. Crippen, J. *Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1987. **27**: p. 21.

51. McAllister, S.D., et al., *Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells*. Journal of Neuro-Oncology, 2005. **74**(1): p. 31-40.
52. Massi, P., et al., *Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 838-45.
53. Dunsch, C., et al., *Safety and efficacy of a novel cannabinoid chemotherapeutic, KM-233, for the treatment of high-grade glioma*. J Neurooncol, 2006. **77**(2): p. 143-52.
54. Wiig, H., C.C. Gyenge, and O. Tenstad, *The interstitial distribution of macromolecules in rat tumours is influenced by the negatively charged matrix components*. J Physiol, 2005. **567**(Pt 2): p. 557-67.
55. [http://www.tocris.com/pdfs/cannabinoid\\_receptor\\_review/page\\_003.html](http://www.tocris.com/pdfs/cannabinoid_receptor_review/page_003.html).