AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Florian MULLER

IDENTIFICATION DES CIBLES MOLÉCULAIRES DES COMPOSÉS DE LA FAMILLE DES GLYCOSIDES CARDIAQUES

2 décembre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :
Robert Kiss, Professeur, ULB, Belgique
Alessandra Kupper Cardozo, Professeur, ULB, Belgique

Examinateurs :
Mario Dicato, Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg
Stéphane Flament, Professeur, Université de Lorraine, France
Carine Michiels, Professeur, Université de Namur, Belgique
Athanase Visvikis, Professeur, Université de Lorraine, France

Encadrants :
Claudia Cerella, Docteur, LBMCC, Luxembourg
Marc Diederich, Professeur associé, Université Nationale de Séoul, Corée du Sud et LBMCC, Luxembourg

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)
9, rue Edward Steichen L2540 Luxembourg

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés

au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »

à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier de:

L'association « Think Pink Luxembourg » et du « Marian Aldred Award » en mémoire à Marian Aldred

« Télévie Luxembourg » (bourse de formation-recherche Télévie),

la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »,

l'Association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »

l'Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner

(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

Action LIONS « Vaincre le Cancer »

REMERCIEMENTS

Trois ans c’est long. Trois ans c’est court.

Au final, il me serait impossible de pouvoir affirmer l’un ou l’autre, pris dans une spirale de sentiments qui font tournoyer la thèse, j’aurais pu écrire tout autant de pages sur mon ressenti que sur mes résultats après ces années riches d’enseignements.

Avant tout, je voudrais dédier ces premières pages aux personnes et aux associations qui m’ont soutenues durant ces trois ans.

En premier lieu, je voudrais remercier le Pr Marc Diederich, qui m’a donné l’opportunité de faire ma thèse dans son laboratoire, en mettant à ma disposition tout le matériel possible pour pouvoir faire mes recherches dans des conditions optimales et de pouvoir présenter mes résultats et ce manuscrit.

Je remercie aussi le Dr Claudia Cerella, pour sa patience et ses conseils. Merci pour son soutien et son aide. Comme elle dit souvent, et certainement un des seuls mots en italien dont je me rappellerai : « Va bene ».

Un grand merci aux associations Think Pink Lux et Recherches Scientifiques Luxembourg asbl, qui ont financé mes travaux de recherche.

Je voudrais aussi remercier les membres jury, pour m’avoir fait l’honneur de leur présence et d’avoir pris le temps de lire ma thèse ; Pr Carine Michiels, Pr Stéphane Flament, Pr Athanase Visvikis, Pr Mario Dicato et notamment Pr Robert Kiss et Pr Alessandra Kupper Cardozo pour avoir accepté d’être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie tout particulièrement Pr Stéphane Flament et Pr Robert Kiss, d’avoir accepté d’être dans mon comité de thèse et de m’avoir suivi pendant ces trois années. Chaque conseil et critique reçus furent d’une extrême importance pour ces travaux.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire LBMCC présents et anciens. Notamment, Cindy, la belgo-française, la grande sœur des thésards qui nous a beaucoup aidé durant ces trois ans. Mes collègues doctorantes : Carole et ses courses effrénées dans le laboratoire au doux son de ses talons « toc toc toc » et Anne, « la meusienne », et sa célèbre phrase : « Florian Muller, j'ai une question » ainsi que la nouvelle doctorante, pimpante et pleines d'idées, Marion. La maman du labo MHT (Marie-Hélène), pour ses conseils et surtout pour le temps consacré à la relecture de mon rapport, un grand merci. Anthoula, la meilleure des bio-informaticiennes, qui avec patience m'a simplifié les biostatistiques. Les « rescapés » de la cantine, Michael et Laurent. Sébastien pour ses « life hacks » scientifiques et ses nombreux conseils photographiques. Le non moins célèbre père Franck. Merci aussi à Cristina, Dzeneta, Richard, François, Elodie, Flavia, Naïra et Esma mais aussi au couple scientifique Noémie et Cyril, et à tout ceux que j'ai pu oublier.

Merci à mes amis, ceux qui m'ont fait oublier l'espace d'un week-end ou même d'un instant que j'étais en thèse.

Et finalement, un grand merci à ma famille, ma sœur Doriane, mes parents Chantal et Christian, qui ont su supporter mes sautes d'humeur durant ces trois années, et ont continué de me soutenir.

Merci.

PUBLICATIONS

❖ Publication liée à cette thèse :

a. Early down-regulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450

Florian Muller, Claudia Cerella, Anthoula Gaigneaux, Flavia Radogna, Elodie Viry, Sébastien Chateauvieux, Mario Dicato and Marc Diederich

Cell death and disease, en révision

❖ Autres publications :

a. Celecoxib prevents curcumin-induced apoptosis in a hematopoietic cancer cell model.

Cyril Sobolewski, **Florian Muller**, Claudia Cerella, Mario Dicato, and Marc Diederich

Molecular carcinogenesis, publié

Mol carcinog. 2014 may 5. doi: 10.1002/mc.22169.

b. 2,5-Dimethyl-celecoxib inhibits cell cycle progression and induces apoptosis in human leukemia

Cyril Sobolewski, Noémie Legrand, **Florian Muller**, Claudia Cerella, Fabienne Mack, Mario Dicato, and Marc Diederich

Molecular carcinogenesis, en révision

c. Integrated cellular pathology--systems biology of human diseases.

Cyril Sobolewski, Elodie Viry, Noémie Legrand, **Florian Muller**, Franck Morceau and Marc Diederich

Biochemical Pharmacology, publié

Biochem pharmacol. 2011 nov 15;82(10):1253-5. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.032.

IDENTIFICATION DES CIBLES MOLÉCULAIRES DES COMPOSÉS DE LA FAMILLE DES GLYCOSIDES CARDIAQUES

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

1. Le cancer 1

1.1. Les cancers du sang 2

1.2. Les neuroblastomes 6

1.3. Les cancers du sein 8

1.4. La démarche thérapeutique 10

2. Le cycle cellulaire 11

3. Mort et survie cellulaire 14

3.1. L'apoptose 14

3.2. L'autophagie 16

3.3. Implication du calcium dans l'induction de l'apoptose 19

3.3.1. Le réticulum endoplasmique 19

3.3.2. Mort cellulaire via le réticulum 19

3.3.3. Lien entre les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le calcium 21

3.4. Implication des radeaux lipidiques dans l'apoptose 25

3.4.1. Radeaux lipidiques et cavéoles 25

3.4.2. Rôle dans l'apoptose 25

4. Les protéines de la famille Bcl-2 26

4.1. La famille Bcl-2 26

4.1.1. Généralités 26

4.1.2. Séquence protéique et conformation 27

4.2. Les protéines anti-apoptotiques 29

4.2.1. Bcl-2 30

4.2.1.1. Expression et fonctionnement 30

4.2.1.2. Régulation de Bcl-2 dans la mort cellulaire 31

4.2.1.3. Cible anti-cancéreuse 32

4.2.2. Mcl-1 33

4.2.2.1. Régulation de Mcl-1 35

4.2.2.1.1. Régulation transcriptionnelle 35

4.2.2.1.2. Régulation traductionnelle 35

4.2.2.1.3. Dégradation de la protéine 36

4.2.2.2. Rôle de Mcl-1 dans la mort cellulaire 38

4.2.2.2.1. Rôle de Mcl-1 dans l'apoptose 38

4.2.2.2.2. Rôle de Mcl-1 dans l'autophagie 38
4.2.2.2.3. Rôle de Mcl-1 dans le métabolisme cellulaire 40
4.2.2.2.4. Traitements ciblant Mcl-1 40
4.2.3. Bcl-xL 40
4.2.3.1. Expression et fonctionnement 41
4.2.3.2. Régulation de Bcl-xL 41
4.2.3.2.1. Régulation transcriptionnelle 41
4.2.3.2.2. Dégradation de la protéine 42
4.2.3.3. Rôle de Bcl-xL 42
4.2.3.3.1. Dans l'apoptose 42
4.2.3.3.2. Dans l'autophagie 43
4.3. Les protéines BH3 43
4.4. Les protéines pro-apoptotiques et l'induction de l'apoptose 44
5. La pompe à sodium Na^+/K^+-ATPase 44
5.1. Structure et fonctionnement 44
5.1.1. La sous-unité α 45
5.1.2. La sous-unité β 46
5.1.3. La sous-unité FXYD 46
5.1.4. Le lien avec les kinases 47
5.1.4.1. La famille Src 48
5.2. Inhibition de la pompe sodium potassium 48
5.3. La pompe sodium potassium dans les cancers 50
6. Produits naturels : source de molécules anti-cancéreuses 52
6.1. Les produits naturels et leurs effets sur la famille Bcl-2 52
6.2. Mcl-1, une cible potentielle des composés naturels 54
6.2.1. Les composés naturels induisant leurs effets au niveau de la transcription 55
6.2.2. Les composés naturels induisant leurs effets au niveau de la protéine Mcl-1 56
6.3. Etudes cliniques 57
6.4. Les glycosides cardiaques 59
6.4.1. Leur classification 59
6.4.2. Les cardénolides 62
6.4.2.1. L'UNBS1450 64
6.4.2.2. L'ouabaïne 65
6.4.3. Autres glycosides cardiaques 68
6.4.4. Application des glycosides cardiaques dans le traitement du cancer 70
6.4.5. Liens entre les glycosides cardiaques et la famille Bcl-2 72
OBJECTIFS 73

MATERIELS ET METHODES 76

1. Culture cellulaire 76

2. Traitements 77

3. Evaluation de la viabilité cellulaire 77

4. Evaluation de l'apoptose 78

4.1. Analyse de la morphologie nucléaire 78

4.2. Analyse de l'activation des caspases 78

5. Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux 79

5.1. Principe 79

5.2. Etude du potentiel mitochondrial 79

5.3. Etude du cycle cellulaire 79

5.4. Marquage MPM-2 80

6. Etude de l'expression de gènes par PCR en temps réel 81

6.1. Extraction de l'ARNm 81

6.2. PCR en temps réel 81

6.2.1. Transcription inverse 81

6.2.2. Amplification par PCR en temps réel 82

7. Transfections 82

7.1. Amplification 83

7.2. Analyse de la pureté 83

7.3. Transfection 84

8. Western Blot 84

8.1. Principe 84

8.2. Approche technique 84

9. Autres traitements 87

9.1. Inhibition de la synthèse protéique 87

9.2. Inhibition du protéasome 87

9.3. Inhibition des caspases 87

9.4. Inhibition des kinases 88

9.5. Expériences de sensibilisation 88

10. Analyse du calcium intracellulaire 89

10.1. Flux de calcium 89

10.2. Chélateurs de calcium 89

11. Modulation du cholestérol intracellulaire 89
12. Puces à ADN 90
13. Analyses statistiques 90

RESULTATS 91

1. Les glycosides cardiaques ciblent Mcl-1 91
1.1. Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques 91
1.1.1. La dégradation de Mcl-1 est précocement et ubiquitairement induite par l'UNBS1450 dans des lignées cancéreuses 91
1.1.2. Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques 95
1.1.3. Mcl-1 est la première protéine anti-apoptotique affectée par les glycosides cardiaques 99
1.2. Régulation de Mcl-1 lors de traitement avec l'UNBS1450 101
1.2.1. Les effets de l'UNBS1450 ne sont pas dépendants d'une modulation transcriptionnelle 101
1.2.2. Etude de la dégradation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 101
1.2.2.1. L'UNBS1450 n'a pas d'effet sur l' ARNm de Mcl-1 101
1.2.2.2. La diminution de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 intervient au niveau de la protéine 102
1.2.2.3. La dégradation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 implique le protéasome 107
1.2.2.4. Expression de NOXA 107
1.2.2.5. Les caspases ne sont pas impliquées dans la dégradation précoce de Mcl-1 et Bcl-xL 109
1.3. Importance de Mcl-1 dans les effets induit par l'UNBS1450 112
1.3.1. Importance de Mcl-1 dans l'induction de l'apoptose induite par l'UNBS1450 112
1.3.2. Effets de sensibilisation de l'UNBS1450 lors d'un co-traitement avec TRAIL 118

2. Implication de la voie ionique 121
2.1. Non implication de la voie ionique dans les effets induits par l'UNBS1450 ou l'ouabaïne 121
2.2. Implication de la voie non-ionique dans les effets induits par l'UNBS1450 ... 122
2.2.1. Effet de l'inhibition de kinases sur l'apoptose et la modulation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 et l'ouabaïne 122
2.2.2. Effet de l'UNBS1450 et l'ouabaïne après modulation du cholestérol cellulaire 127
2.2.3. L'inhibition de Src réduit les effets de l'UNBS1450 sur l'induction de l'apoptose 130

3. Analyse de l'effet de l'UNBS1450 sur c-Myc 136
3.1. L'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc 136
3.2. Analyse du temps de traitement nécessaire avec l'UNBS1450 pour induire ses effets modulatoires 136

4. Effets des glycosides cardiaques sur les cancers du sein 142

4.1. L'UNBS1450 induit l'apoptose dans les lignées du cancers du sein 142
4.2. L'UNBS1450 induit une augmentation de la phase G2/M 142

DISCUSSION..... 149

1. Mcl-1 est une cible des glycosides cardiaques 149

1.1. Mcl-1 est une cible précoce et ubiquitaire des glycosides cardiaques.....149
1.2. L'UNBS1450 diminue l'expression de la protéine Mcl-1 *via* un mécanisme impliquant une diminution de la stabilité protéique et le protéasome.....150
1.3. La diminution de Mcl-1 régule les effets induits par l'UNBS1450 sur l'apoptose 152
1.4. Les glycosides cardiaques sensibilisent les cellules à l'induction de l'apoptose par TRAIL.....153

2. Implication des voies ioniques et non-ioniques 154

2.1. Evidence de l'absence d'implication de la voie ionique dans les effets induits par l'UNBS1450 154
2.2. Implication de la voie ionique dans les effets induits par l'UNBS1450 154
2.3. La modulation du cholestérol est impliquée dans le mécanisme d'action de l'UNBS1450 156
2.4. Evidences de l'implication de Src dans les effets induits par l'UNBS1450.....157

3. Analyse de c-Myc et études préliminaires 158

3.1. Régulation de c-Myc.....158
3.2. Analyse du temps de traitement nécessaire avec l'UNBS1450 pour induire ses effets modulateurs.....158

4. L'UNBS1450 a un effet cytostatique en bloquant les cellules du sein en phase G2/M.....159

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES 160

Conclusions.....160

Perspectives 162

BIBLIOGRAPHIE 164

FIGURES

Figure 1 : Hématopoïèse et leucémie 4

Figure 2 : Cycle cellulaire 13

Figure 3 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose 18

Figure 4 : Autophagie 20

Figure 5 : Apoptose induite par le stress au niveau du réticulum endoplasmique 22

Figure 6 : Lien entre mitochondrie, réticulum endoplasmique et calcium 24

Figure 7 : Protéines de la famille Bcl-2 (adapté de (60)) 28

Figure 8 : Dégradation de Mcl-1 37

Figure 9 : Schéma de la pompe NKA 51

Figure 10 : Classification des glycosides cardiaques 63

Figure 11 : *Calotropis procera* et sa molécule active UNBS1450 66

Figure 12 : *Strophantus gratus et sa substance active* ouabaïne 67

Figure 13 : Voies ionique et non-ionique 69

Figure 14 : Mcl-1 est une cible précoce de l'UNBS1450 dans les lignées cancéreuses hématopoïétiques U937 et Jurkat 93

Figure 15 : Expression basale des principales protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans différentes lignées cancéreuses 94

Figure 16 : Effet de l'UNBS1450 sur l'expression de protéines anti-apoptotiques 97

Figure 17 : Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques 98

Figure 18 : Cinétique d'étude de l'expression des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 durant un traitement avec différents glycosides cardiaques 100

Figure 19 : Analyse par puce à ADN après traitement à l'UNBS1450 104

Figure 20 : Expression de l'ARNm de Mcl-1, lors d'un traitement à l'UNBS1450 105

Figure 21 : Stabilité de Mcl-1 après traitement avec l'UNBS1450 106

Figure 22 : Expression de Mcl-1 lors du co-traitement UNBS1450 et MG132 108

Figure 23 : Expression de NOXA lors d'un traitement à l'UNBS1450 110

Figure 24 : Implication des caspases dans la mort induite par l'UNBS1450 111

Figure 25 : Mise au point des transfections sur les lignées U937 et Jurkat 114

Figure 26 : Effet de l'UNBS1450 lors d'une surexpression de Mcl-1 dans la lignées SH-SY5Y 116

Figure 27 : Effet de l'UNBS1450 lorsque le protéasome est inhibé 117

Figure 28 : Sensibilisation des cellules cancéreuses par les glycosides cardiaques 120

Figure 29 : Analyse des effets des glycosides cardiaques sur la mobilisation intracellulaire du calcium 123

Figure 30 : Effet de la chélation du calcium sur l'apoptose et la modulation de Mcl-1 induites par l'UNBS1450 et l'ouabaïne 124

Figure 31 : Analyse de l'effet d'inhibiteurs de kinases, sur l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450 (A) et la ouabaïne (B) 126

Figure 32 : MBC reverse les effets de l'UNBS1450 128

Figure 33 : MBC révèle des effets différents en co-traitement avec l'UNBS1450 ou l'ouabaïne 129

Figure 34 : Induction de l'apoptose lors de co-traitements avec des molécules modifiant les concentrations de cholestérol intracellulaire 131

Figure 35 : Implication de Src dans l'induction de l'apoptose par les glycosides cardiaques 133

Figure 36 : Protection induite par un inhibiteur de Src contre l'apoptose induite par l'UNBS1450 135

Figure 37 : L'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc 138

Figure 38 : Détermination du temps d'exposition à l'UNBS1450 nécessaire pour provoquer l'apoptose..... 140

Figure 39 : Expression de Mcl-1 et c-Myc après un renouvellement de milieu 141

Figure 40 : Viabilité des cellules de cancer du sein traitées à l'UNBS1450 144

Figure 41 : Augmentation de la phase G2/M lors de traitement avec l'UNBS1450..... 145

Figure 42 : Augmentation du nombre de cellules en G2 lors de traitement à l'UNBS1450.. 148

Figure 43 : Modèle hypothétique de l'action de l'UNBS1450 sur l'apoptose..... 161

TABLEAUX

Tableau 1 : Inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2 33

Tableau 2 : Signalisation de l'apoptose, exemple de phosphorylations de Mcl-1 39

Tableau 3 : Protéines de la famille Src et leur expression 49

Tableau 4 : Exemple de composés naturels agissant sur les 10 marqueurs du cancer 60

Tableau 5 : Liste des glycosides cardiaques testés 71

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel 82

Tableau 7 : Anticorps utilisés pour le Western blot 86

Tableau 8 : Inhibiteurs de kinases 88

Tableau 9 : IC50 de l'UNBS1450 après 24 h de traitement dans différentes lignées cellulaires cancéreuses 96

ABREVIATIONS

ACTH : Adrenocorticotropine Hormone

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis inducing factor

AMPK : 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase

ANT : Adenine nucleotide translocator

APC/C : Anaphase-promoting complex/cyclosome

APAF : Apoptosis protease activating factor

Ara-C : Cytosine arabinose

ARE : AU-Rich element

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARTS : Apoptosis-related protein in the TGF-β signaling pathway

ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1

ATF : Activating transcription factor

Atg : Autophagy related genes

ATP : Adenosine triphosphate

ATRA : Acide rétinoïque

BAD : Bcl-2 Associated death promoter

BAG : BCL2-associated athanogene

Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer

BAPTA-AM : *Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid-AcetoxyMethyl ester*

Bax : Bcl-2-Associated X protein

Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2

Bcl-xL : B-cell CCL/lymphoma like extra large

Bcr/Abl : Breakpoint cluster region/abelson

BET : Bromure d'éthidium

BH : Bcl-2 homologue

Bid : Bcl-2 interacting-domain death

BIM : Bcl-2 interacting mediator of cell death

BiP : Binding immunoglobulin protein

Bmf : BCL2 modifying factor

Bok : Bcl-2 related ovarian killer

BSA : Bovine serum albumin

C-Term : COOH terminal

Caspase : Cysteinyl aspartate cleaving protein

Cdc : Cell division control

CD : Cluster de différenciation

CDK : Cyclin-dependent kinase

CHOP : C/EBP-Homologous protein

CHX : Cycloheximide

Csk : c-src tyrosine kinase

CUGBP2 : CUG triplet repeat, RNA binding protein 2

Cul3-Rbx1 : Cullin3 - RING-box protein 1

DISC : Death-inducing signaling complex

DMEM : Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTT : DL-Dithiothreitol

E2F : Elongation 2 factor

EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

EGF : Epithelial growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ERK : Extracellular signal regulated kinase

ERMES : Endoplasmique reticulum–mitochondria encounter structures

ES : Erreur standard

FADD : Fas associated death domain

FBW7 : F-box and WD repeat domain containing 7

FLD : Flexible loop domain

FSC : Forward-scattered light

GADD34 : Growth arrest and DNA damage-inducible protein

GC : Glycosides cardiaques

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GRP : Glucose-regulated protein

GSK3β : Glycogen synthase kinase 3 β

HBSS : Hank's buffered salt solution

HER : Human epidermal growth factor receptor

HIF1α : Hypoxia inducible factors

HSP : Heat shock factor protein

IAPs: Inhibitor of apoptosis proteins

IC50 : inhibition concentration

Ikkb : I-Kappa-B kinase

IL : Interleukine

IP3R : Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor

IRE : Inositol-requiring protein 1

ITAFS : IRES trans-acting factors

JAK : Janus kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinase

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique

LAM : Leucémie aigüe myéloblastique

LC3 : Light chain 3

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LMP : Lysosomal membrane permeabilization

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MBC : Méthyl-b-cyclodextrine

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1

MDM : Mitochondrial distribution and morphology protein

miR : MicroRNA

Mmm1 : Maintenance of mitochondrial morphology protein 1

Mmp : Mitochondrial membrane potential

MOMP : Mitochondrial outer membrane permeabilization

M-PER : Mammalian protein extraction reagent

MPM-2 : Mitotic protein monoclonal 2

MTD : Mitochondrial targeting domain

mTOR : Mammalian target of rapamycin

MTR : Mitotracker red

Mule : Mcl-1 ubiquitin ligase E3

MYT1 : Myelin transcription factor 1-like

NF-κB : Nuclear factor κB

NK : Natural killer

NKA : Sodium potassium ATPase

NT : Non traduit

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS : Phosphate buffered saline

PBS-T : Phosphate buffered saline – tween

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PCR : Polymerase chain reaction

PERK : PKR-like endoplasmic reticulum kinase

PEST : Proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)

PI3K : Phosphatidyl-inositol 3-kinase

PI3P : Phosphatidyl-inositol-3-phosphate

PKA : Protéine kinase A

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PMAIP1 : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

PP2A : Protein phosphatase 2

PT : Permeabilisation transition

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

PVDF : Polyvinyldifluoride

Rb : Rétinoblastome

RE : Réticulum endoplasmique

REG : Réticulum endoplasmique granuleux

REL : Réticulum endoplasmique lisse

ARNPII : ARN polymérase II

RPMI : Roswell park memorial institute

RRM2 : Ribonucleoside-diphosphate reductase M2

SBR : Scarff, Bloom et Richardson

SCF : Skp Cullin F-box containing

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-Page : Sodium dodecyl sulfate polyAcrylamide gel electrophoresis

Ser : Sérine

SERCA : Sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase

SERMs : Selective estrogen receptor modulators

SH : Src-homologue

Smac/DIABLO : Second mitochondria-derived activator of caspases

Src : Sarcome de Roux

SSC : Side scatter detector

SSO : Splice switching oligonucleotides

STAT : Signal transducer and activator of transcription

SVF : Sérum de veau fœtal

Thr : Thréonine

TK : Tyrosine kinase

TM : Transmembranaire

TNF : Tumor necrosis factor

TNR-R : TNF-receptor

TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain

TRAF2 : TNF Receptor-associated factor 2

TRAIL : TNF related apoptosis inducing ligand

TRAIL-R : TRAIL-receptor

TrCP : transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

Trim7 : tripartite motif containing 7

Tyr : Tyrosine

USP9X : Ubiquitin specific peptidase 9, X-Linked

UV : Ultra violet

UVRAG : Ultra violet irradiation resistance-associated tumor suppressor gene

VDAC : Voltage-dependent anion channels

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Vsp : Vacuolar protein sorting-associated protein

XBP1 : X-Box-binding protein 1

INTRODUCTION

1. Le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée ainsi que par une perte de sensibilité aux signaux inducteurs de la mort cellulaire programmée. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par dix marqueurs jouant chacun un jeu dans la mise en place de la tumeur, et représentant chacun une cible potentielle pour des thérapies anti-cancéreuses. Ces marqueurs, décrits par Hanahan et Weinberg (1), sont les suivants : un message de prolifération par l'activation constitutive de récepteurs de croissance, une insensibilité aux inhibiteurs de la prolifération cellulaire, une protection contre le système immunitaire, une activation des télomérases, une induction de l'inflammation, une capacité à créer des métastases, une promotion de l'angiogenèse, une instabilité du génome, une résistance aux différents types de mort cellulaire et une dérégulation du système énergétique. Les chimiothérapies, qui ciblent essentiellement les cellules à prolifération rapide, présentent cependant de nombreux effets secondaires et sont confrontées au développement de mécanismes de résistance. Pour contrecarrer ces différents problèmes, d'autres approches thérapeutiques ciblant d'autres marqueurs cellulaires, tels les inhibiteurs de l'angiogenèse (*i.e.* anti-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)), les stimulateurs du système immunitaire (*i.e.* interleukines) ou les facteurs de l'inflammation voient le jour. Ces approches, visant à traiter, mais également à prévenir, le développement de cancer, se basent sur l'utilisation de molécules d'origine naturelle telle la curcumine, pour laquelle de nombreux tests cliniques sont en cours, notamment pour ses effets radioprotecteurs/sensibilisateurs dans les cancers de la prostate, ou encore en combinaison avec des agents de chimiothérapie tel le FOLFOX (acide folinique, fluorouracile et oxaliplatine) dans les cancers colorectaux (source : https://clinicaltrials.gov).

Les cellules cancéreuses peuvent prendre naissance dans différents types cellulaires, et leur classification se fera en fonction du type cellulaire affecté. Les cancers, appelés « carcinomes » concernent les cellules épithéliales (*i.e.* cancers digestifs, de la peau), les « sarcomes » touchent les cellules d'origine conjonctive ou de support, tels que les tissus cartilagineux et les os. Les cancers touchant les cellules du sang regroupent les lymphomes et les leucémies.

Notre projet se focalisera sur l'étude de l'effet des glycosides cardiaques (GCs) et leur habilité à induire la mort cellulaire et à bloquer la prolifération cellulaire dans les leucémies et dans des modèles de cancer d'origine neuroblastique et mammaire. Les prochains paragraphes introduiront sommairement ces trois types de cancer, qui seront nos modèles principaux lors de notre étude. Pour certaines expériences, nous avons également utilisé d'autres lignées cellulaires à terme de comparaison. Ces lignées représentent des cancers fréquents et agressifs chez les adultes ou/et les enfants, en particulier des cancers de la prostate, du poumon ou du sein.

1.1. Les cancers du sang

Les leucémies et les lymphomes sont des cancers des cellules du sang. Les leucémies sont des cancers circulants qui ont pour origine la moelle osseuse, le siège de la fabrication des cellules sanguines (*i.e.* hématies, lymphocytes, monocytes) (Figure 1). Cette caractéristique les différencie des lymphomes (leucémie lymphoïde) qui se déclarent dans les aires lymphoïdes secondaires, (*i.e.* rate, thymus) des zones importantes pour l'activation de la réponse immunitaire (Figure 1). Les cancers du sang sont caractérisés par une prolifération anarchique des précurseurs de cellules sanguines qui va perturber le déroulement normal de l'hématopoïèse et induire un déficit de la fabrication de plusieurs types cellulaires. Ainsi, les patients atteints de leucémie présentent une leucopénie (déficit en leucocytes), une neutropénie (déficit en polynucléaires) ou une thrombopénie (déficit en plaquettes). La classification des leucémies se fait suivant leur niveau de différenciation et leur vitesse de prolifération, deux paramètres qui peuvent être étroitement liés. Ainsi une leucémie aigüe sera caractérisée par une prolifération rapide, à l'inverse d'une leucémie chronique. La combinaison des paramètres prolifératifs et de localisation de la leucémie conduisent à un classement en quatre grandes familles pouvant être elles aussi divisées en sous familles :

- **La leucémie aigüe lymphoblastique** (LAL) :

Elle est courante chez les enfants (70%) mais peut aussi apparaître chez les adultes. Cette leucémie touche les précurseurs lymphoïdes qui sont immatures. Cette famille de leucémie est classée selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en trois sous familles (source : www.who.int/fr/). Pour chacune, des traitements spécifiques sont proposés (http://emedicine.medscape.com/).

- Les LAL des précurseurs B ou des précurseurs T sont des formes surtout liées à des translocations entre chromosomes, la plus fréquente est entre les chromosomes 12 et 21 ou la plus connue la fusion BCR-Abl (*Breakpoint Cluster Region/Abelson*) entre les chromosomes 9 et 11 (2).

- La leucémie de Burkitt est une forme agressive des LAL, liée à une activation par mutation de c-Myc sur le chromosome 8 pouvant faire suite à une infection par le virus Epstein-Barr ou le VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*). Elle représente moins de 1% des cas (3).
- La leucémie biphénotypique se traduit par la présence de lignées myéloïdes et lymphoïdes et représente environ 5% des cas de LAL. Ce type de leucémie induit une fièvre, des douleurs osseuses, de multiples infections, l'anémie, la thrombopénie et la neutropénie (4).
- Le traitement de la leucémie aigüe se fait en trois étapes : la première est la phase d'induction qui correspond à un traitement avec plusieurs anti-cancéreux (vincristine, prednisone, anthracycline, et cyclophosphamide) afin de tuer rapidement les cellules cancéreuses. Cette étape est suivie par la phase de consolidation, qui permet de diminuer les rechutes, grâce à l'utilisation de composés tels l'étoposide, la cytosine arabinoside (Ara-C), la 6-thioguanine et la daunorubucine. La dernière phase, dite de maintenance, permet de tuer les cellules résiduelles en utilisant des traitements oraux tels que la mercaptopurine ou le méthotrexane, accompagnés d'injections de vincristine ou de prednisone par exemple. Le taux de guérison varie entre 20 et 40% avec les traitements actuels.

- **<u>La leucémie aigüe myéloblastique (LAM)</u>**

Cette leucémie est caractérisée par l'arrêt de la maturation des précurseurs hématopoïétiques et la présence de précurseurs indifférenciés dans la moelle osseuse. Le risque de développement de LAM augmente avec l'âge des personnes. Ce type de leucémie est souvent diagnostiqué dans les pays développés.

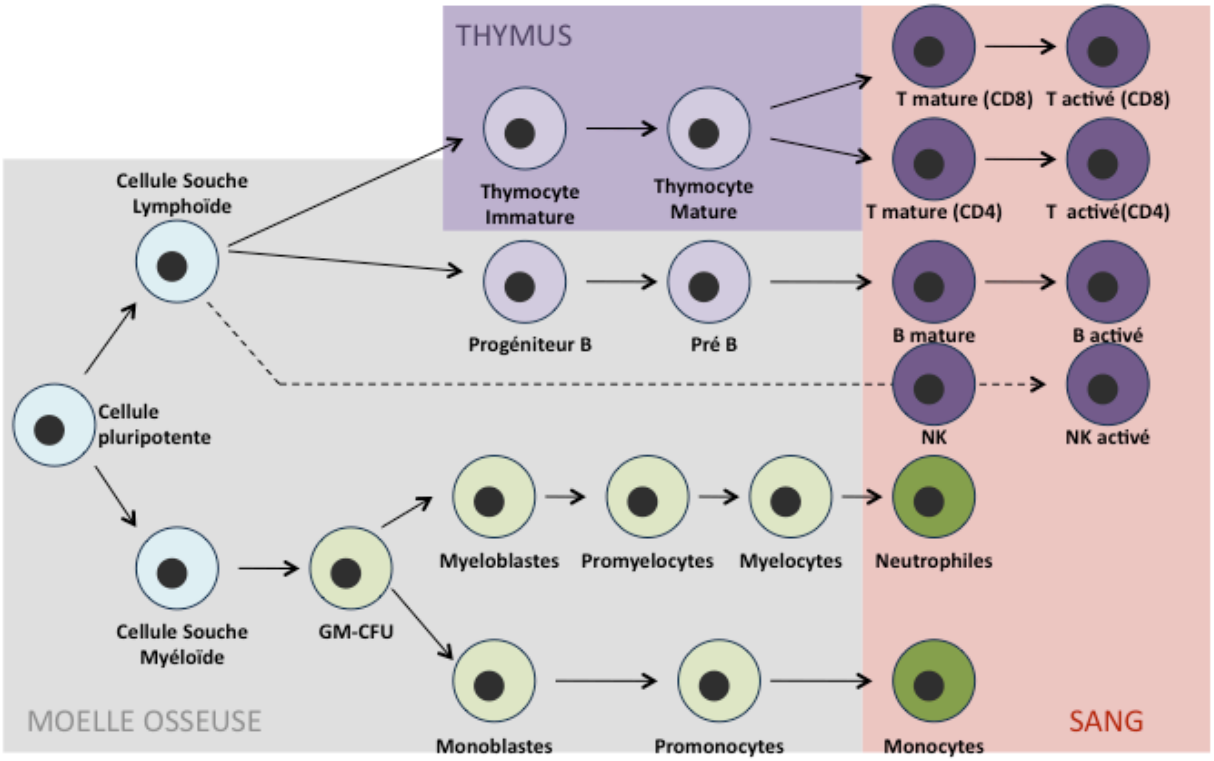


Figure 1 : Hématopoïèse et leucémie

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes cellulaires, conduisant à la régénération ou la fabrication des cellules sanguines. Elle débute dans la moelle osseuse, peut se poursuivre dans le thymus, et se termine dans le sang. Ce mécanisme complexe fait intervenir de nombreuses étapes de différenciation cellulaire. Les leucémies résultent d'un désordre de l'hématopoïèse. Leur classification dépend du stade de différenciation des cellules touchées. Les leucémies peuvent être myéloïdes ou lymphoïdes, chroniques (syndrome prolifératif) ou aigües (syndrome prolifératif sans différenciation).

Les traitements les plus fréquents pour les types LAM sont appelés « 3 et 7 ». Ce sont des traitements intraveineux de moins de trente minutes tous les 3 jours avec de l'anthracycline ou de l'anthracenedione, combinés à sept jours d'infusion avec l'Ara-C (*Cytosine Arabinose*). Dans le cas des LAM de type promyéloïdaire, présentant une mutation du récepteur à l'acide rétinoïque et une pancytopénie, les patients sont souvent traités avec une combinaison d'ATRA (*acide rétinoïque ou Trétinoïne*) et d'agents chimiothérapeutiques conventionnels (5, 6). Les meilleurs pronostic vont jusqu'à 75% de survie pour des patients montrant avec t(8;21), t(15;17), contrairement au patients ne possédant pas ces modifications cytogénétiques qui ont un taux de survie de 25%.

- **La leucémie lymphoïde chronique (LLC)**

Ce type de leucémie caractérisée par une accumulation dans la moelle osseuse de lymphocytes B en phase mature (B) ou pré-mature (pré-B) ou de lymphocytes T incompétents (pour 5% des cas) certainement à cause d'une défaillance dans l'apoptose. Les lymphocytes incompétents vont envahir le sang, la moelle ainsi que de nombreux organes. Ce sont les leucémies les plus fréquentes chez les adultes (7).

Selon la présence ou l'absence de cellules de Reed-Sternberg (grosses cellules à noyau polylobé), le lymphome sera de type Hodgkinien ou non Hodgkinien (8).

Les traitements actuels proposés sont la chimiothérapie utilisant des analogues de nucléotides, mais aussi la transplantation allogénique de cellules souches pour permettre une réaction greffe *versus* leucémie (9). Ce type de leucémie ne montre pas de un bon pronostic, en effet, les patients sans complications vivent entre 5 à 10ans.

- **La leucémie myéloïde chronique (LMC)**

Cette leucémie est rare et se caractérise par un syndrome myéloprolifératif, notamment à cause de la fusion du chromosome 22 et 9 (chromosome de Philadelphie), qui crée une protéine non fonctionnelle BCR/Abl (récepteur tyrosine kinase (TK) suractif). Cette TK suractivée sera la cause de l'activation de nombreux autres messagers impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Elle touche des patients entre trente et cinquante ans. Les symptômes apparaissent quelques mois après le début de la maladie (10).

Les années 2000 ont connu une révolution pour le traitement de la LMC grâce à la mise sur le marché du Glivec® (ou 2-phényl-amino-pirymidine ou imatinib), un inhibiteur compétitif de l'ATP (*Adénosine TriPhosphate*) sur les récepteurs TK, qui induit peu d'effets secondaires. Le Glivec® va remplacer l'ATP sur la TK, et ainsi empêcher l'activité du récepteur, qui a besoin d'ATP pour fonctionner. Les autres traitements sont l'allogreffe et l'utilisation d'interféron α. Ce composé a permis d'augmenter le taux de survie de plus de 2ans, initialement le taux de survie était de 2 à 3 ans, depuis ce traitement le taux de survie est d'au moins 5 ans.

La LMC peut se transformer avec le temps en LAM, et échapper ainsi à la plupart des traitements.

1.2. Les neuroblastomes

Les cancers, touchant les cellules neurales ou cellules souches programmées à se différencier en cellules neurales, sont classés en différents groupes selon l'OMS, en fonction du type cellulaire touché ou de la localisation de la tumeur. Ces cancers peuvent être crâniens ou extracrâniens.

Les neuroblastomes tout comme les ganglio-neuroblastomes ou encore les ganglio-neuromes sont des cancers des cellules dérivant de la crête neurale, décrits pour la première fois par Virchow en 1863 (11). Leur classification peut se faire par deux systèmes soit par « Pediatric Oncology Group » ou par « Shimada ». Le premier se base essentiellement sur la différenciation, alors que le second combinera l'histologie (différenciation, architecture, grade, stroma, mitose) et l'âge du patient (11).

La crête neurale se forme ventralement à la fin de la gastrulation à partir du feuillet ectodermique entre la plaque neurale et les cellules non-neurales, et est composée d'une population de cellules multipotentes pouvant à terme se différencier en une multitude de types de cellules le long de la crête neurale, que ce soit des tissus osseux, cartilagineux, mésenchymateux ou encore gliaux. Par conséquent, une malformation à ce niveau peut avoir des conséquences aussi dramatiques que variées pour l'embryon, causée par la multitude de types cellulaires et de structures formées par la crête neurale au niveau embryonnaire. Ces anomalies sont les neurochristopathies (12).

Les neuroblastomes sont les cancers extracrâniens les plus fréquents chez l'enfant, car ils sont issus d'une structure embryonnaire pas encore tout à fait terminée. Selon la structure où se développe la tumeur, les neuroblastomes peuvent-être palpables et/ou douloureux. L'apparition du neuroblastome chez des enfants avec des prédispositions familiales se produit à environ neuf mois, contre dix-huit mois pour la population générale. Il semblerait qu'il existe un facteur héréditaire, cependant la plupart des cas apparaissent spontanément par activation d'oncogènes, mutations, réarrangements chromosomiques ou gain/perte de chromosomes entiers (type 1). Ces dernières sont de bon pronostic et apparaissent avant l'âge d'un an, contrairement aux autres qui par exemple, surexpriment souvent l'oncogène n-Myc ou ont une délétion du chromosome 1p (type 2B) ou encore gagnent une copie du chromosome 17p ou expriment le récepteur à la neutrophine et son ligand (type 2A). Leurs métastases apparaissent le plus souvent au niveau des poumons, du foie et du système nerveux (13).

Due à la multipotence des cellules de la crête neurale et leur position, ces cancers pourront apparaître dans différentes zones, dans les glandes surrénales ou dans la zone rétropéritonéale, pour les plus fréquents ou encore au niveau du médiastin antérieur, du cou et du pelvis. Mais ces cancers pourront également être de types différents et composés de cellules neuroblastiques (N), de cellules plates et/ou adhérentes (S) ou de cellules intermédiaires (I) (13).

Les traitements des neuroblastomes en général dépendent du risque et de l'agressivité du cancer. Si le cancer est à faible risque, parfois seule une chirurgie et un suivi seront nécessaires. En revanche si le cancer est agressif, de nombreuses approches sont possibles, incluant une chirurgie, alliée à une approche chimiothérapeutique (souvent efficace) utilisant en général la cisplatine, la doxorubicine ou l'étoposide ou plus rarement un inhibiteur de topoisomérase I (Topotecan) couplé au cyclophosphamide. L'immunothérapie peut-être une autre alternative, notamment en ciblant certains glycanes exprimés seulement par les cellules embryonnaires, dans les cancers agressifs l'immunothérapie peut-être couplée à un traitement au GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) ou à l'interleukine (IL)-2 afin de stimuler le système immunitaire, notamment les cellules NK (*Natural Killer*) et neutrophiles. D'autres approches sont aussi utilisées telles que la radiothérapie, l'utilisation de molécules anti-angiogéniques ou encore la transplantation de cellules de la moelle (5). Même si globalement l'efficacité des traitements augmente, le taux de guérison est directement lié aux protéines surexprimées (*i.e.* N-myc) ou à la ploïdie des cellules cancéreuses ; par exemple

les cas de triploïdie ont un très bon pronostic contrairement au cas montrant une délétion sur les chromosomes 1 ou 11, ou une trisomie du chromosomes 17q (selon l'*Association Arcagy*).

1.3. Les cancers du sein

Selon « La Ligue contre le cancer » (source : http://www.ligue-cancer.net/), une femme sur neuf sera confrontée au cancer du sein et un peu moins d'une sur trente en décèdera. En France, plus de 50 000 nouveaux cas sont dépistés chaque année, dont plus de 75% se déclarent après 50 ans. D'après les observations de l'OMS, le cancer du sein est de loin le premier cancer développé chez les femmes, et 20% d'entre eux seront mortels. A l'heure actuelle, bien que le nombre de cas diagnostiqués augmente, les issues fatales diminuent grâce au dépistage précoce et à l'amélioration des traitements. Notons que les femmes ne sont pas les seules touchées, puisque un cancer sur cent sera diagnostiqué chez les hommes.

Les cancers du sein se classent en deux groupes selon l'OMS (résumé dans la revue de Vuong D. *et al. (14)*) en fonction de leur localisation et leurs propriétés anatomopathologiques :

- **Les tumeurs épithéliales non infiltrantes :**

Dans ce type de cancers, les cellules tumorales restent cloisonnées, ne traversent pas la lame basale et n'envahissent pas les tissus environnants. Les cancers les plus fréquents de ce type sont :

  - Le carcinome canalaire *in situ* : détectable par radiographie, palpable et présente des lésions cutanées. Cette atteinte est curable, mais dans certains cas le cancer peut devenir invasif et envahir les ganglions environnants.
  - Le carcinome lobulaire *in situ :* la découverte de ce type de tumeur est souvent fortuite car peu détectable, elle est le plus souvent bénigne mais peut-être le signe d'un cancer ultérieur.

- **Les tumeurs épithéliales infiltrantes :**

Ce groupe rassemble un grand nombre de type de tumeurs qui ne restent pas cloisonnées et se différencient. Leur agressivité corrélée avec le grade histopronostique SBR (*Scarff*

Bloom Richardson) allant de I à III, est définie en fonction de la formation de tubes ou glandes, des anisocaryoses et du nombre de mitoses.

Comme décrit précédemment, le grade SBR permet de connaître l'agressivité du cancer, grâce à l'étude de trois paramètres en respectant un barème donné. De plus, cette étude histologique peut-être couplée avec l'étude cytologique (expression ou non de certaines protéines).

Pour le traitement des cancers du sein, la chirurgie sera un passage obligatoire, par ablation soit de la tumeur (tumorectomie), soit d'une partie du sein (segmentectomie), ou du sein en totalité (mastectomie). En parallèle, grâce à l'injection d'un colorant, qui remontera le long des vaisseaux lymphatiques, le chirurgien pourra retirer le ganglion sentinelle, c'est-à-dire le premier ganglion drainant la lymphe du sein. Son analyse permettra de définir s'il a été colonisé ou non par des métastases, actuellement ces traitements font monter le taux de survie à 10 ans à 75%. D'autres traitements pourront être couplés à la chirurgie, en fonction de l'avancée et du grade de la tumeur, mais aussi en fonction de leur sensibilité aux hormones (présence, surexpression ou absence des récepteurs hormonaux sur les cellules tumorales, à noter qu'environ 80% des cancers du sein sont hormono-dépendants) (15):

- *Chimiothérapie* : utilisée surtout pour les cancers du sein infiltrant ou pour stabiliser la maladie lorsque cette dernière s'est métastasée. Les agents chimiothérapeutiques utilisés sont par exemple des combinaisons de docetaxel (pertubateur de microtubules) avec la doxorubicine (inhibiteur de la topoisomérase-II) ou le cyclophosphamide (agent alkylant). Des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléotidiques pourront aussi être utilisés (*i.e.* méthotrexate ou gemcitabine) (16-18).
- *Radiothérapie* : elle consiste à appliquer des rayons ionisants sur le site de développement de la tumeur de manière à tuer les cellules tumorales résiduelles après une chirurgie, mais également pour ralentir le développement de métastases, à noter que la radiothérapie peut être utilisée avec une chimiothérapie (19).
- *Hormonothérapie* : cette méthode a pour but de ralentir ou de bloquer l'action des hormones en les empêchant d'être synthétisées ou d'agir sur leurs récepteurs. Par exemple, les SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*), dont le chef de file est le tamoxifène, sont des molécules qui se fixent sur les récepteurs hormonaux et empêchent l'hormone naturelle d'agir et d'induire la prolifération cellulaire (20).

- *Thérapie ciblée :* ce type de traitement va directement inhiber un mécanisme propre au cancer du sein en utilisant généralement des anticorps monoclonaux ciblant un récepteur exprimé sur les cellules tumorales mammaires. Cette thérapie peut être utilisée seule ou en combinaison avec des traitements chimiothérapiques conventionnels. En traitement seul il y aura par exemple le pertuzumab qui va cibler le récepteur HER (*Human Epidermal growth factor Receptor*) et empêcher son activation par dimérisation (21). En combinaison il peut il y avoir trastuzumab, qui agit comme le pertuzumab, couplé avec le bévacizumab ce dernier composé va lui cibler spécifiquement le VEGF (22).

1.4. La démarche thérapeutique

Les stratégies thérapeutiques sont spécifiques des types de cancers (http://emedicine.medscape.com/). Dans le cas de cancers solides, la première approche la plus fréquemment utilisée est la chirurgie qui permet l'ablation de la tumeur ou de l'organe affecté. Selon le type de cancer, sa progression, son agressivité, le développement de métastases et afin de diminuer le risque de récidive du à la présence de cellules cancéreuses résiduelles, le protocole post-opératoire implique des traitements soit physiques (radiothérapie, thérapie photodynamique) soit médicamenteux (chimiothérapies ou immunothérapies). La chimiothérapie vise à inhiber la prolifération et à induire la mort des cellules cancéreuses. Cependant, comme ce traitement cible toutes les cellules à division rapide, il affecte non seulement les cellules cancéreuses, mais aussi celles du tractus digestif, les phanères et les cellules souches. L'immunothérapie consiste à activer le système immunitaire en injectant des cytokines, des interleukines ou des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs de la tumeur, mais provoquent des réactions immunitaires généralisées et peuvent altérer de nombreux organes par réaction auto-immune, comme par exemple dans le cas du cancer du poumon (23). La radiothérapie agit par émission d'énergie lumineuse (rayon γ par exemple) au cœur de la tumeur afin de provoquer des mutations aberrantes et d'induire l'apoptose. Le manque de précision conduit à des rechutes dues à la persistance de cellules cancéreuses viables, ou provoque des dommages collatéraux aux organes environnants. La thérapie photodynamique, consiste à injecter une molécule photoactivable qui une fois activée par une lumière laser de faible intensité à une longueur d'onde spécifique, va réagir avec l'oxygène environnant et induire la production de molécules cytotoxiques (oxygène singulet et radicaux libres). Cette technique, uniquement applicable

aux tumeurs localisées, permet un bon ciblage de la tumeur, une préservation des tissus sains environnants mais est limitée par l'accessibilité de la tumeur par la lumière laser, et par la concentration en oxygène du tissu tumoral, elle est utilisée par exemple dans le cas de cancer de l'oesophage (24). Comme dans le cas de la radiothérapie, cette technique peut laisser subsister des cellules cancéreuses.

Une nouvelle méthodologie prometteuse dans le traitement des cancers a vu le jour. Il s'agit de l'utilisation de nanoparticules qui vont, d'une part protéger le principe actif des systèmes de détoxification de l'organisme et, d'autre part cibler la tumeur grâce à différents mécanismes. En effet, leur taille leur permet de passer au travers des endothéliums fenêtrés des tumeurs, conséquence d'une angiogenèse imparfaite, de plus, par leur association avec des anticorps anti-tumoraux spécifiques, ces capsules ciblent uniquement les cellules cancéreuses (25).

Par ailleurs, une autre voie d'étude propose d'utiliser des lymphocytes T du patient modifiés génétiquement par l'utilisation d'un virus du VIH inoffensif. Ces lymphocytes T vont alors détruire les lymphocytes B cancéreux non différenciés. Cette étude prometteuse a permis à neuf patients sur douze d'entrer en rémission, malgré de nombreuses rechutes (26).

2. Le cycle cellulaire

Ce mécanisme physiologiquement responsable de la division cellulaire est souvent impliqué dans le développement des cancers, puisque son activation constitutive dans les cellules cancéreuses induit une prolifération incontrôlée.

Divisé en phases G0, G1, S, G2, M (Figure 2) dont chacune est séparée par des points de contrôle, qui empêchent ou non le passage à la phase suivante, le cycle cellulaire est régulé par des complexes protéiques Cyclines-CDKs (*Cyclin Dependent Kinase*), et des protéines qui inhibent la progression du cycle cellulaire comme les CDKi (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitors*) de la famille Cip/Kip (p27, p21, p57) et INK4 (p15, p16, p18, p19) (27).

Lors de la stimulation de la cellule par des facteurs de croissance, la cellule sort de sa quiescence (G0) pour entrer en phase G1. Il s'en suit l'induction de voies de signalisation intracellulaire comme par exemple la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), conduisant à l'activation de facteurs de transcription, qui activent les oncogènes tels, *c-fos*, *c-jun* ou encore *c-myc*. Ces oncogènes induisent l'expression de protéines impliquées dans la progression de la phase G1 telles que la Cycline D. La Cycline D permet l'activation de CDKs dont les CDKs 4, 6 et 2 qui vont phosphoryler la protéine Rb (Rétinoblastome), point

de départ pour le passage de la cellule en phase S. Cette phosphorylation conduit à la libération d'un facteur de transcription E2F-1/2 (*Elongation-2 Factor*) qui permet la transcription des gènes nécessaires à la phase S du cycle cellulaire comme PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), qui permet d'augmenter l'efficacité de l'ADN polymérase II (27, 28). La transition G2/M est régulée par le complexe Cycline B-CDK1 également appelé « *Mitosis-Promoting Factor* » (facteur de promotion mitotique). Les complexes Cyclines B-CDK1 s'accumulent progressivement pendant la phase G2. Ces complexes sont inactifs avant la phase G2 car phosphorylés par les kinases Myt1 et Wee1. Leur activation nécessite l'intervention de la phosphatase CDC25C (*Cell Division Control 25C*) lors de l'entrée en mitose (27, 29).

Afin de contrôler que la réplication de l'ADN se déroule correctement, de nombreux mécanismes entrent en jeu. Ils consistent à vérifier l'état de l'ADN pendant, avant et après la réplication de l'ADN et à vérifier que les microtubules sont correctement attachés au niveau du kinétochore lors de la séparation des chromatides sœurs (27, 29, 30). Le cycle cellulaire est ainsi divisé en trois points de contrôle (ou « *checkpoint* ») : G1-S (*DNA damage checkpoint*), G2 (*DNA replication checkpoint*) et M (mitose ; *Mitotic checkpoint*). Ces points de contrôle font intervenir diverses protéines dont des inhibiteurs de CDKs (les CDKi) qui inhibent l'activité des CDKs. Ce sont, par exemple :

- La protéine p53 : en réponse aux dommages à l'ADN, cette protéine peut bloquer et induire la mort cellulaire en induisant p21, la caspase-2 et des protéines BH3 (*Bcl-2 Homologue 3*) comme NOXA ou PUMA (*P53 Upregulated Modulator of Apoptosis*).
- La protéine p21 : inhibiteur de la CDK2, par blocage du site de fixation de l'ATP, cette protéine exerce son action en G1 mais surtout en phase S grâce à son interaction avec PCNA.
- La protéine p16 : intervenant à la transition G1/S, et inhibe le cycline D1 en la séparant des CDK 4 ou 6.
- La protéine p27 inhibe le complexe Cycline D1/CDK présent en phase G1.

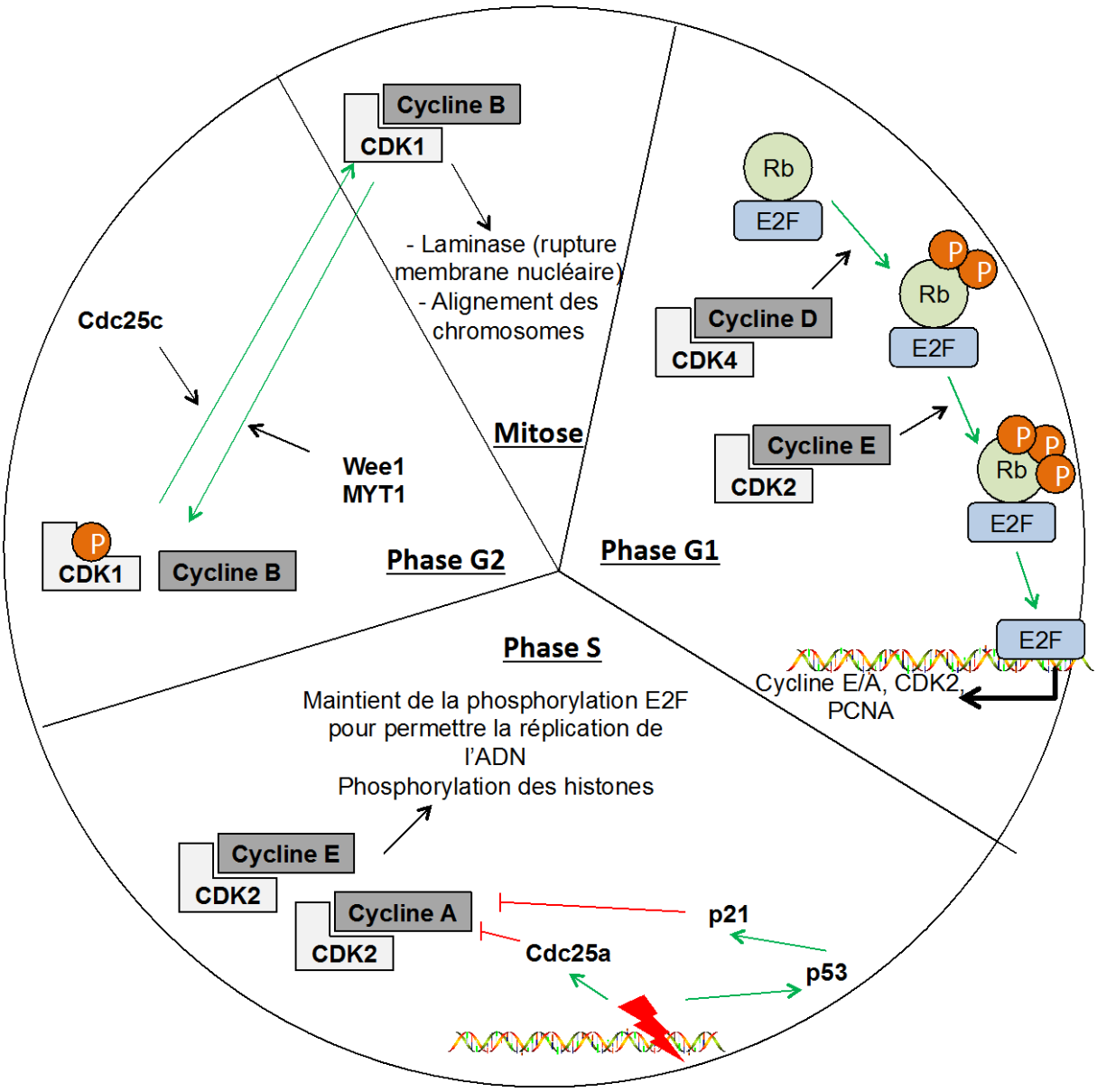


Figure 2 : Cycle cellulaire

Cette illustration résume le cycle cellulaire, montrant l'implication de différentes protéines régulatrices. E2F : Elongation-2-factor, RB : Rétinoblastome, CDK : Cyclin-dependent kinase, PCNA : Proliferating cell nuclear antigen, Cdc : Cell division control, MYT1 : Myelin transcription factor 1-like.

3. Mort et survie cellulaire

3.1. L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée, induit soit lors du développement embryonnaire pour la destruction des neurones surnuméraires ou des membranes interdigitales, soit pour lutter contre une infection, soit pour empêcher un développement tumoral lorsque l'ADN (acide désoxyribonucléique) est endommagé (31). Les cancers possèdent une défaillance dans les mécanismes de mort cellulaire, rendant les cellules immortelles.

L'apoptose induit des modifications morphologiques telles que la condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau, la formation de corps apoptotiques et une externalisation des phosphatidylsérines membranaires (32). Ce type de mort cellulaire n'est pas accompagné de réactions inflammatoires comme dans le cas de la nécrose. L'apoptose peut être déclenchée par des signaux d'origine extracellulaire comme des cytokines (voie extrinsèque) ou intracellulaire suite à des dommages à l'ADN, la présence d'un stress et/ou la perméabilisation de membranes mitochondriales (voie intrinsèque) (33, 34).

La voie extrinsèque fait intervenir différents récepteurs de surface appelés « récepteurs de mort » tels que les récepteurs TNF-R1 (*Tumor Necrosis Factor-Receptor 1*), Fas et TRAIL-R1/R2 (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor 1/2*) qui sont activés par leurs ligands respectifs et se trimérisent pour former des homotrimères. Après fixation du ligand, un complexe protéique se forme au niveau du domaine intracellulaire des récepteurs à savoir le complexe « FADD » (*Fas-Associated Death Domain*) pour Fas et TRAIL et le complexe TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death domain*) puis FADD pour TNF. Dans les deux cas, il y a formation, au niveau cytoplasmique du récepteur, du complexe DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (35), qui permet la fixation des pro-caspases (*Cysteinyl ASpartate cleaving Protein*) -8 ou -10, qui sont alors activées par protéolyse pour donner respectivement la caspase-8 et la caspase-10. Ces dernières activent les caspases effectrices de l'apoptose, telles que les caspases-3, -6 et -7 (33) (Figure 3A).

L'apoptose peut aussi être activée par des signaux intracellulaires (voie intrinsèque) tels que l'altération de l'ADN et le stress induit par des agents chimiothérapeutiques (*i.e.* blocage de la mitose). Cette voie met en jeu les mitochondries. En effet, ce mécanisme est caractérisé par des altérations de la membrane mitochondriale comme la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP : *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) ainsi qu'une perte du potentiel membranaire mitochondrial (MMP :

Mitochondrial Membrane Potential) (31). Ces altérations vont conduire au relargage, par la mitochondrie, de facteurs inducteurs de l'apoptose tels que le cytochrome c qui se complexe à la pro-caspase-9 et l'APAF (*Apoptosis Protease Activating Factor*), formant ainsi « l'apoptosome ». La pro-caspase-9 est ensuite activée en caspase-9 qui, à son tour, active la caspase-3 effectrice de l'apoptose par induction d'endonucléases. Cette voie est contrôlée par un équilibre entre facteurs de la famille Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) : pro-apoptotiques tels que Bax (*Bcl-2-Associated X protein*), Bak (*Bcl-2 homologous Antagonist Killer*) et anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL (*B-Cell Lymphoma-eXtra Large*), Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia 1*).

La famille Bcl-2 comporte plus de vingt membres qui diffèrent par leur structure mais conservent une région propre : la région BH (*Bcl-2 Homologue Domain*). Cette région est partagée par toutes les protéines régissant la mort et la survie cellulaire, ce qui leur permet de se complexer entre elles. Généralement Bax et Bcl-2 forment un hétérodimère et quand ce dernier est majoritaire, la cellule n'entre pas en apoptose. Au contraire, en cas de formation d'homodimères de facteurs pro-apoptotiques Bax ou Bak, la cellule entrera en apoptose.

Cette homodimérisation s'effectue suite à une induction de leur expression ou suite à une diminution d'expression ou à la neutralisation de protéines antagonistes anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-xL (31). En réponse aux dommages à l'ADN ou à d'autres conditions de stress, la protéine p53 suppresseur de tumeurs est activée. p53 permet, d'une part, le blocage du cycle cellulaire permettant ainsi la réparation de l'ADN, et d'autre part l'expression de protéines pro-apoptotiques. Par conséquent, si la réparation de l'ADN n'est pas assez rapide, la cellule entrera en apoptose (30). L'activation de Bax, quant à lui, induit un changement de conformation de la protéine, qui lorsqu'elle sera dimérisée induira la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. L'apoptose induite par la voie intrinsèque est également régulée par d'autres types d'interactions comme celles des IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*) qui interagissent avec les caspases pour les inhiber, ces mêmes IAPs peuvent, elles-mêmes, être inhibées par les protéines ARTS (*Apoptosis-Related protein in TGF β Signaling pathway*). Ces mêmes protéines peuvent être inhibées par les protéines pro-apoptotiques Smac/Diablo relarguées de la mitochondrie lors de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (31, 33, 34) (Figure 3B).

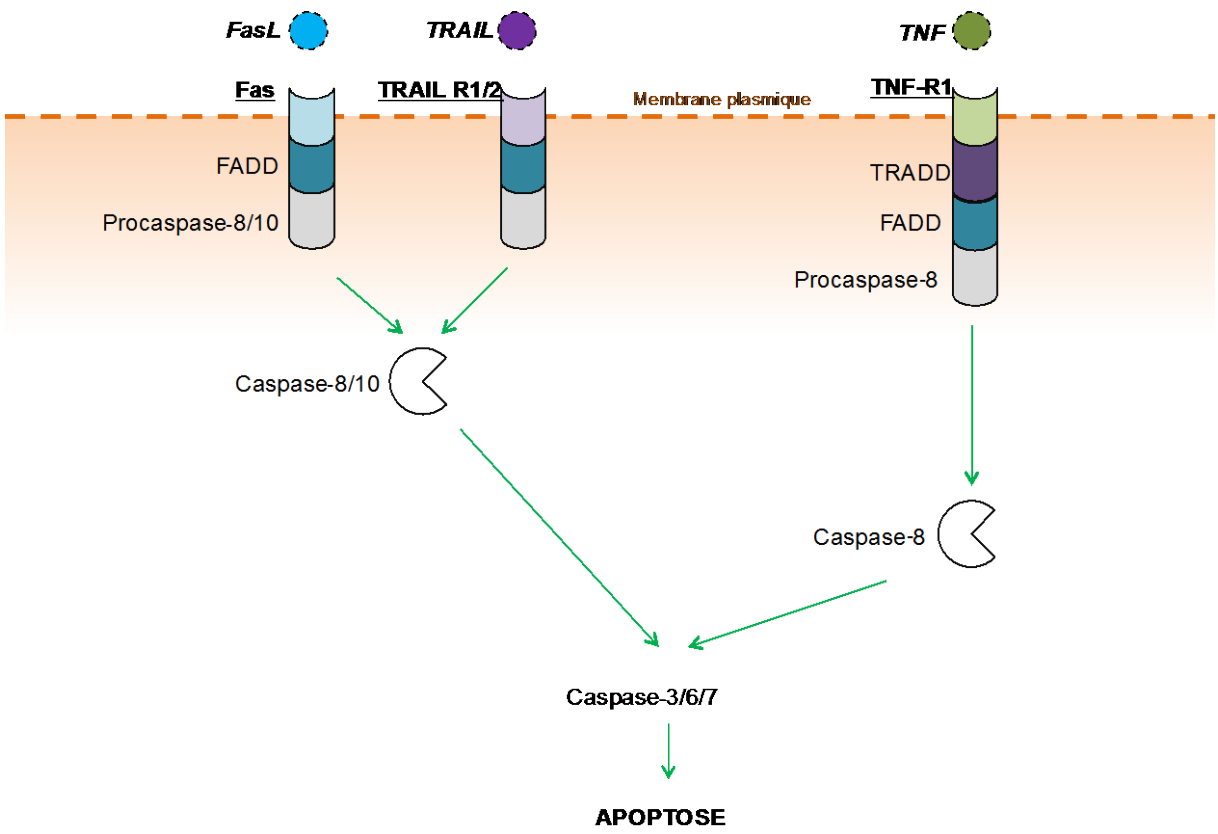
Il existe un lien avec la voie intrinsèque et extrinsèque qui permet de renforcer la réponse apoptotique. En effet la caspase-8 de la voie extrinsèque, peut activer la protéine Bid (*Bcl-2 Interacting Domain*) de la voie intrinsèque par protéolyse. Cette dernière active alors la protéine Bax qui active ainsi la voie apoptotique mitochondriale. La caspase-3 une des

dernières caspases effectrices de l'apoptose peut, quant à elle, activer la caspase-8, une des premières activées dans la voie extrinsèque.

3.2. L'autophagie

L'autophagie est avant tout décrite comme un mécanisme de survie, qui permet à la cellule de s'autodigérer en cas de stress. Si ce phénomène est prolongé, il peut conduire à une induction de la mort cellulaire par autophagie ou alors conduire à d'autres morts comme par exemple l'apoptose ou la nécrose. Cependant, les dernières découvertes tendent même à décrire l'autophagie comme un mécanisme de résistance aux traitements chimiothérapiques. Il existe différents types d'autophagie, telles que la microautophagie qui dégrade du matériel cytoplasmique directement par invagination du lysosome, et la macroautopaghie, la mieux décrite, qui forme une vésicule appelée autophagosome afin de dégrader massivement les composants cellulaires (36). L'autophagie met en jeu différentes protéines cellulaires de la famille Atg (*Autophagy-Related Genes*), Atg-1, -5, -7 et -13 qui sont inhibées par phosphorylation généralement consécutive à l'action de mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*). En cas de déphosphorylation, si les apports en acides aminés, glucose et/ou nutriments sont trop faibles, les protéines Atg-1, -7 et -13 forment un complexe qui stimule l'activité kinase d'Atg-1 et induit l'autophagie (Figure 4).

A



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

B

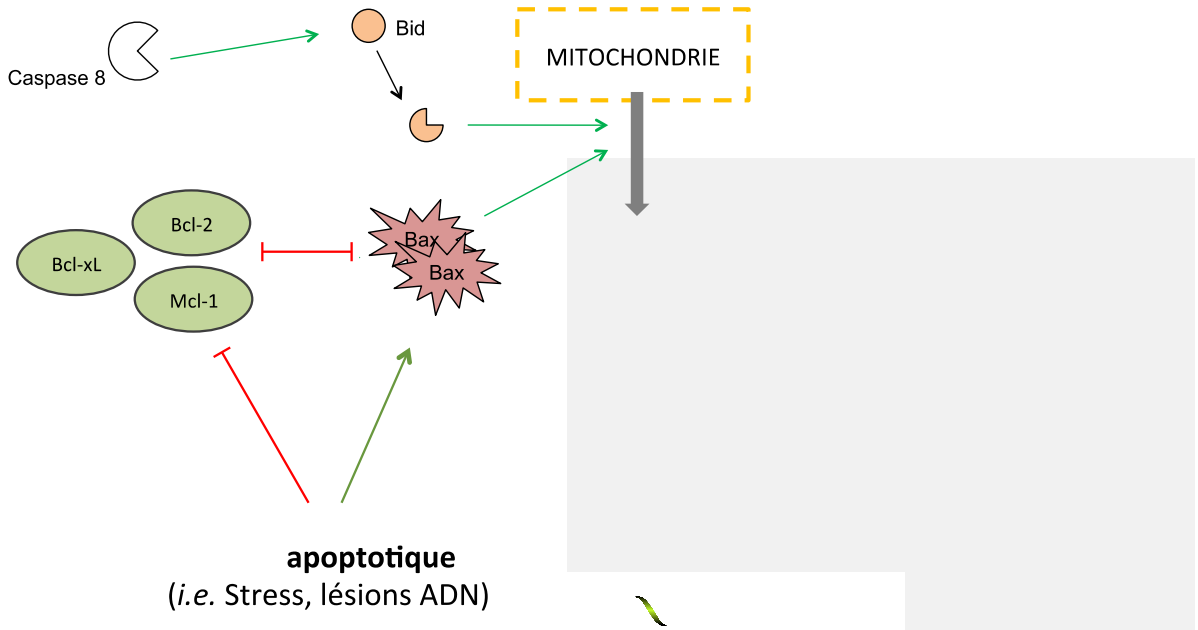


Figure 3 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose

L'apoptose peut s'effectuer selon deux voies : la voie intrinsèque indépendante de la caspase-8 (A) et la voie extrinsèque dépendante de la caspase-8 (B). Ces deux voies ne sont pas séparées de manière stricte, mais peuvent entrer en relation de manière à augmenter la réponse apoptotique via la protéine Bid par exemple. Cette protéine peut en effet être clivée par la caspase-8 de la voie extrinsèque et participer ainsi à l'activation de la voie intrinsèque. TNF : Tumor Necrosis Factor, FADD : Fas-Associated Death Domain, TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain, Bid : Bcl-2 Interacting-Domain death, Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-xL : B-Cell Lymphoma-eXtra Large, Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1, IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein.

3.3. Implication du calcium dans l'induction de l'apoptose

3.3.1. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite présent dans le cytoplasme, qui entoure le noyau en continuité de la membrane nucléaire. Le RE est séparé en deux zones distinctes, liées ou non, et pouvant se transformer l'un en l'autre en fonction des besoins de la cellule. La première zone, la plus proche du noyau, contient un grand nombre de ribosomes qui lui donnent un aspect granuleux (REG). Cette partie est majoritairement utilisée pour la synthèse protéique. La seconde partie contient très peu de ribosomes, elle a un aspect lisse (REL), et son rôle peut varier en fonction du type cellulaire. En effet, elle sert de site de stockage du calcium dans les muscles (sarcoplasme), fonctionne comme un outil de détoxification dans les cellules hépatiques, et peut également jouer un rôle dans la production des hormones et des phospholipides (38).

3.3.2. Mort cellulaire via le réticulum

Lorsque la cellule est soumise à certains stress comme une accumulation de calcium dans le cytoplasme, il y a un dysfonctionnement du RE et une accumulation de protéines inactives dans le RE. Les protéines mal pliées seront dégradées par le protéasome pour permettre à la cellule de survivre (39) ; mais si le stress est trop fort et persiste, le système sera saturé et la cellule entrera en apoptose (40). Le calcium n'est pas seulement néfaste pour la cellule mais il joue également un rôle physiologique important. Il a de nombreux effets sur la contraction musculaire, joue un rôle de second messager dans la cellule et dans la modulation du message nerveux.

L'activation de cette voie se fait surtout grâce à trois protéines membranaires inactives dans une situation « normale », qui sont IRE1 (*Inositol-Requiring Protein 1*), ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) et PERK (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*). La protéine BiP (*Binding Immunoglobulin Protein*) (GRP78 (*Glucose-Regulated Protein*)) inactive ces trois protéines membranaires par leur domaine N-terminal. Bip fait partie de la famille des GRP et interagit avec les parties hydrophobes de ces protéines lors de leur synthèse pour empêcher leur agrégation et assurer leur bon fonctionnement à la sortie du RE. En cas d'accumulation de protéines malformées, Bip fixera ces protéines et activera les trois protéines membranaires, IRE1, ATF6 et PERK, en se dissociant de leur partie N-terminale.

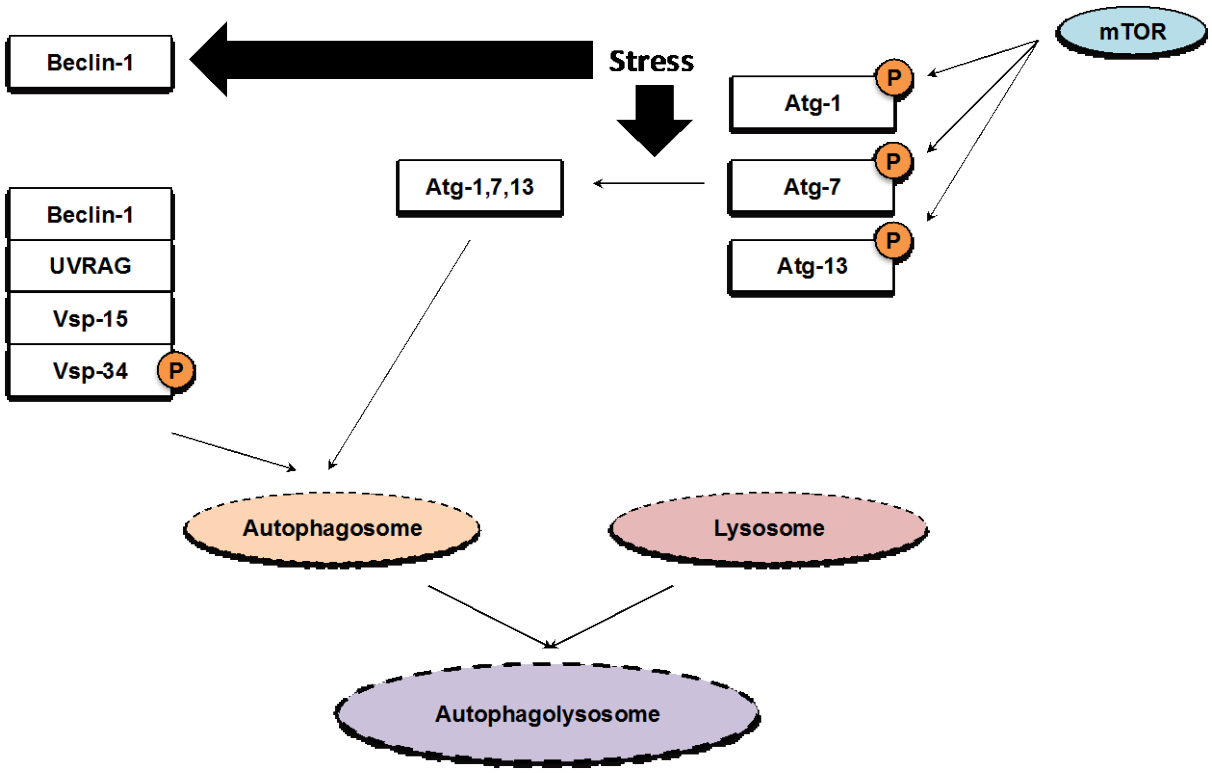


Figure 4 : Autophagie

En cas de stress prolongé la cellule induit l'autophagie, qui est avant tout un mécanisme de survie, ce mécanisme met en jeu différents facteurs tels que les protéines de la famille Atg, Vsp, UVRAG ou encore la Beclin-1. Il en résulte la création d'un autophagolysosome qui digère des parties de la cellule pour survivre. Si le stress est prolongé la cellule pourra induire la mort cellulaire. Atg : Autophagy Related Genes, UVRAG : Ultra-Violet Irradiation Resistance-Associated tumor suppressor Gene, Vsp : Vacuolar protein Sorting-associated Protein, mTOR : Mammalian Target of Rapamycin.

- IRE1 est la première protéine à être activée, elle s'associe à TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*). Cette première étape est dite « d'alarme » puisqu'elle activera ensuite p38MAPK, la voie de signalisation JNK (*Jun N-terminal Kinase*), ainsi que la voie NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*) (41) en aval de l'activation d'ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*).
- Si le message persiste, PERK et IRE1 formeront des homo-dimères et s'activeront par autophosphorylation. PERK conduit à une inhibition générale de la traduction des protéines, mais aussi à l'activation d'ATF4.
- ATF6 sera clivée dans l'appareil de Golgi par SP1 et SP2. Sa partie N-terminale activera en partie des gènes similaires à ceux induits par ATF4, comme XBP1 (X-box *Binding Protein 1*). ATF4 sera capable d'activer l'expression d'autres protéines telles que CHOP (*C/EBP Homologous Protein*), GRP78 (*Glucose-Regulated Protein, 78-KD*), GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage Protein 34*) (42).

IRE1 activée permet l'épissage de XBP1 induit par PERK et ATF6, mais aussi la phosphorylation de JNK (JNK peut induire l'apoptose en inactivant par phosphorylation les protéines anti-apoptotiques), avec une possible activation d'ERK (*Extracellular Receptor Kinase*) et des MAPK (42). L'activation de cette voie conduit à une diminution de la synthèse des protéines, une activation des protéines chaperonnes, et à l'induction des protéines impliquées dans la voie de mort cellulaire initiée au niveau du RE (43). Le stress induit par le réticulum est en effet connu pour induire l'expression de protéines BH-3 comme par exemple NOXA, une protéine ciblant Mcl-1 et aboutissant à l'apoptose (voir le paragraphe 4.1 « **La famille Bcl-2** » pour plus de détails) (Figure 5).

3.3.3. Lien entre les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le calcium

De récentes études dans les levures ont montré que la mitochondrie était étroitement liée au réticulum (Figure 5) non seulement par le biais de messagers protéiques, mais également de façon physique par des protéines telles que les mitofusines, ou par le complexe ERMES (*ER-Mitochondria Encounter Structure*) comprenant Mmm1 (*Maintenance of Mitochondrial Morphology Protein 1*) au niveau du RE, Mdm12 (*Mitochondrial distribution and morphology protein 12*) dans le cytosol, et Mdm10 et 34 au niveau de la mitochondrie (44).

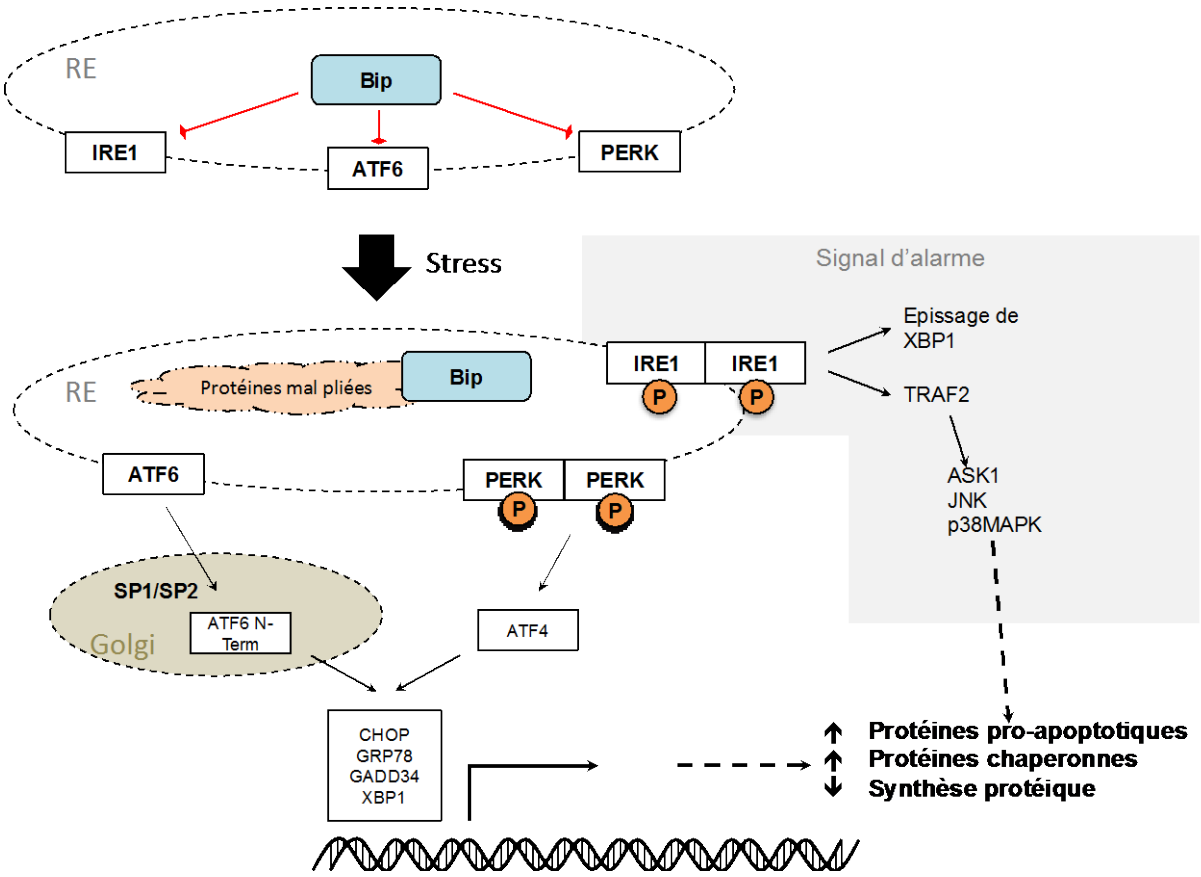


Figure 5 : Apoptose induite par le stress au niveau du réticulum endoplasmique

Lorsque des protéines sont malformées à cause d'un stress et qu'elles s'accumulent dans le réticulum endoplasmique, la protéine Bip les fixe, libérant ainsi IRE1, PERK et ATF6, qui seront activées. Cette fixation engendre un signal d'alarme, et si ce signal persiste, il induit l'expression des protéines CHOP, GRP78, GADD34 ou XBP1. Cette voie conduira à une induction des protéines pro-apoptotiques, une augmentation des protéines chaperonnes, et à une baisse généralisée de la synthèse protéique. Bip : Binding Immunoglobulin Protein, IRE1 : Inositol-REquiring protein1, PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase, ATF : Activating Transcription Factor, CHOP C/EBP HOmologous Protein, GRP78 : Glucose-Regulated Protein, GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-inductible protein, XBP1 : X-Box binding Protein 1, TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2, ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1, JNK : c-Jun N-terminal Kinase.

Dans les cellules humaines d'autres protéines sont impliquées dans cette liaison. Il s'agit des mitofusines localisées sur la membrane externe de la mitochondrie. Ces protéines ont tout d'abord été décrites comme étant essentielles pour les échanges entre les mitochondries. Plus tard, il a été démontré que ces protéines associent également RE et mitochondries de façon physique afin de favoriser les échanges ioniques (45). Le messager le plus connu entre la mitochondrie et le réticulum est le calcium. Ce dernier peut-être un messager de mort cellulaire quand la concentration de calcium augmente dans la mitochondrie et dans le cytoplasme (46). Lors d'un stress, le réticulum relargue du calcium dans le cytoplasme *via* ses canaux IP3R (*Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor*). Ce calcium est alors absorbé par les mitochondries *via* leurs canaux VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) (membrane externe) qui sont associés aux protéines ANT (*Adenosine Nucleotide Translocase*) (membrane interne).

Ces canaux VDAC peuvent être directement reliés aux canaux IP3R par GRP75. Le calcium entre ainsi dans la matrice mitochondriale et s'y accumule. Lorsque la concentration en calcium intra-mitochondriale dépasse un seuil, ce dernier induit la formation d'un complexe protéique PT (*Permeabilisation Transition*) formé de VDAC, ANT, des récepteurs benzodiazépine périphériques, des créatines kinases, des hexokinases et de la Cyclophiline D. Lorsque le stress est généralisé, ce complexe PT permet le relargage dans le cytoplasme de protéines inductrices de l'apoptose telles que le cytochrome c, SMAC/Diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*), ARTS ou AIF (Apoptosis Inducing Factor), qui conduit à la mort des cellules par apoptose. La formation des PT est également connue pour jouer un rôle physiologique dans la régulation du ratio ATP/ADP entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale. Ainsi lorsque cet équilibre électrochimique est défectueux, la mitochondrie subit une dépolarisation complète et irréversible qui conduit à la séquestration de la mitochondrie dans un autophagosome, qui éliminera les mitochondries défectueuses et conduira à la mort des cellules (46) (Figure 6).

En parallèle des canaux IP3R impliqués dans le relargage du calcium du RE vers le cytoplasme, le RE possède des pompes SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+}-*ATPase*) au niveau de sa membrane qui dirigent le calcium du cytoplasme vers la RE (47). Ces dernières peuvent être inhibées par la thapsigargine, une lactone sesquiterpénique extraite de la plante *Thapsia garganica*. La thapsigargine peut en effet induire une augmentation du calcium cytoplasmique qui conduit à l'activation de diverses kinases telles p38, JNK et ERK, ainsi que des pro-caspases-3 et -12 en parallèle à l'expression de CHOP.

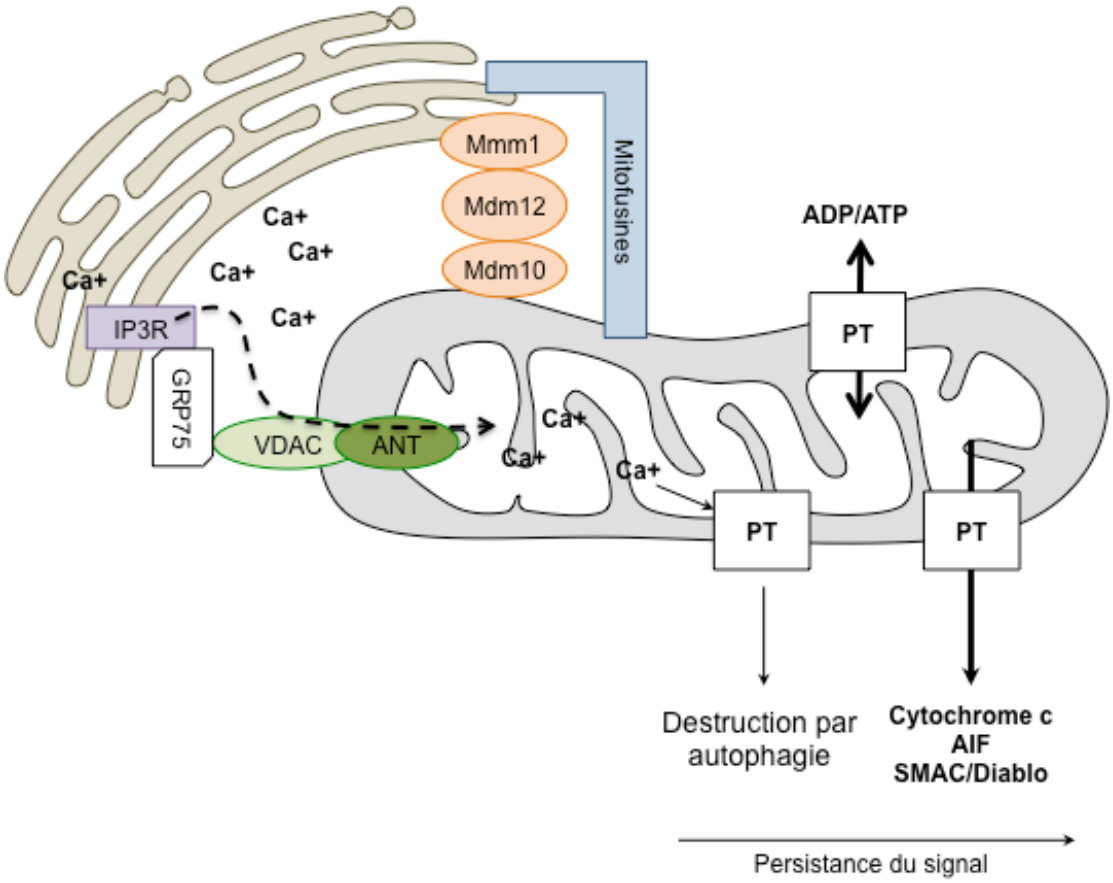


Figure 6 : Lien entre mitochondrie, réticulum endoplasmique et calcium

Ces deux organites sont étroitement liés par différentes protéines, comme les mitofusines (dans les cellules humaines) ou Mmm1, Mdm12, Mdm10 (dans la levure) ou encore GRP75. C'est cette proximité qui permet au calcium de servir de messager entre le RE et la mitochondrie. Le calcium peut pénétrer dans la mitochondrie soit lorsque celle-ci est défaillante, soit lorsque le RE relargue le calcium en excès via IP3R (i.e. suite à un stress). Ce calcium sera alors capté par VDAC, passera la membrane externe pour être capté par ANT et être finalement dirigé vers la matrice mitochondriale (49). *L'augmentation du calcium intra-mitochondrial induira la formation de PT qui, en fonction de la force et la persistance du signal induiront la mort cellulaire. (En gras sont représentées les voies majoritaires). Mmm1 : Maintenance of Mitochondrial Morphology Protein 1, Mdm10/12 : Mitochondrial Distribution and Morphology protein, IP3R : Inositol1,4,5,-trisPhosphate Receptor, GRP75 : Glucose Regulated Protein, VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel, ANT : Adenine Nucleotide Translocator.*

Par ailleurs, l'induction de l'apoptose par le calcium peut être modulée par l'utilisation de chélateurs de calcium tels BAPTA-AM (*1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid-AcetoxyMethyl ester*) et EDTA (*EthyleneDiamineTetraacetic Acid*) (48).

3.4. Implication des radeaux lipidiques dans l'apoptose

3.4.1. Radeaux lipidiques et cavéoles

Les radeaux lipidiques (*lipid rafts*) découverts dans les années 1950, sont des domaines membranaires invaginés composés de cholestérol et de sphingolipides de taille variable comprise entre 10 et 200 nM. Ces radeaux sont formés dans l'appareil de Golgi avant d'être intégrés dans la membrane plasmique ou du réticulum. Ils constituent des zones privilégiées pour l'interaction et l'activation des protéines membranaires qui y sont intégrées. Par ailleurs ces radeaux lipidiques peuvent fusionner entre eux et ainsi permettre le rapprochement de certains récepteurs membranaires, ainsi que d'enzymes telles que certaines kinases (50) .

Les cavéoles, sont des invaginations de la membrane plasmique constituées d'un radeau lipidique et d'une protéine transmembranaire, appelée cavéoline-1, qui constituent des microdomaines dynamiques. Les cavéolines se lient au cholestérol, présent en grande quantité dans les radeaux lipidiques. Ces protéines jouent un rôle dans l'inflammation, la régulation du cholestérol et de certaines kinases telles que ERK ou Akt. Les Cavéolines sont connectées au cytosquelette par les protéines de la famille des cavines, ces dernières stabilisent également les cavéoles (51). Elles jouent un rôle dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'endocytose et l'activation de récepteurs (52, 53).

3.4.2. Rôle dans l'apoptose

Selon le contexte et le type cellulaire, les radeaux lipidiques peuvent, soit induire, soit inhiber l'apoptose. A ce jour, leur rôle direct dans ces processus est encore peu détaillé. Il a cependant été démontré que ces radeaux sont capables d'augmenter localement la fluidité membranaire par leur composition en céramides et en cholestérol et de permettre ainsi la complexation des récepteurs membranaires. Ainsi, une désorganisation de ces radeaux lipidiques module la complexation des récepteurs membranaires qui activent ou désactivent simultanément de nombreuses kinases (*i.e. :* JNK, Akt, Src (*Sarcome de Roux*), ERK)

conduisant ainsi à l'induction de l'apoptose ou à des mécanismes de résistance (54). Pour exemple, une diminution du taux de cholestérol membranaire par l'utilisation de la Méthyl-β-Cyclodextrine (MBC), un dépléteur de cholestérol, augmente la fluidité membranaire et détruit les radeaux lipidiques et empêche ainsi la trimérisation du récepteur Fas (présent dans ces radeaux). Ainsi Fas ne sera plus activée et ne permettra pas le recrutement du complexe DISC et l'autoclivage de la pro-caspase-8. Par conséquent, l'apoptose ne sera pas induite (55).

En plus de leur effet sur les récepteurs membranaires, ces radeaux lipidiques sont capables de séquestrer des protéines intracellulaires telles que Bad (*Bcl-2-Associated Death promoter*) de manière à inhiber leur rôle dans l'induction de l'apoptose.

4. Les protéines de la famille Bcl-2

4.1. La famille Bcl-2

4.1.1. Généralités

Le nom de cette famille provient de la première protéine anti-apoptotique Bcl-2 découverte lors d'une étude menée en 1984 sur les lymphomes folliculaires, plus particulièrement suite à une translocation impliquant les chromosomes 14:18 (56). Des études ultérieures ont permis de découvrir, par co-immunoprécipitation, une liaison entre Bcl-2 et la protéine pro-apoptotique Bax (56). Ensuite une famille entière de protéines régulant l'apoptose et plus généralement la mort cellulaire a été découverte. A l'heure actuelle cette famille compte plus de vingt membres, séparés en trois groupes : les protéines anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques et les BH3 protéines. Ces protéines présentent des domaines BH1 et BH2, mais ils ne sont pas partagés par l'ensemble des protéines de la famille Bcl-2. Par contre, ces trois groupes possèdent un point commun propre à toutes les protéines de la famille Bcl-2, à savoir qu'elles comportent toutes une séquence BH3 dans leur séquence spécifique ainsi qu'une hélice α. Cette séquence BH3 commune va permettre la complexation théorique de toutes les protéines du groupe, mais leur degré d'affinité est variable, comme dans le cas de Mcl-1 et A1 qui présentent une plus grande affinité pour NOXA que les autres membres de la famille Bcl-2 (57). De plus, il est intéressant de noter que les protéines de la famille Bcl-2, et notamment Bcl-xL, ont une analogie de structure avec

des toxines bactériennes (*i.e.* Diphterie), connues pour leur effet sur l'activité mitochondriale (58) (Figure 7).

Dans des conditions physiologiques normales, la cellule entrerait spontanément en apoptose, mais cette dernière est constamment inhibée par des protéines anti-apoptotiques par le biais des domaines BH qui jouent un rôle important dans l'induction de la mort cellulaire (59). Ainsi, l'ajout du domaine BH4 aux protéines pro-apoptotiques telle que Bax est suffisant pour transformer cette protéine en inhibiteur de l'apoptose, tout comme le retrait de cette séquence à Bcl-2 permet de donner à cette protéine un pouvoir inducteur de l'apoptose. Cependant ce domaine ne détermine, pas à lui seul, le potentiel anti- ou pro-apoptotique d'une protéine car Mcl-1 et A1 ne présentent pas ce domaine (59).

Dans la cellule, les protéines anti-apoptotiques bloquent les protéines pro-apoptotiques en interagissant au niveau de leur domaine BH3 grâce à des liaisons hydrophobes et électrostatiques. Ces interactions sont complexes puisqu'elles sont soit directement liées à la conformation et à la localisation de la protéine pro-apoptotique (en fonction de la conformation le domaine BH3 sera ou ne sera pas exposé aux protéines anti-apoptotiques), soit liées au taux d'expression des protéines dans la cellule. Par ailleurs, s'il n'y a pas assez de protéines anti-apoptotiques pour inhiber les isoformes pro-apoptotiques, un effet pro-apoptotique en résultera. Ces deux sous-familles ne sont pas les seules à jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose. En effet, il existe des protéines BH3 inductibles en fonction du signal apoptotique, qui ciblent directement les protéines anti-apoptotiques en bloquant leur domaine BH3 et en les empêchant ainsi d'inhiber les protéines pro-apoptotiques.

4.1.2. Séquence protéique et conformation

Les protéines de la famille Bcl-2 ont des conformations directement liées à leur effet anti-apoptotique notamment grâce à la présence de nombreuses hélices α (1 à 9) présentes dans toutes les protéines de la famille Bcl-2. En effet, ce sont ces changements de conformation entre les domaines BH et les hélices qui permettent d'une part leur ancrage dans les membranes des mitochondries, du réticulum ou du noyau et d'autre part leur interaction avec les protéines pro-apoptotiques et protéines BH3. Bcl-2 est exclusivement membranaire, contrairement à Mcl-1 et Bcl-xL qui se localisent partiellement dans le cytosol, notamment à cause de leur conformation : la partie C-terminale (C-term) hydrophobe est repliée à

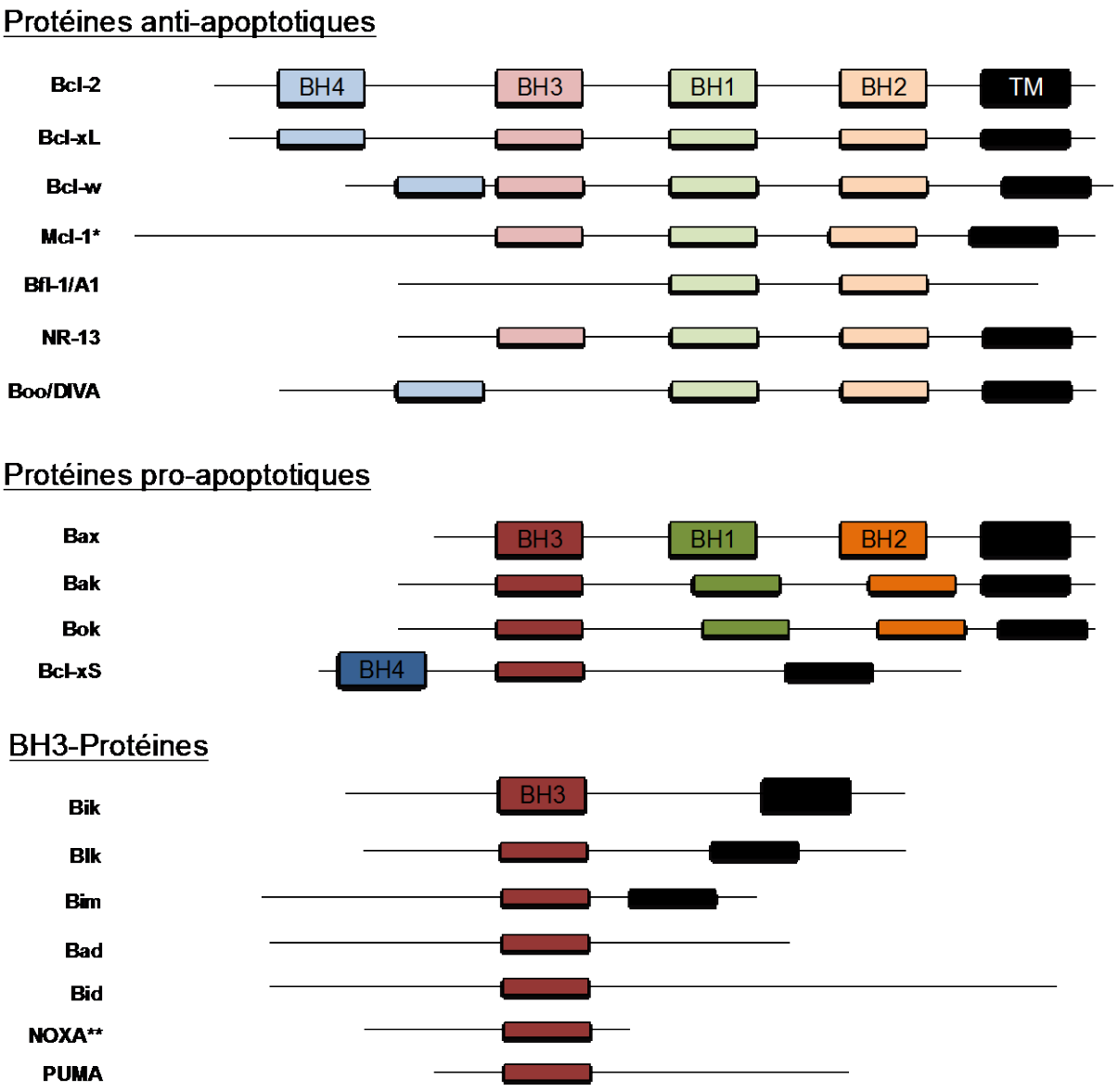


Figure 7 : Protéines de la famille Bcl-2 (adapté de (60))

*Figure présentant une liste des principales protéines de la famille Bcl-2, en fonction de la présence ou non des domaines BH et du domaine transmembranaire (TM). * : Mcl-1 est la plus longue des protéines de la famille Bcl-2, en opposition à Noxa (**) qui est la plus courte.*

l'intérieur d'une poche hydrophobe créée par les domaines BH et les hélices α. Ainsi, lors de l'ancrage dans une membrane, ce sont les domaines C-term et transmembranaire qui servent à la fixation. Leur présence dans la membrane mitochondriale permet l'inhibition des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak ou Bok (*Bcl-2-related Ovarian Killer*) en bloquant leur site BH3 et en empêchant un ancrage « profond » dans la membrane mitochondriale ainsi que leur dimérisation.

Lors d'un stimuli apoptotique, les protéines anti-apoptotiques vont soit changer leur conformation, soit être phosphorylées. Elles libèrent ensuite les protéines pro-apoptotiques telles Bax, Bak ou Bok déjà fixées. Cependant l'expression des protéines anti-apoptotiques peut diminuer à cause de l'inhibition de leur transcription ou de leur traduction, par exemple, ou encore il peut y avoir expression de protéines BH3 qui vont interagir avec les protéines anti-apoptotiques et les empêcher de séquestrer des protéines pro-apoptotiques. Ainsi libérées, les protéines pro-apoptotiques vont pouvoir s'ancrer profondément dans la membrane mitochondriale notamment grâce à leurs hélices α 5 et 6, ce qui aura pour conséquence l'exposition du domaine BH3, qui ne sera plus caché par les protéines anti-apoptotiques. Ce domaine pourra fixer d'autres protéines pro-apoptotiques et formera des complexes membranaires avec les canaux VDAC qui induiront la formation des pores mitochondriaux. Induisant un relargage de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c ou encore de SMAC/DIABLO (57, 61, 62).

4.2. Les protéines anti-apoptotiques

La vie et la mort des cellules sont finement régulées. Cette régulation est dépendante d'un équilibre entre les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) et protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bcl-Xs) de la famille Bcl-2. Dans des conditions physiologiques, les facteurs anti-apoptotiques se lient, grâce à leurs domaines BH aux protéines pro-apoptotiques pour les inhiber. En cas d'induction de l'apoptose, les protéines pro-apoptotiques sont surexprimées et se complexent entre elles, ou les protéines anti-apoptotiques sont dégradées rapidement laissant ainsi l'avantage aux protéines pro-apoptotiques. Ce processus favorise la mort cellulaire en déplaçant l'équilibre en faveur de l'apoptose. Dans les cellules cancéreuses, la surexpression des facteurs anti-apoptotiques désorganise cet équilibre en faveur de la survie et immortalise ces cellules.

4.2.1. Bcl-2

4.2.1.1. Expression et fonctionnement

Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 composée de 239 acides aminés, possédant quatre domaines BH et un domaine transmembranaire lui permettant de se localiser dans la membrane mitochondriale ou du réticulum endoplasmique. Bcl-2 possède aussi une boucle (FLD, *Flexible Loop Domain*) qui interagit avec de nombreuses kinases et caspases (63). Son gène se localise sur le chromosome 18q21.3, ce qui crée une protéine chimérique Bcl-2/IgH. Bcl-2 fût la première protéine anti-apoptotique découverte (64). Elle est très souvent surexprimée dans les cancers, notamment à cause d'une translocation entre le chromosome 18 et 14. Il existe deux isoformes de Bcl-2 qui assurent toutes deux le même rôle, mais présentent une légère différence d'affinité envers Bad et Bax. En effet, l'isoforme 1 présente une constante de dissociation plus élevée que l'isoforme 2 pour ces deux protéines pro-apoptotiques (64).

Son expression est constitutive dans de nombreuses cellules. Bcl-2 est soumise à un turnover afin d'éviter le développement de cancers. Son rôle est important notamment dans le renouvellement des cellules progénitrices peu différenciées (i.e : les cryptes des intestins ou les proches des lames basales). Son expression disparaît ensuite dans les cellules différenciées. Son rôle est aussi important dans l'élimination de cellules surnuméraires par l'apoptose physiologique (65).

L'ARNm (Acide ribonucléique messager) de Bcl-2 comme celui de Bcl-xL possède une coiffe IRE qui permet directement l'initiation de la traduction et permet la poursuite de la traduction de l'ARNm. Cette coiffe IRE est régulée différemment par des facteurs ITAFs (*IRES Trans-Activating Factors*), qui malgré l'apoptose, permet à Bcl-2 d'être exprimée, car son ARNm est toujours présent. Une autre protection de l'ARNm contre les ribonucléases est liée à la présence de régions d'instabilité ARE (*AU-Rich Element*) sur le partie 3' non traduite (NT) de son ARNm. Ces séquences ARE sont présentes sur la plupart des ARNm de protéines régulant le cycle cellulaire ou la mort cellulaire (66).

4.2.1.2. Régulation de Bcl-2 dans la mort cellulaire

Bcl-2 joue un rôle important dans le renouvellement des cellules progénitrices et son expression est placée sous le contrôle d'hormones de croissance tels les récepteurs aux estrogènes ou sous le contrôle d'IL3 (67), ou de c-jun qui peut se fixer sur son promoteur. En résumé, l'expression de Bcl-2 est régulée par des facteurs de croissance ou protéines jouant un rôle dans le renouvellement des cellules souches (i.e. c-Myc) (68). Récemment, il a été démontré que la protéine RRM2 (*Ribonucléotide Reductase M2*), impliquée dans la phase G1/S et co-localisée avec Bcl-2, régule l'expression du gène et de la protéine Bcl-2 de façon indépendante de p53 ou de Akt (69).

L'expression du gène *bcl-2* peut aussi être inhibée par l'expression de miRs (*MicroRNA*), notamment les miR15 et 16. La délétion de ces derniers a été démontrée dans plus de 70% des leucémies lymphoïdes chroniques pouvant être liée ou non à une hypométhylation des gènes (70).

La protéine Bcl-2 est majoritairement régulée par phosphorylation ou déphosphorylation, mais elle peut être clivée par des caspases. En effet, il a été démontré qu'une suractivation de Akt, provoque une diminution de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), corrélée à une surexpression de Bcl-2 chez des patients développant un cancer, notamment des carcinomes (71). Par ailleurs, un blocage du cycle cellulaire en G2/M et une altération de la tubuline, induisent une phosphorylation de Bcl-2 sur la Ser70 ainsi que sur deux autres résidus Tyr69 et Ser87 et conduisent à sa protéolyse et à l'induction de l'apoptose (72). *A contrario* une simple phosphorylation sur le résidu Ser70 renforce la liaison avec Bax et protège de l'apoptose. Cependant il n'est pas encore bien défini comment ces balances de phosphorylation organisent l'apoptose. Ainsi une phosphorylation prolongée de Bcl-2 pourrait constituer une première étape de l'apoptose qui sera induite ensuite après déphosphorylation de Bcl-2 par la phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2*) (66). Le devenir de Bcl-2 et son rôle dans l'apoptose sont étroitement liés à ses nombreuses phosphorylations.

Bcl-2 est connue pour être une protéine-clé de la surveillance du stress oxydant subi par les cellules, notamment grâce à ses résidus cystéines (Cys). Sous l'effet d'un tel stress, les résidus cystéines forment des résidus Cys-SOH qui modifient la conformation de Bcl-2 et induisent une séparation de Bcl-2 et ERK qui forment normalement un complexe. Cette séparation permet l'activation de ERK et l'induction de l'apoptose par une dégradation de Bcl-2 par le protéasome (73).

Bcl-2 n'est pas seulement liée à l'apoptose mais elle joue aussi un rôle dans l'autophagie en se couplant à la protéine Beclin-1 par interaction de leurs domaines BH3. Cette liaison induit l'inhibition de Beclin-1, impliquée dans le mécanisme d'autophagie (70). Une fois phosphorylée, Bcl-2 change de conformation et se détache de Beclin-1. Il en résulte une induction de l'autophagie qui ne conduit pas à la mort puisque Bcl-2 phosphorylée est libre mais non dégradée et maintient ainsi son rôle anti-apoptotique (74). Par ailleurs, p62 est exprimée lors du processus d'autophagie, interagit soit directement avec Bcl-2 pour activer la séparation du complexe Bcl-2/Beclin-1, soit indirectement en induisant l'activité de kinases telles ERK ou PKC (*Protein Kinase C*). Ces kinases vont permettre un changement de conformation de Bcl-2 et une libération de Beclin-1 conduisant à l'autophagie et à la survie cellulaire (75).

4.2.1.3. Cible anti-cancéreuse

Bcl-2 a été découverte dans un lymphome non hodgkinien. Sa surexpression a ensuite été mise en évidence dans de nombreuses leucémies et dans des cancers peu différenciés. Sa présence est un marqueur de mauvais pronostic (70). De nombreuses études ont été réalisées afin de développer des inhibiteurs de cette protéine. Il en résulte la découverte de composés inhibant l'expression de la protéine en amont de sa traduction tels le butyrate de sodium ou le flavopiridole ainsi que des ARN antisens ciblant Bcl-2 (*i.e.* oblimersen sodium). Plus récemment, de nombreux inhibiteurs de Bcl-2, qui sont en réalité des « mimétiques des domaines BH3 », ont vu le jour et sont testés en clinique. Ces inhibiteurs tels AT-101, ABT-263 ou encore ABT-737 ont la particularité de ne pas affecter Mcl-1 ou A1 (76). Ces composés ont été conçus dans le but de cibler le domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques de manière à inhiber la séquestration des protéines pro-apoptotiques et de permettre l'induction de l'apoptose (Tableau 1)**.**

Tableau 1 : Inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2

Tableau regroupant des exemples de « mimétiques des domaines BH3 *» ciblant des protéines de la famille Bcl-2. (U : Université) Extrait de* (77)

Composés	Cibles	Fabricant	Etape
Apogossypol	Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1	Burnham (NCI)	Préclinique
HA-14	Bcl-2	Maybridge Chem	Préclinique
Antimycin A	Bcl-2, Bcl-X_L	U de Washington	Préclinique
BH3Is	Bcl-X_L	Harvard U	Préclinique
Oblimersen sodium	Bcl-2	Genta	Phase III
Gossypol (AT-101)	Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1	Ascenta (NCI)	Phase I/II
ABT-737 (ABT-263)	Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w	Abbott	Phase I
GX15-070	Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1	Gemin X	Phase I

Le gossypol fût le premier « mimétique des domaines BH3 » utilisé, mais il induit de lourds effets secondaires au niveau gastrointestinal, l'apogossypol est un analogue plus efficace. Le composé ABT-737 et son analogue oral ABT-263 ont montré un effet positif sur des xénogreffes et en traitement ou co-traitement de LLC, LAM, cancer du poumon, LAL, mais est limité dans le cas de cancers exprimant fortement la protéine Mcl-1 (78). L'intérêt serait de coupler un traitement ciblant Bcl-2 (*i.e.* ABT-737) avec un traitement ciblant Mcl-1 dans le cas de cancers qui expriment ces deux protéines.

4.2.2. Mcl-1

Mcl-1 est une protéine à courte durée de vie, de la famille Bcl-2, régulée par ubiquitination et majoritairement caractérisée par une activité anti-apoptotique (48) (Figure 8). Cependant, en fonction de sa régulation (épissage, clivage) ou de son expression, elle peut jouer un rôle pro-apoptotique. Certaines études suggèrent aussi un rôle de Mcl-1 dans la prolifération cellulaire, notamment par son interaction avec des CDKs, des cyclines et d'autres protéines intervenant en phase S et G2, mais ces phénomènes restent encore peu connus. Le rôle de Mcl-1 dans le développement de cancers est principalement associé à la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose au cours des traitements anti-cancéreux. La surexpression de Mcl-1 engendre des cellules cancéreuses plus résistantes à l'induction de

l'apoptose. Sa surexpression a été observée dans de nombreux cancers (poumon, sein, pancréas ou encore leucémies (79)). Sa surexpression et souvent la cause de la résistance au cancer lorsque ces derniers sont traités avec des composés ciblant Bcl-2 (16).

Mcl-1 est une protéine composée de trois domaines homologues Bcl-2, permettant de fixer les protéines pro-apoptotiques et de quatre domaines PEST (séquence riche en proline, acide glutamique, sérine, thréonine) qui témoignent de la courte durée de vie de cette protéine. Le gène *mcl-1* est localisé sur le chromosome 1q21. L'ARNm (acide ribonucléique messager) de Mcl-1 peut subir trois épissages alternatifs qui conduisent à la formation de trois variants différents, Mcl-1l (*long*, 37kDa), Mcl-1s (*short*, 28kDa) et Mcl-1es (*extra short*), régulés par de nombreux facteurs tels que CDK1/CDC2, Akt1, Wee1 ou encore Aurora kinase 1. Mcl-1s (*short*) est un variant d'épissage dépourvu des domaines BH1 et BH2 ainsi que du domaine transmembranaire de la protéine. La différence entre les variants courts et les variants longs se traduit par la présence ou l'absence de l'exon 2. Mcl-1es (*extra-short*) possède une délétion de 53 acides aminés dans l'une de ses régions PEST. Les protéines issues de cet épissage ne peuvent pas séquestrer les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, mais peuvent fixer Mcl-1. Cette altération conduit à un effet pro-apoptotique que l'on peut observer lors d'infections bactériennes car ces variants d'épissage sont surexprimés dans les macrophages, et permettent de faire basculer la cellule vers l'apoptose (80). Mcl-1 (ou Mcl-1l) comprend 350 acides aminés et possède trois domaines BH ainsi qu'un domaine transmembranaire qui permet de localiser la protéine dans la membrane mitochondriale (81).

Mcl-1 est principalement localisée dans la membrane mitochondriale où elle acquiert son activité anti-apoptotique. Elle est également présente plus faiblement dans la membrane nucléaire où son rôle reste encore mal défini (probablement pour interagir avec des protéines du cycle cellulaire comme les cyclines et les CDK), ou encore dans le cytoplasme où elle forme des hétérodimères (*i.e.* Bax/Mcl-1) (82).

Le rôle de cette protéine dans la mort ou la survie cellulaire dépend d'une régulation fine au sein de la cellule. En effet, le contrôle de l'expression de la protéine Mcl-1 intervient à différents niveaux. Son expression peut être régulée par des facteurs de transcription, son épissage par des phénomènes extrinsèques (*i.e.* infections), la traduction de son ARNm par des miRNA, sa stabilité par des séquences (PEST, Granzyme B, Mcl-1s ou Mcl-1es) et sa dégradation est induite par des protéines telles que NOXA (83). Tous ces événements participent à la régulation de Mcl-1. Mcl-1 se fixe aux protéines pro-apoptotiques (*i.e.* Bak,

Bax) pour inhiber l'apoptose. Il faut noter qu'une forme de Mcl-1 peut être présente dans la mitochondrie et pourrait jouer un rôle dans le métabolisme cellulaire (82).

4.2.2.1. Régulation de Mcl-1

4.2.2.1.1. Régulation transcriptionnelle

La protéine Mcl-1 est induite en présence de facteurs de croissance (EGF, *Epithelial Growth Factor*), de facteurs angiogéniques (VEGF) ou de certaines cytokines (IL-3 ou -5) (84). Ces ligands activent majoritairement les voies de signalisation STAT-3 et -5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), une voie importante pour l'initiation de la transcription de Mcl-1 (85). Mcl-1 peut-être également régulée par HIF1α (*Hypoxia Inducible Factor*), par les facteurs de transcription SP1, PU.1 et NF-κB ou par des facteurs pro-inflammatoires comme le TNFα (83). Au contraire, le facteur de transcription E2F-1 (facteur de transcription important dans le passage en phase S) régule négativement la transcription de Mcl-1.

Les dommages à l'ADN sont connus pour induire p53 et Mcl-1. Dans ce cas, Mcl-1 assure la survie cellulaire pour une durée limitée car Mcl-1 est rapidement phosphorylée et dégradée. La diminution de l'abondance de Mcl-1 intracellulaire réduit la survie des cellules qui entreront dans un processus de mort cellulaire par apoptose (84).

4.2.2.1.2. Régulation traductionnelle

La stabilité de l'ARNm de Mcl-1 peut-être inhibée par les protéines CUG-BP2 (*CUG triplet repeat-RNA Binding Protein 2*) qui interagissent avec l'ARNm en se fixant sur son extrémité 3' NT. Cette fixation, d'une part stabilise l'ARNm, mais d'autre part inhibe sa traduction (86). L'oncogène *c-Myc*, connu pour son rôle dans l'initiation du cycle cellulaire et la prolifération, semble également jouer un rôle régulateur dans l'expression de nombreux miRNA tels que le miR-29b, connu pour réguler la traduction de Mcl-1 (87).

4.2.2.1.3. Dégradation de la protéine

L'activité de Mcl-1 est régulée par phosphorylation. Cette protéine possède au moins cinq sites de phosphorylation, et en fonction de leur activation, Mcl-1 joue un rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique, en étant soit dégradée, soit conservée (Tableau 2).

Lorsque les phosphorylations induisent un signal de dégradation, Mcl-1 est ubiquitinée par des ubiquitinases spécifiques : Trim7 (*TRIpartite Motif containing 7*), SCFβ-TrCP (*Skp Cullin F-box containing β - Transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*), E3 SCF^{FBW7} (*F-box and WD repeat domain containing 7*) ou Mule (*Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3*), ou encore en cas de mitose prolongée par APC/C^{Cdc20} (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*) qui fixent les ubiquitines sur les résidus lysines 5, 40, 136, 194 et/ou 197 (25, 88). Mcl-1 est ensuite prise en charge par le protéasome et est dégradée. Inversement USP9X (*Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-Linked*) déubiquitine Mcl-1 et augmente sa stabilité (48).
Mcl-1 peut également être dégradée par les caspases et par le granzyme B (notamment en cas d'infection). Le granzyme B et les caspases partagent un site de clivage après les résidus aspartate. De plus, le granzyme B est capable d'induire un signal apoptotique en activant les caspases. Le clivage de la protéine Mcl-1 va générer des fragments pro-apoptotiques et sera responsable de la dissociation de Mcl-1 et des protéines pro-apoptotiques (89). Un autre mécanisme de clivage de Mcl-1 permet la formation de snMcl-1, un fragment protéique qui possède des propriétés anti-prolifératives. Ce fragment est transporté dans le noyau, mais ce mécanisme reste peu étudié à ce jour (83).

Mcl-1 peut-être séquestrée par de nombreuses protéines anti-apoptotiques telles que BIM (*Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death*) et PUMA, mais sans pour autant être dégradée (83). De récentes études démontrent que la dégradation de Mcl-1 peut être initiée par la protéine NOXA, une protéine pro-apoptotique qui possède une forte affinité pour Mcl-1. NOXA ou encore PMAIP1 (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*) est une protéine de 11kDa, isolée en 1990 par Hijikata (84), qui possède un domaine BH3 et un domaine de ciblage de la mitochondrie (domaine MTD, *Mitochondrial Targeting Domain*). NOXA se lie avec une forte affinité à Mcl-1 et conduit à sa dégradation par le protéasome. Cette protéine est une des seules responsables de la dégradation de la protéine Mcl-1 (84). Une autre protéine, p97, encore peu connue, semble jouer un rôle important dans l'ensemble des régulations des protéines de la famille Bcl-2 lors du stress du réticulum et notamment dans la dégradation de Mcl-1 par ubiquitination.

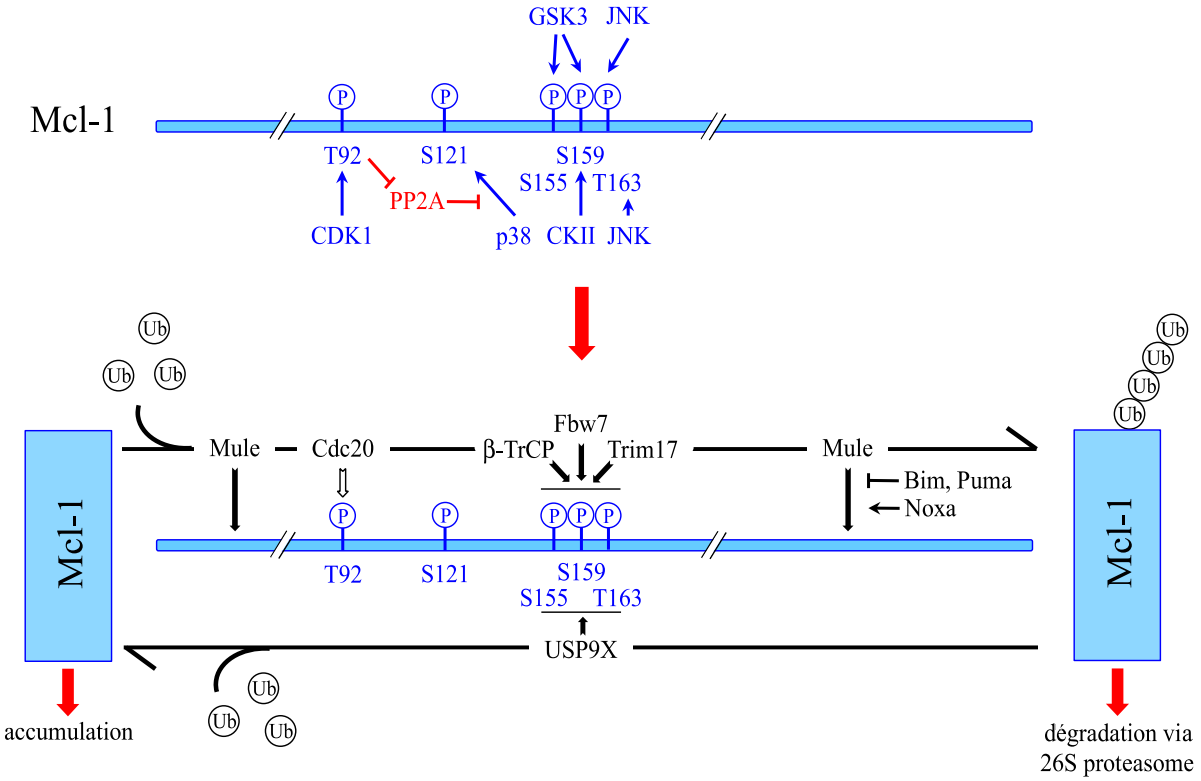


Figure 8 : Dégradation de Mcl-1

Schéma de la régulation de Mcl-1 par phosphorylation et ubiquitination. Trim7 : TRIpartite Motif containing 7, SCFβ-TrCP : Skp Cullin F-box containing β - Transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, E3 SCF^{FBW7} :F-box and WD repeat domain containing 7, Mule : Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3, ou encore en cas de mitose prolongée par APC/C^{Cdc20} : Anaphase-promoting complex/cyclosome, S : Sérine, T : Tyrosine, JNK : c-Jun N-terminal kinase, Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death, USP9X : *Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-Linked*, GSK3 : Glycogen synthase kinase 3. (à partir de (25, 88) avec modifications)

4.2.2.2. Rôle de Mcl-1 dans la mort cellulaire

4.2.2.2.1. Rôle de Mcl-1 dans l'apoptose

Contrairement à son rôle dans le cycle cellulaire, le rôle de Mcl-1 dans l'apoptose est mieux décrit. En effet, cette protéine anti-apoptotique joue un rôle majeur dans la suppression des messages apoptotiques. Mcl-1 est localisée dans la membrane externe mitochondriale grâce à un domaine transmembranaire mitochondrial. Cette position lui confère un rôle dans le maintien du potentiel mitochondrial par la régulation de Bak par exemple. Lors d'un stress, Mcl-1 va être fixée par les facteurs apoptotiques tels que tBid (*truncated BH3-Interacting Domain death agonist*) (lors d'un message extrinsèque), BIM (lors de dommages au niveau du cytosquelette), PUMA (lors de dommages à l'ADN) ou plus particulièrement NOXA qui est une petite protéine BH3 induite pendant un stress et spécifique de Mcl-1. La séquestration des protéines anti-apoptotiques laisseront à Bax et Bak la possibilité d'être activées et libres d'agir en se dimérisant ensemble et en créant des pores mitochondriaux ou en agissant sur VDAC. Ces interactions vont permettre la perte du potentiel membranaire mitochondrial mais également le relargage du cytochrome c et de Smac/DIABLO. Mcl-1 peut bloquer le signal apoptotique, la cellule n'entrera pas en apoptose. Par ailleurs Smac/DIABLO n'étant pas relargué dans le cytosol n'inhiberont pas les IAPs. Par conséquent les IAPs pourront bloquer l'action des caspases et inhiber l'apoptose (83).

4.2.2.2.2. Rôle de Mcl-1 dans l'autophagie

Un des facteurs régulateurs de l'autophagie est la protéine Beclin-1. Cette protéine est connue pour posséder un domaine BH3 et pouvoir ainsi fixer des protéines de la famille Bcl-2, telles que Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (90). Mcl-1 est, depuis récemment, considérée comme une protéine majeure impliquée dans la balance entre apoptose et autophagie au niveau des neurones (91). De plus, de récentes études ont démontré son importance dans l'autophagie induite par la surexpression d'oncogènes tels que Ras puisque Mcl-1 est capable de séquestrer la Beclin-1 et ainsi d'inhiber l'induction de l'autophagie (90). Mcl-1 est, par conséquent, une protéine à l'interface entre apoptose et autophagie qui joue un rôle dans ces deux types de mort cellulaire.

Tableau 2 : Signalisation de l'apoptose, exemple de phosphorylations de Mcl-1

La protéine Mcl-1 possède de nombreux sites de phosphorylation phosphorylés par différentes kinases. Leur association déterminera le rôle de la protéine au sein de la cellule. Certaines phosphorylations peuvent être induites par des molécules exogènes.

GSK3β :Glycogen synthase kinase 3 β. - : inhibition, + : induction, ? : dépend du contexte cellulaire.

Phosphorylation de :	**Par :**	**Spécificité**	**Protéasome**	**Apoptose**
Sérine 64	JNK, CDK1,2	*Faiblement phosphorylée en général, mais fortement phosphorylée pendant le blocage de la mitose*	**?**	**-**
Thréonine 92 et 163	ERK	*Fixation de Pin1 sur Mcl-1*	**-**	**-**
Sérine 155, 159 et Thréonine 163	JNK, GSK3β	*Inhibition de Bim, Activation de l'ubiquitinase*	**+**	**+**
Sérine 121 et Thréonine 163	P38 et JNK	*Induite par le TNF et le stress oxydant*	**-**	**?**
Thréonine 163	ERK	*Induit par TPA*	**-**	**-**
Thréonine 92	CDK1/cycline B1	*Induit l'apoptose si le blocage en G2 est prolongé*	**?**	**?**

4.2.2.2.3. Rôle de Mcl-1 dans le métabolisme cellulaire

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent jouer un rôle dans le métabolisme cellulaire puisqu'elles peuvent interagir avec les protéines localisées à la surface de la mitochondrie notamment celles impliquées dans la chaine respiratoire. Une diminution du niveau d'expression de la protéine Mcl-1 induit un dysfonctionnement de cette chaine. Par ailleurs, Mcl-1 peut également être liée au métabolisme du glucose (82). En effet, en cas de restriction calorique, le niveau d'expression de Mcl-1 est diminuée en même temps que la diminution générale de la synthèse protéique (car la demi-vie de la protéine est faible), ce qui rend la cellule plus susceptible à certains stimuli de la mort cellulaire, notamment grâce à l'activation de NOXA ou par la diminution de la traduction protéique par la voie mTOR/AMPK (*5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (92).

4.2.2.2.4. Traitements ciblant Mcl-1

Les traitements ciblant Mcl-1 pourront se faire par différentes approches, telles que l'inhibition de son expression, la modulation de sa régulation afin d'augmenter son effet pro-apoptotique ou encore l'induction de sa dégradation par l'intermédiaire de NOXA (en latin « dommages »), en utilisant par exemple le Bortezomid (Velcade®) (81). L'expression de Mcl-1 peut-être diminuée par l'utilisation d'inhibiteurs de cyclines tels les flavopiridoles, le composé SNS-032 ou le Sorafenid, mais également par l'inhibition de sa déubiquitination tout comme par l'utilisation de mimique de BH3 protéines comme l'obatoclax ou encore le gossypol (93). Le but n'est pas de tuer les cellules, car la diminution de Mcl-1 ne tue pas forcément les cellules, mais par contre sa diminution augmente fortement leur sensibilité aux autres traitements anti-cancéreux.

4.2.3. Bcl-xL

Bcl-xL est une protéine anti-apoptotique faisant partie de la famille Bcl-2. Bien que Bcl-xL soit surexprimée dans de nombreux cancers, elle est nécessaire au développement *in utero* de l'embryon.

4.2.3.1. Expression et fonctionnement

Bcl-xL est issue d'un épissage alternatif du gène *bcl-x* (chromosome 20q11). Bcl-xL est codé par un préARNm avec quatre exons, mais dans ce cas l'épissage concerne le retrait ou non d'une partie d'un exon et non de sa totalité comme pour Mcl-1. Lors de l'épissage il pourra y avoir formation soit de Bcl-xL, la version longue anti-apoptotique, ou Bcl-xS, la version courte pro-apoptotique. L'exon 2 possède deux parties, 2A et 2B. C'est la présence ou l'absence de la partie 2B qui déterminera la formation de Bcl-xL ou non. La présence de la séquence complémentaire de la zone d'épissage (*Splice Switching Oligonucleotides ou SSO*) de l'exon 2B, est primordiale pour le choix d'épissage. La formation de l'ARNm Bcl-Xs par le retrait de la partie 2B se fera car l'épissage se passera au niveau de la jonction 2A et 2B. Au contraire, si SSO n'est pas présent, l'épissage se fera entre l'exon 2B et l'intron, ce qui conduira à la formation de l'ARNm de Bcl-xL, plus long. La présence de SSO peut-être induite par un stress, comme par exemple H_2O_2, des dommages à l'ADN ou des effets cytotoxiques (94).

Bcl-xL possède une partie transmembranaire ainsi que quatre domaines BH, alors que sa version Bcl-xS n'en possède que deux. En plus de jouer un rôle dans l'apoptose, Bcl-xL intervient dans l'autophagie ainsi que dans la mort cellulaire en intervenant pendant le cycle cellulaire suite à un stress ou à des dommages à l'ADN.

4.2.3.2. Régulation de Bcl-xL

4.2.3.2.1. Régulation transcriptionnelle

Bcl-xL est régulée au niveau de sa transcription par la voie majeure de l'inflammation NF-κB et possède par conséquent les mêmes facteurs de régulation que ce dernier(stress par exemple). Les cytokines et plus précisément la voie JAK (*Janus Kinase*)/STAT, ainsi que Ets, ou encore les facteurs de croissance constituent une autre voie majeure de régulation (95). Contrairement à d'autres protéines anti-apoptotiques, le niveau d'expression de Bcl-xL peut fortement augmenter si un signal de survie est transmis à la cellule. Le Rituximab (anti-CD20 (*Cluster de différenciation*)) inhibe la traduction de la protéine Bcl-xL (96). De façon générale, Bcl-xL est inhibée lors de l'induction de l'apoptose soit par les protéines BH3, soit par la mitochondrie qui relargue la protéine ARTS et inhibe Bcl-xL. Cependant à l'heure

actuelle, il n'est pas connu si cette inhibition se produit au niveau de la transcription ou au niveau de la protéine (97).

4.2.3.2.2. Dégradation de la protéine

Bcl-xL est une protéine relativement stable dans la cellule, cependant son niveau d'expression peut être modulé, par ubiquitination par Cul3-Rbx1 (*Cullin-3 RingBoX protein 1*) et/ou Parkin, qui sont deux E3 ubiquitines ligases spécifiques de Bcl-xL, mais aussi de Bcl-2 (98). En effet, Cul3-RBx1 interagit avec ces deux protéines anti-apoptotiques grâce à Keap1. Le complexe Cul3-Rbx1-Keap1 (*Kelch-like Ech Associated Protein 1*) contient une fonction E2 ubiquitine ligase qui, dans des conditions physiologiques, ubiquitine Bcl-xL/Bcl-2 et conduit à leur dégradation. Lors d'un stress oxydant, l'interaction entre Keap-1 et Bcl-xL et Bcl-2 ne peut se faire. Il en résulte la survie de la cellule qui pourra protéger les mitochondries. (99)

Bcl-xL peut-être inactivée par de nombreuses kinases, telles p38, ASK1, JNK ou encore Ikkβ (*I-kappa-B kinase*) (100). En effet, un traitement avec des inhibiteurs de microtubules conduit à la phosphorylation de Bcl-xL sur trois sites, à savoir Ser-62 (implication de JNK), Thr-47 et Thr-115 ; la phosphorylation de Bcl-xL (et Bcl-2) pourrait de plus, être un prérequis pour l'apoptose puisque pendant l'apoptose ces protéines tendent à être déphosphorylées. Cependant aucun lien n'est établi entre sa phosphorylation et sa dégradation par le protéasome.

4.2.3.3. Rôle de Bcl-xL

4.2.3.3.1. Dans l'apoptose

Tout comme Mcl-1, Bcl-xL joue un rôle de maintien du potentiel mitochondrial, en régulant l'activité de VDAC sur la membrane externe de la mitochondrie et par conséquent celle d'ANT sur sa membrane interne (101). L'induction de l'apoptose par un stress conduit à l'expression des protéines BH3 qui iront séquestrer ou phosphoryler Bcl-xL. Dans les deux cas, Bcl-xL sera inactivée, induisant ainsi une diminution du potentiel mitochondrial et un relargage par les pores mitochondriaux ou par VDAC des inducteurs de l'apoptose et

notamment ARTS qui se fixera sur les IAPs. Cette fixation induira leur auto-ubiquitination et leur dégradation ainsi qu'une baisse de l'expression de Bcl-xL et Bcl-2 (102).

4.2.3.3.2. Dans l'autophagie

Bcl-xL peut fixer la protéine Beclin-1 au niveau de la mitochondrie et ainsi inhiber l'autophagie. Pour contrer cet effet, Bcl-xL devra être dissociée de Beclin-1, soit par phosphorylation, soit par dégradation, soit par séquestration par les protéines BH3 (103). Récemment il a été découvert que l'inhibition de Bcl-xL par fixation d'un inhibiteur sur l'un de ses domaines BH peut induire deux types d'autophagie : Beclin-1 dépendante ou indépendante en fonction du type d'inhibiteur utilisé (104). Le seul mode d'action bien décrit de Bcl-xL dans l'autophagie, à ce jour, concerne son effet sur la protéine Beclin-1 (104). Il a par ailleurs été démontré que la protéine Atg5 joue un rôle particulièrement important dans la balance entre autophagie et apoptose. En effet, Atg5 peut-être clivée par les calpaines, ce qui induira la formation d'une forme tronquée de Atg5 de 24kDa capable de se fixer sur Bcl-xL, d'inhiber son effet anti-apoptotique et d'induire l'apoptose. Inversement, la forme longue d'Atg5 favorisera l'induction de l'autophagie (105).

4.3. Les protéines BH3

Les protéines BH3 sont des protéines de petite taille pouvant séquestrer les protéines anti-apoptotiques et laisser libres les protéines pro-apoptotiques. Chacune sera activée en fonction du stress auquel la cellule sera soumise. Par exemple, en cas de dommage à l'ADN, NOXA sera exprimée et séquestrera Mcl-1 ou A1; Bim sera, quant à elle exprimée préférentiellement en cas de dommage des microtubules, alors que Bmf (*Bcl2 Modifying Factor*) sera exprimée en cas d'irradiation aux UV. Comme pour toutes les protéines anti- et pro-apoptotiques, l'action de séquestration des protéines BH3 se fera essentiellement grâce à leur domaine BH3 (106). Ces petites protéines inductibles séparent les protéines pro-apoptotiques des isoformes anti-apoptotiques de manière à induire l'apoptose. Leur mode d'action n'est pas encore parfaitement décrit, ce qui explique qu'il existe actuellement deux modèles possibles (77).

- Le premier modèle, dit d'interaction directe, sépare les protéines BH3 en deux groupes, le premier comprend les protéines « BID-like » (*i.e.* Bid, Bim) qui ont pour fonction d'activer Bax ou Bak et le second se compose des protéines « BAD-

like » (*i.e.* NOXA, Bad) qui devront occuper la poche hydrophobe BH3 des protéines anti-apoptotiques (107).

- Le second modèle d'interaction indirecte, à l'opposé du premier modèle, montre que Bax ou Bak ne se lient pas aux protéines BH3 mais que Bak et Bax sont activées car les protéines BH3 inhibent les protéines anti-apoptotiques (108).

4.4. Les protéines pro-apoptotiques et l'induction de l'apoptose

Le rôle des protéines pro-apoptotiques, comme Bax et Bak, consiste à déclencher directement l'apoptose. En effet, lorsque les cellules ne sont pas altérées par un stress, ces protéines sont séquestrées par les protéines anti-apoptotiques (*i.e.* Bcl-2, Mcl-1) grâce au domaine BH3 présent sur la plupart des protéines qui régulent l'apoptose. Lorsque la cellule est soumise à un stress, le niveau d'expression de ces protéines anti-apoptotiques est diminué soit par dégradation rapide soit par séquestration par des protéines BH3, laissant ainsi les protéines Bak et Bax libres, de pouvoir se fixer l'une à l'autre pour créer des complexes. Ces complexes présents à la surface de la mitochondrie vont permettre la création de pores mitochondriaux suite à la formation de complexes allant de dizaines à des centaines de protéines et permettant d'induire la libération du cytochrome c et de SMAC/Diablo qui induiront l'apoptose.

Contrairement à Bak, Bax est essentiellement cytosolique par la séquestration de l'hélice α 9 (C-term) dans le domaine hydrophobe BH3. Ainsi lors de l'induction de l'apoptose, ces deux protéines Bax et Bak vont exposer leur domaine BH3 (libéré par les protéines anti-apoptotiques). Par ailleurs le domaine N-terminal (hélice α 1) joue un rôle important dans l'action des protéines Bak et Bax pour leur dimérisation, car son clivage diminue fortement son activité (109).

5. La pompe à sodium Na^+/K^+-ATPase

5.1. Structure et fonctionnement

La pompe Na^+/K^+-ATPase (NKA) est une protéine transmembranaire, présentant à la fois une activité enzymatique et une activité de transport actif. Elle permet l'entrée de trois ions potassium (K^+) et la sortie de deux ions sodium (Na^+) en utilisant de l'énergie (ATP). Elle

permet le maintien du potentiel membranaire, de l'homéostasie et ainsi la viabilité cellulaire, d'où son activation constitutive dans la plupart des tissus du corps. La pompe NKA possède des domaines de liaison pour les cardénolides sur sa conformation E2 qui lui permettent selon leur concentration soit d'être inhibée, soit d'agir sur les voies cellulaires telles que celles de la prolifération et de la mort cellulaire.

La pompe NKA possède trois sous-unités (la troisième étant facultative). La sous-unité α possède dix domaines transmembranaires (M1 à M10) et trois domaines cytosoliques à savoir un domaine de fixation pour l'ATP, un domaine de phosphorylation et un domaine d'activation. La sous-unité β possède, quant à elle, une seule chaine transmembranaire avec un site N-terminal intracellulaire et C-terminal extracellulaire. Elle assure un rôle dans l'adressage, mais également dans son activité d'hydrolysation. La dernière sous-unité FXYD (phenylalaline, X (acide aminé divers), tyrosine, acide aspartique) permet l'association des sous-unités α et β et influence l'affinité des ions pour la pompe.

Son activité est décrite en deux états :

- Dans son état E1 cette pompe possède une forte affinité pour l'ATP et pour trois ions Na^+, la présence de ces quatre molécules induit la phosphorylation de la pompe, le relargage de l'ADP dans le cytosol et son ouverture vers le milieu extracellulaire.
- Dès lors, la pompe perd son affinité pour les ions Na^+ et passe dans l'état E2 durant lequel les ions Na^+ sont relargués dans le domaine extracellulaire alors que la pompe gagne de l'affinité pour deux ions K^+. L'entrée de ces derniers provoque la déphosphorylation de la pompe qui retrouve l'état E1 et s'ouvre du côté intracellulaire, pour faire entrer les ions K^+ dans la cellule et retrouver son affinité pour l'ATP et trois ions Na^+ (110).

5.1.1. La sous-unité α

Les sous-unités α de la pompe NKA sont au nombre de quatre. Leurs gènes sont localisés sur le chromosome 1 pour les sous unités 1, 2 et 4, alors que pour la sous unité 3, son gène se trouve sur le chromosome 19. Selon le type cellulaire ou la période de développement de l'individu (de l'embryon à l'âge adulte) les sous-unités seront exprimées de façon différente. En effet, la sous-unité α 1 est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus afin de réguler les gradients ioniques (111) et elle est capitale au bon développement de la blastula.

Les sous-unités 2 et 3 sont exprimées dans le cerveau très tôt au cours du développement cérébral, une fois le cerveau formé, seule la sous-unité 3 sera exprimée (112). La sous-unité 2 sera, quant à elle, exprimée dans les muscles y compris le cœur (113). La quatrième sous-unité est exprimée dans les spermatozoïdes et participe à leur mobilité avec la sous-unité 1 (112). Dans la plupart des cas, la diminution de l'expression d'une isoforme ne pourra être compensée par l'expression d'une autre (114).

La sous-unité α peut-être phosphorylée et régulée par l'activité de la pompe. En effet, une phosphorylation par la PKC sur le résidu Ser23 (N-term) diminue l'activité de la pompe (115) alors qu'une phosphorylation sur le résidu Tyr10, lors d'un traitement à l'insuline, induit son activité. PKA (protéine kinase A) peut aussi phosphoryler la sous-unité α au niveau de la Ser943 de la C-term (116).

C'est cette sous-unité qui sera ciblée par les glycosides cardiaques et régulera l'activité de la pompe par son activité ATPase.

5.1.2. La sous-unité β

La sous-unité β est composée de quatre isoformes, leurs gênes se localisent respectivement sur les chromosomes 1, 17, 3 et X. Cette sous-unité est requise pour l'assemblage de la pompe, sa stabilité et son positionnement dans la membrane plasmique (117). Son expression est, tout comme celle de la sous-unité α, liée au tissu ou au type cellulaire. En effet, la sous-unité 2 est exprimée dans le cerveau et le muscle alors que la sous-unité 3 est présente dans les muscles squelettiques, les testicules et les poumons. La sous-unité β1 est, quant à elle, exprimée dans le cœur où elle assure un rôle important dans l'adhésion des cellules. Il a été prouvé que les sous-unités β1 se lient préférentiellement avec α1, et de même pour les sous-unités 2 (118).

5.1.3. La sous-unité FXYD

La sous-unité FXYD possède sept isoformes et tire son nom d'une région conservée de FXYD ainsi que de la présence de deux glycines et d'une sérine. La sous-unité 1 (appelée phospholemmane) est un substrat de PKA et PKC, elle est présente dans le cœur, le foie et le

muscle squelettique. Cette sous-unité s'associe non seulement avec la pompe NKA, mais aussi avec l'échangeur de calcium (Ca^{2+}). Elle module l'activité de la pompe en diminuant l'affinité pour le Na^+. La sous-unité 2 (appelée gamma) possède deux formes, a et b, et diminue l'affinité de la pompe NKA pour le Na^+ et augmente l'affinité pour l'ATP ce qui permet paradoxalement la réabsorption du Na^+, malgré la présence d'une forte concentration intracellulaire de Na^+ au niveau de l'anse de Henle (dans le néphron). En parallèle, la sous-unité 4 (appelée aussi Chif) est exprimée dans la partie distale du néphron, cette dernière semble jouer un rôle dans la réabsorption du Na^+ résiduel en augmentant l'affinité de la pompe envers cet ion. La sous-unité 3 (appelée Mat-8) exprimée dans le colon, la peau, le rein et l'utérus, génère une diminution de l'affinité envers le Na^+ et le potassium de la pompe NKA, mais peut aussi se lier à la pompe H,K-ATPase (Hydrogène, Potassium ATPase). Cette isoforme peut jouer un rôle dans la progression tumorale mammaire et prostatique alors que la sous-unité 5 (appelée Ric) est impliquée dans la formation de métastases. Sous des conditions physiologiques normales, cette sous-unité est exprimée dans le rein et induit une augmentation de l'activité de la pompe NKA. La sous-unité 6 est exprimée dans le cerveau, mais il n'existe aucune preuve de son interaction avec la pompe NKA contrairement à la sous-unité 7 qui se fixe essentiellement sur les isoenzymes de type $\alpha 1$ et qui servirait à la recapture du potassium en augmentant l'affinité de la pompe NKA pour ce dernier (119-121).

5.1.4. Le lien avec les kinases

En plus de sa fonction, de pompe NKA peut avoir un rôle de récepteur et dans ce cas assure la voie non-ionique en opposition à la voie ionique. En effet lorsque le récepteur fixe un glycoside cardiaque, il dimérise avec EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) dans les radeaux lipidiques et provoque consécutivement l'activation de Src et des kinases (*i.e. :* Ras, MAPK, ERK) (13). La pompe NKA peut avoir plusieurs partenaires qui renforcent ou non son action sur les flux de calcium. Quant à l'activation de Src, elle est liée à la conformation de la pompe NKA ; E1 garde Src inactif, tandis que E2 active Src. En effet, une diminution de la concentration extracellulaire du potassium induit une augmentation de l'état E2, et une activation de Src notamment par la phosphorylation de la Tyr416 (26).

5.1.4.1. La famille Src

La protéine c-Src, une tyrosine kinase non récepteur, a été découverte en 1989 par J. Michael Bishop et Harold E. Varmus, et leur valut le prix Nobel de Médecine et de Physiologie (25). Cette protéine est l'homologue de v-Src, protéine virale découverte dans le Sarcome de Rous. c-Src est connue pour son domaine SH (Src-Homologue) qui donnera par la suite la caractéristique majeure à la famille Src. Cette famille est composée de neuf membres : Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck et Lyn (Tableau 3)(25).

Src possède quatre sites SH et deux sites de phosphorylation Tyr527 et Tyr418. Le premier site de phosphorylation Tyr527, régulé par la protéine kinase Csk (c-src tyrosine kinase) permet à la protéine de rester « fermée ». En position fermée, le domaine avec la Tyr527 est replié sur les domaines SH2 et SH3 de la partie catalytique. En position ouverte, Src est activée lorsque la Tyr527 n'est plus phosphorylée (ou mutée) ou que la Tyr418 devient phosphorylée. Dans ce cas, Src se fixera par les domaines SH2 et SH3 à un partenaire généralement membranaire (*i.e.* EGFR après sa dimérisation avec la pompe NKA) et sa partie catalytique sera activée (122).

5.2. Inhibition de la pompe sodium potassium

Les glycosides cardiaques se fixent sur la partie extracellulaire α de la pompe NKA, et inhibent son activité. Cette inhibition induit un blocage de l'activité de la pompe et conduit à une augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation affecte directement l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (*Na^+/Ca^{2+} exchanger*) qui assure l'exclusion du Na^+ accumulé suite à l'inhibition de la pompe NKA, et va en échange permettre l'entrée du calcium dans le cytoplasme. En résumé, cet échangeur est responsable de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire suite à l'inhibition de la pompe NKA (Figure 9).

Tableau 3 : Protéines de la famille Src et leur expression

Tableau adapté de (25)*, présentant les sites et mode d'expression de chacune des protéines de la famille Src.*

Protéine	Expression
Src	Ubiquitaire et deux isoformes alternatives dans les neurones
Fyn	Ubiquitaire et isoformes alternatives dans les cellules T
Yes	Ubiquitaire
Yrk	Ubiquitaire (chez le poulet)
Lyn	Cerveau, cellules B, cellules myéloïdes (deux isoformes)
Hck	Cellules myéloïdes
Fgr	Cellules myéloïdes et B. (nucléaire)
Blk	Cellules B
Lck	Cellules T, NK et cerveau

5.3. La pompe sodium potassium dans les cancers

Il a été démontré que la sous-unité α de la pompe sodium potassium est surexprimée dans certains cancers, notamment dans les glioblastomes et le cancer du foie (123). De plus, des récentes études ont montré que la fixation de son ligand naturel, les glycosides cardiaques, jouait un rôle sur les voies de signalisation intracellulaire de l'oncogène Ras, et ainsi sur la survie et la prolifération cellulaire. Cette pompe joue son rôle physiologique au niveau des cardiomyocytes, ce qui explique les effets cardiotoxiques des glycosides cardiaques.

Des analyses épidémiologiques ont montré que l'administration de digoxine contre des pathologies cardiaques pouvait diminuer la fréquence des cancers de la prostate chez les hommes. Cette observation a suggéré un lien avec NKA, car ce récepteur est la cible principale des GCs (124). Le même effet a été observé pour le cancer du sein (125). Ces observations suggèrent l'implication de NKA dans la progression des cancers.

L'utilisation d'inhibiteurs de cette pompe, tels que les stéroïdes cardiotoniques (*i.e.* ouabaïne, digitoxine), a permis de modifier les concentrations d'ion K^+ ou Na^+ et ainsi d'affecter de nombreuses voies intracellulaires. De nouvelles études ont démontré que la pompe à sodium pouvait également jouer un rôle indépendant de son activité de pompage.

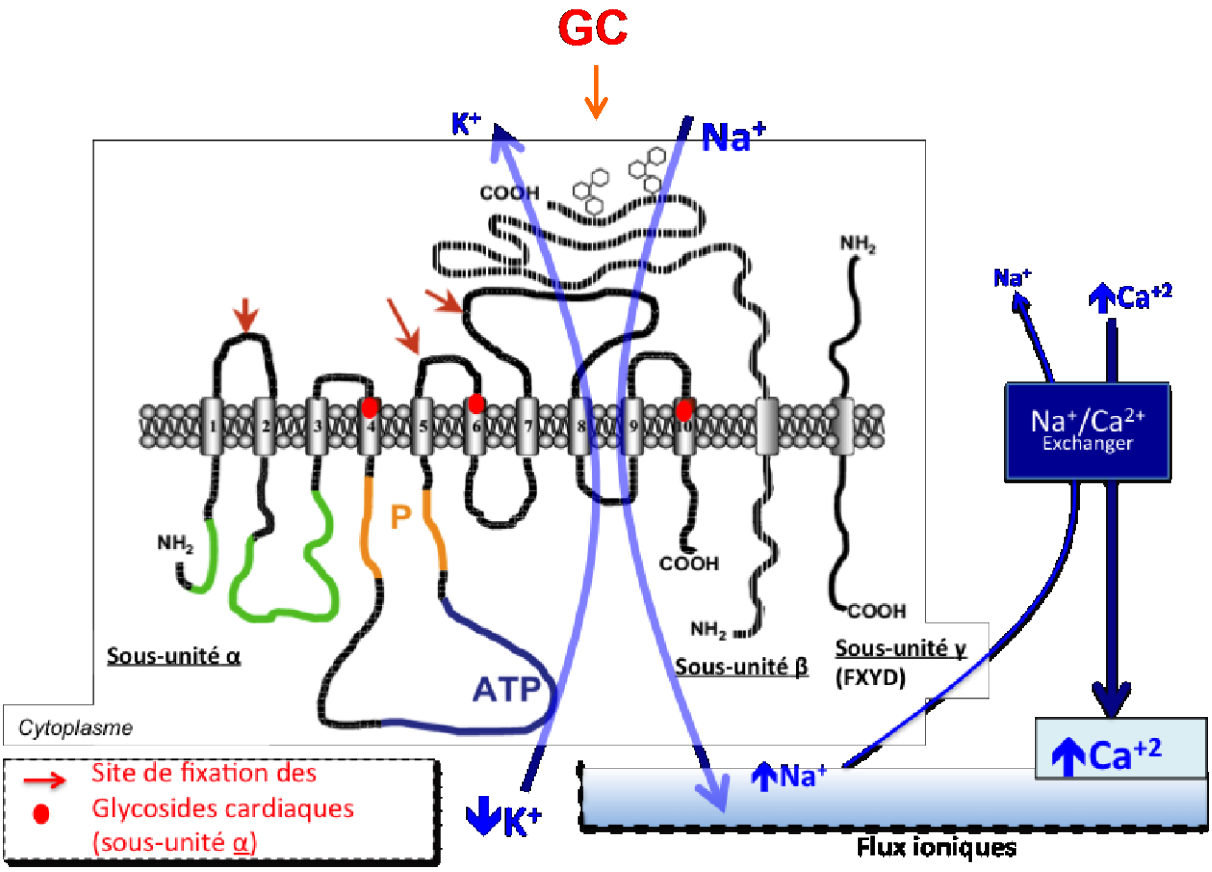


Figure 9 : Schéma de la pompe NKA

La pompe NKA possède trois sous-unités α, β et γ. Les sites de fixation des cardénolides et des ions se localisent sur la sous-unité α, tout comme la partie ATPase. L'inhibition de la pompe NKA par les cardénolides mène à une augmentation de la concentration en sodium intracellulaire qui activera l'échangeur Na^+/Ca^{2+}. Ce dernier transportera le sodium hors de la cellule et permettra l'absorption du calcium dans le cytoplasme (modifié de (110)*).*

6. Produits naturels : source de molécules anti-cancéreuses

6.1. Les produits naturels et leurs effets sur la famille Bcl-2

La nature constitue une source intarissable de substances naturelles présentant des vertus préventives et curatives très souvent utilisées en médecine traditionnelle pour combattre des affections en tous genres. Ces substances trouvent leur origine dans le monde végétal ou animal, terrestre ou marin (126). L'idée des scientifiques est aujourd'hui de s'appuyer sur ces connaissances ancestrales de la médecine traditionnelle pour extraire des plantes utilisées, les composés actifs, de les purifier et/ou de les modifier chimiquement au niveau structural de manière à augmenter leurs potentiels actifs (*i.e.* cytotoxique et antiprolifératif). Le but étant de les tester *in vitro* afin de définir leur activité biologique et de les utiliser par la suite en clinique pour prévenir ou traiter des maladies incurables tels les cancers (127, 128).

Le but des traitements est de pouvoir à nouveau induire la mort des cellules cancéreuses sans pour autant détruire les cellules saines. L'avantage des composés naturels étant leurs faibles effets secondaires, beaucoup de scientifiques suggèrent leur utilisation en clinique. Comme expliqué précédemment, les cancers développent de nombreuses altérations de leur mécanisme cellulaire, que ce soit au niveau de la prolifération, du métabolisme ou de la survie. Ces altérations peuvent être utilisées comme marqueurs pour cibler les cellules cancéreuses, notamment dans les mécanismes de survie et d'apoptose car les protéines de la famille Bcl-2 sont souvent surexprimées dans les cancers. L'utilisation de composés naturels ciblant ces protéines semble être une bonne alternative pour le traitement de cette maladie (1).

Les molécules naturelles peuvent agir de différentes façons sur les protéines de la famille Bcl-2, que ce soit en inhibant l'expression des protéines anti-apoptotiques de cette famille ou en activant les protéines BH-3. Dans tous les cas, cette inhibition conduira à l'activation des protéines pro-apoptotiques telles Bax ou Bak.

La diminution de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 pour restaurer l'apoptose dans les cellules apparaît comme une stratégie intéressante. Dans certains cas, cette induction de l'apoptose peut être dépendante des caspases ou non. En effet, certains composés, comme l'angélicine, un composé extrait de la plante *Bituminaria bituminosa,* induisent l'apoptose intrinsèque, en diminuant l'expression des protéines de la famille Bcl-2 *via* un mécanisme dépendant des caspases dans les neuroblastomes (129). Cependant des composés peuvent

aussi induire l'apoptose indépendamment de l'activation des caspases, par exemple la cryptotanshinone (*Salvia miotiorrhiza*) qui agit en activant de la voie JNK induisant l'inhibition des protéines de survie cellulaire telles que la survivine, Mcl-1, Bcl-2 ou encore ERK, dans des lignées de cancer du sein, de la prostate ou encore dans les rhabdomyosarcomes (130). D'autres composés présentent une activité pro-apoptotique. C'est le cas du resveratrol qui surexprime miR-21 conduisant à la diminution de Bcl-2 dans des cellules du cancer du pancréas (117) ou encore des composés sulfurés qui induisent la phosphorylation de Bcl-2 par l'activation de la voie JNK (72).

La diminution de l'expression des protéines Bcl-2 par les composés naturels permet de diminuer la résistance et de sensibiliser les cellules cancéreuses aux traitements conventionnels tels que TRAIL. Un tel phénomène a été observé avec des glycosides cardiaques telles l'ouabaïne, la digitoxine et la bufaline (cf : 6.2. Les glycosides cardiaques), ou encore avec un composé comme le sesquiterpène lactone extrait du champignon *Antrodia camphorata*. Ce composé augmente la sensibilité des cellules face à la mort cellulaire induite par TRAIL, en augmentant l'expression de son récepteur, ainsi qu'en diminuant des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (131). Dans les lignées de lymphome B non-hodgkinien, la diminution de Mcl-1 peut aussi être responsable de la sensibilisation des cellules. Un traitement à la quercetine (un flavonoïde, métabolite secondaire contenu dans beaucoup de végétaux) d'une part facilite le recrutement de DISC sur les récepteurs de la mort cellulaire et d'autre part diminue l'expression de Mcl-1 et de la survivine (132). Ces résultats ont été confirmés dans l'étude de Spagnuolo *et al*. (133) menée au sein de notre laboratoire qui ont montré que la quercetine peut sensibiliser les cellules résistantes à TRAIL et à l'agent anti-CD95 dans des cellules B de leucémie chronique lymphocytaire. Par ailleurs, les effets de sensibilisation sont corrélés à la diminution de l'expression de Mcl-1, aussi bien au niveau de son ARNm que de sa protéine.

La modulation des protéines de la famille Bcl-2 peut se faire de façon indirecte, par les protéines de la famille BAG (*BCL2-associated athanogene*), qui sont des protéines chaperonnes stabilisant les protéines anti-apoptotiques et régulant ainsi leur dégradation. Le traitement au calcitriol des lignées de cancer de prostate est, quant à lui, capable d'inhiber BAG1L, ainsi que d'autres protéines de la famille Bcl-2 (134), alors que la cantharidine (un composé terpénoïde produit par les insectes) induit une inhibition de BAG3 et de la protéine HSF1 (*Heat shock factor protein 1*), qui régule positivement l'expression de BAG3 (135).

Le métabolisme des cellules cancéreuses est souvent suractivé, afin de permettre une prolifération rapide et une survie. Le ciblage des mécanismes impliquant le métabolisme peut-être une alternative intéressante pour le traitement des cancers (136). Il a été démontré que la curcumine inhibe l'interaction mTOR-Raptor et ainsi que l'activité kinase de mTORC1, une protéine liée à la synthèse protéique (137). Cette diminution de l'activité de mTOR et par conséquent de la synthèse protéique, empêche la re-synthèse des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 présentant une faible demi-vie faible (*i.e.* Mcl-1) (138).

Les protéines BH-3 permettent de réguler les interactions entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. En effet, elles permettent le relargage des protéines pro-apoptotiques initialement séquestrées par les protéines anti-apoptotiques. Certains composés naturels miment ces effets. C'est notamment le cas de composés naturels qui, en se fixant dans la poche BH-3 des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL, Bcl-2 ou Mcl-1, provoquent la libération de Bax ou Bak et induisent la mort cellulaire. Cet effet est observé avec la jacarelhypérole A (extrait de la plante *Hypericum japonicum*) qui induit le relargage du cytochrome c précédant l'activation des caspases dans la lignée K562 (7).

Récemment de nombreuses études ont conduit à l'avènement de petites molécules inhibitrices spécifiques de Bcl-2 telles que les composés de la famille ABT, qui permettent de cibler préférentiellement ces protéines surexprimées dans les cancers en limitant les effets secondaires et/ou de sensibiliser les cellules cancéreuses à des traitements déjà utilisés en clinique. La limite de ces traitements est lié au fait que de nombreux cancers surexpriment Mcl-1, qui n'est pas ciblée par ces antagonistes de Bcl-2. Par conséquent les effets des composés ABT soient abolis par cette surexpression de Mcl-1. Bien que de nombreux composés ciblant Mcl-1 sont en cours de développement (*i.e.* Gossypol), leurs effets secondaires ne sont pas encore bien définis et maitrisés. De plus, ces composés requièrent l'approfondissement de ces études (139).

6.2. Mcl-1, une cible potentielle des composés naturels

Comme précisé dans le paragraphe 4.2.2, Mcl-1 est une protéine finement régulée à plusieurs niveaux de son expression, incluant le niveau de son ARNm ainsi que de la stabilité de la protéine. Toutes ces régulations lui confèrent un temps de demi-vie faible et constituent

une cible potentielle pour des composés pouvant moduler les différents niveaux de régulation de son expression.

6.2.1. Les composés naturels induisant leurs effets au niveau de la transcription

Comme décrit précédemment, la voie Jak/STAT constitue une des voies majeures de régulation de la transcription de Mcl-1 et apparaît ainsi comme une cible intéressante pour les traitements anti-cancéreux. De nombreux composés naturels ont montré un effet au niveau de cette voie dans différents types de cancers. C'est le cas de la withacnistine (extrait de la plante *Acnistus arborescens*) qui inhibe l'activation constitutive de STAT3/5 par IL-6 ou EGF. De cette façon STAT3/5 ne peut plus se lier à l'ADN ce qui, diminuent la transcription de Mcl-1 et Bcl-xL, et qui conduit à l'induction de l'apoptose dans les lignées MDA-MB-231 (7). Dans des lignées de cancer du pancréas une relation a été établie entre l'inhibition de JAK, et l'inactivation de STAT3 par un dérivé de l'indirubine (extrait de la plante *Indigofera sp*.) et la diminution de Mcl-1 et de la survivine (140). Des effets similaires ont été observés dans des lignées du cancer du sein (MDA-MB-231) traitées à l'émodine (extrait de la plante *Rheum palmatum*) (141) ou avec la bufaline (142). Le composé cosmomycine C (extrait de *Streptomyces sp*. marin) a montré, qu'en plus d'induire une diminution de l'activation de STAT3, il pouvait empêcher l'activation et la translocation de STAT3 dans le noyau et induire à la diminution de Mcl-1, de la survivine, ainsi que de la cycline D1 conduisant ainsi à une accumulation en phase G1 (143). La thymoquinone (extrait de l'huile de la plante *Nigella sativa*) a montré les mêmes effets dans des lignées de myélomes multiples (144).

La voie de signalisation STAT3, peut être une cible intéressante des composés naturels en vue de l'inhibition de Mcl-1, notamment dans les cancers résistants aux traitements qui, pour beaucoup, surexpriment cette protéine STAT3. Cependant même si cette voie STAT3 est majoritairement impliquée dans la modulation de Mcl-1, d'autres voies, comme celle de la cycline CDK9 jouent un rôle non négligeable. En effet, la fixation des flavonoïdes, comme la wogonine, sur les sites de fixation normalement dédiés à l'ATP de la protéine empêche l'activation de la cycline CDK9 et bloque ainsi l'activation de l'ARN polymérase II (ARNPII) qui n'est alors plus capable d'activer la transcription de l'ARNm de Mcl-1. L'activation de ARNPII peut également être inhibée par d'autres composés naturels de cette même famille

tels que la chrysine, la lutéoline et l'apigénine (145). Un autre composé issu de la médecine traditionnelle chinoise, la norcantharidine (un dérivé de la cantharidine produit par l'insecte *Mylabris sp.)* peut, quant à lui, inhiber l'expression de l'ARNm de Mcl-1, et ainsi potentialiser les effets de l'inhibiteur de Bcl-2 ABT-737 (130).

Des inhibiteurs spécifiques de STAT5, dérivés de l'acide salicylique, se fixant sur le domaine SH de cette protéine sont actuellement à l'étude, puisque cette protéine est responsable du développement de cancers notamment par l'induction de l'expression de protéines anti-apoptotiques telle Mcl-1. Ainsi, l'inhibition de son activité et de sa fixation sur certains promoteurs, inhiberait l'activation de l'oncogène *MYC* ou de certaines protéines anti-apoptotiques telle Mcl-1 (146).

6.2.2. Les composés naturels induisant leurs effets au niveau de la protéine Mcl-1

Certains composés peuvent mimer les effets des protéines BH-3 et inhiber l'activité anti-cancéreuse des protéines anti-apoptotiques en se liant à ces dernières et en induisant leur dégradation ou leur séquestration qui conduira finalement à l'induction de l'apoptose. C'est le cas de l'acide gambogique (extrait de la plante *Garcinia hanburyi*), qui inhibe l'action des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et présente particulièrement une forte affinité pour Mcl-1, dans les cellules leucémiques (147). Une autre molécule naturelle, le gossypol (extrait de *Gossypium sp.*), connu pour inhiber spécifiquement les protéines de la famille Bcl-2, permet de détruire le complexe Bcl-xL/Bax (148) ainsi que le complexe Mcl-1/Bax (149) et d'induire NOXA et PUMA, tout en sensibilisant les cellules PC3 au docetaxel.

Dans le cas de certains composés naturels, Mcl-1 peut aussi être dégradée par le protéasome. C'est le cas de la marinopyrrole A (*Streptomyces sp*. Marin), qui induit la mort cellulaire dans les cancers Mcl-1 dépendant, majoritairement, en se liant à cette protéine et en inhibant la formation du complexe Mcl-1/Bim (150). Ce composé permet également d'induire la dégradation de Mcl-1 par le protéasome en impliquant ni NOXA ni la phosphorylation de Mcl-1. Par ailleurs, l'inhibition de la dégradation de Mcl-1 par un inhibiteur du protéasome, permettant de prévenir le clivage des caspases souligne, l'importance de Mcl-1 dans l'induction de l'apoptose (150).

La dégradation de Mcl-1 par le protéasome peut être initiée par la protéine BH-3, appelée NOXA. Il a été démontré que le composé naturel, le celastrol (extrait de la plante

Tripterygium wilfordii) augmente l'expression de NOXA, induisant ainsi la dégradation de Mcl-1. Mais étonnement ce composé induit aussi le clivage de Mcl-1 par l'induction des caspases. Dans cette étude, les auteurs montrent qu'un double mécanisme de dégradation de la protéine Mcl-1 est activé simultanément, et conduit à l'induction de l'apoptose dans certaines lignées de cancer de la prostate (144).

Les kinases peuvent, elles aussi, jouer un rôle dans la régulation de Mcl-1 en induisant sa phosphorylation, qui permet sa reconnaissance par le protéasome et sa dégradation comme le suggèrent les travaux de Gao *et al.*(130), qui établissent le lien entre la diminution de Mcl-1 et l'activation de la voie JNK couplé à l'inactivation de PKB (*Protéine Kinase B*) par l'acide ursolique (un terpène présent dans de nombreux végétaux).

Dans certains cas, la régulation de Mcl-1 s'effectue simultanément à plusieurs niveaux, mais diffère selon le modèle cellulaire utilisé. En effet, un traitement avec la mithramycine A (extrait de *Streptomyces sp*.) induit l'apoptose dans les deux lignées cancéreuses de prostate PC3 et DU145, en diminuant l'expression de l'ARNm de Mcl-1 dans la lignées PC3, mais pas dans la lignée DU145, alors que l'expression de la protéine est diminuée dans les deux lignées par implication du protéasome. De tels effets sur la prolifération et l'expression de Mcl-1 ont aussi été démontrés dans des xénogreffes de cellules DU145 sur des souris (130). Cette régulation simultanée de Mcl-1 au niveau de son ARNm et de sa protéine a également été démontrée dans des lignées hématopoïétiques traitées avec la quercetine (133).

L'ARNm tout comme la protéine de Mcl-1 ont un temps de demi-vie faible dans la cellule. Cette observation peut-être un avantage pour le traitement des cancers. En effet, la capacité anti-apoptotique de Mcl-1 peut être rapidement diminuée et ainsi conduire brusquement la cellule vers le processus de mort par apoptose ou la sensibiliser à d'autres traitements anti-cancéreux déjà connus (133).

6.3. Etudes cliniques

De nombreuses études fondamentales ont abouti à des tests cliniques, appliqués sur des patients afin de démontrer les effets anti-cancéreux des composés naturels que ce soit seuls ou en co-traitement, mais aussi en tant que composé préventif du développement tumoral (https://clinicaltrials.gov).

C’est le cas du co-traitement alliant la curcumine, avec la gemcitabine, utilisé afin de potentialiser les effets anti-cancéreux de cet agent chimiothérapique conventionnel dans les cancers du pancréas (phase II) et du colon (phase III). D’autres études évaluent, quant à elles, l’effet préventif des composés naturels tels que le resveratrol (phase I) ou l’acide folique (phase II) dans le cas du cancer du colon. Encore d’autres études cliniques combinent l’utilisation de composés naturels sulfurés avec les traitements conventionnels tel le docetaxel de manière à augmenter l’efficacité des traitements.

L’intérêt croissant de l’application clinique de ces composés naturels implique une recrudescence des études *in vivo*. Actuellement peu d’analyses *in vivo* sont en cours dans le cas du cancer et impliquant Mcl-1. La majorité d’entre elles impliquent le gossypol ou le bortézomide utilisés seuls ou en co-traitement chacun avec d’autres molécules.

L’UNBS1450 ne fût pas le seul glycoside cardiaque testé sur des patients, actuellement la digoxine est elle aussi testée dans le cancer du sein, ou encore la bufaline en co-traitement avec la gemcitabine dans les cancers du pancréas (https://clinicaltrials.gov/, digoxine : NCT01887288, bufaline : NCT00837239).

En considérant l’engouement des laboratoires pharmaceutiques envers ces composés, les produits naturels restent tout de même à ce jour une source peu exploitée de molécules actives comparé aux nombreuses molécules pas encore étudiées ou découvertes car ces substances sont présentes partout où la vie, quel qu’en soit sa forme, est apte à se développer tant sur Terre que dans la mer. Notamment dans des végétaux (fruits et légumes) utilisés dans notre alimentation, comme par exemple les isothiocyanates présents dans le choux, les lycopènes dans les tomates ou encore les flavoïdes des carottes (151). Toutefois les fruits et légumes ne sont pas les seuls sources de produits naturels, puisque d’autres composés avec des propriétés semblables sont présents dans les champignons comme la doxorubicine, ou proviennent d’organismes marins comme l’hétéronemine isolée à partir d’éponges marines (152) ou encore de plantes non comestibles avec, par exemple, les cardénolides telle la digitoxine extraite de la plante *Digitalis purpurea*. Il existe en somme de nombreux composés naturels très actifs agissant notamment sur les marqueurs du cancer, qui n’attendent qu’à être utilisés dans les traitements anti-cancéreux (Tableau 4). Cependant, malgré une efficacité anticancéreuse très marquée *in vitro*, la biodisponibilité et la concentration effective de ces substances naturelles sont faibles dans le sang (153), ce qui limite leur future utilisation en

clinique. Ainsi, de nombreuses études sont actuellement en cours afin de modifier la structure initiale de ces molécules naturelles pour en améliorer la biodisponibilité *in vivo* tout en préservant leur potentiel anti-cancéreux (*i.e. :* UNBS1450, curcumine).

6.4. Les glycosides cardiaques

Les glycosides cardiaques sont des molécules utilisées couramment en clinique dans le cadre du traitement de pathologies cardiaques. Leur mécanisme d'action consiste à se lier et à inhiber la pompe NKA qui contrôle le flux de calcium et ainsi la contraction musculaire (125).

6.4.1. Leur classification

Les glycosides cardiaques sont des molécules chimiques possédant un noyau stéroïdien formé de 4 cycles (A, B, C et D). Sur le cycle A, en position 3 est greffé un sucre, qui est responsable de la pharmacodynamique du composé. En position 17, sur le cycle D se trouve une lactone, dont la nature permet de séparer cette famille de molécules en deux sous-groupes :

- Si la lactone est une butyrolactone, on parlera de cardénolide.

- En revanche si cette lactone est une α-pyrone, ces composés seront des bufadiénolides.

Le sucre et la lactone sont en conformation *cis* par rapport au noyau stéroïdien (Figure 10) (125).

Tableau 4 : Exemple de composés naturels agissant sur les 10 marqueurs du cancer

Marqueur	Composé	Origine	Cible	Cellules	Source
Activation des récepteurs de prolifération	Breviline A	*Centipeda minima*	Permet de bloquer la voie JAK-STAT	A549	(140)
	Epigallocatechine -3-Gallate	Thé vert	Inhibiteur des récepteurs de croissance EGF-R, HER	JIMT-1, HNSCC, KYSE150, A431	(154-156)
Dérégulation du cycle cellulaire	Luteoline	Céleri, thym, pissenlit	Dégradation de la cycline D1 et inhibition de c-Myc et arrêt en G1	Eca109, NPC, HT29	(157-159)
	Berberine	Argémone mexicaine	Activation de p53 par une diminution de MDM2	Leucémie lymphoblastique aigüe	(160)
	Curcumine	*Curcuma longa*	Expression des protéines CDKi (p16, p21 et p27)	Cancer de la prostate	(161)
Activateur de l'immunité	α-galactosyl-ceramide (formé à partir d'un composé naturel)	*Agelas sp.*	Active les cellules de la réponse immunitaire Th1	Natural Killer T	(162)
Inhibiteur de télomérases	β-lapachone	*Tabebuia impetiginosa*	Inhibe l'activité des télomérases	DU145	(163)
Invasion	Resveratrol	Raisin, mûre	Inhibe Akt, induit l'expression du suppresseur de tumeurs PDCD4 maspine	LnCAP, DU145	(164)
	Acide caféique	Présent dans la plupart des plantes	Inhibition de MMP2, diminution de FAK	SCC-9	(131)

Angiogénèse	Chaetoglobosine K	*Diplodia macrospora*	Inhibiteur de HIF1α conduisant à la diminution de VEGF	OVCAR-3, A2780 et CP70	(165)
	Celastrole	*Tripterygium wilfordii Hook F*	Inhibe l'accumulation de HIF1α	EA.hy926	(166)
Induction de l'apoptose	Bufaline	Extrait de la peau de crapaud	Inhibition des kinases Diminution de Mcl-1 Stress oxydant	DU145, LnCAP, PC3, BEL704, HL60, A549, MDA-MB-231, HT-29, U-2OS	(167)
Inhibiteur du métabolisme	Quercetine	Présent dans la plupart des plantes	Inhibe l'intégration du glucose (GLUT)	MCF-7, MDA-MD-231	(168)
Instabilité du génome	Cordyceptine	Cordyceps	Inhibiteur de PARP	BRCA1/2 (–/–)	(169)
Inflammation	Extrait de *Eryngium foetidum*	*Eryngium foetidum*	Inhibition de COX-2, TNFα, IL-6	RAW264.7	(170)
	Curcumine	*Curcuma longa*	Inhibe l'activité de NF-κB		(154)

6.4.2. Les cardénolides

Les cardénolides cardiotoniques sont des stéroïdes endogènes ou exogènes qui jouent un rôle dans l'activité cardiaque par l'intermédiaire de leur action inhibitrice de la pompe NKA, notamment dans les myocytes. Il en résulte une augmentation du sodium et du calcium intracellulaire qui permet aux myocytes de garder une contractibilité régulière. De récentes études ont montré que la pompe NKA pouvait aussi jouer un rôle de récepteur (grâce à sa sous-unité α) pour transmettre un message intracellulaire lorsqu'elle fixe un ligand tel que les cardénolides cardiotoniques (171). L'activité de pompe ou de récepteur est dictée par la concentration de ligands présents. En effet, lorsque le ligand est présent à fortes doses, il devient inhibiteur de la pompe NKA. Si cette inhibition est soutenue, la cellule entre en apoptose. En revanche, à de faibles concentrations, les cardénolides ont un effet sur le signalosome et peuvent moduler la cascade Src-EGFR-RAS-RAF-ERK, PKB (Protéine kinase B), PI3K (*Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase*) et induire la prolifération et la survie cellulaire (172). Un nouvel objectif de la recherche anti-cancéreuse est d'inhiber l'activité de la sous-unité α de ces pompes dans les cancers qui surexpriment cette protéine (173).

Un des cardénolides les plus connus est l'ouabaïne, un composé endogène, synthétisé dans les cellules hypothalamiques, dont le relargage est stimulé par l'angiotensine II, l'ACTH (*AdrenoCorticoTropin Hormone*) et les agonistes des récepteurs α1-adrénergiques. La digoxine est un cardénolide exogène, extrait des digitales, utilisé dans les traitements des maladies cardiaques tout comme la digitoxine. Cependant l'inconvénient de ces composés pour le traitement anti-cancéreux est la toxicité cardiaque produite par ces substances. Il est par conséquent primordial de découvrir de nouvelles molécules sans cet effet cardiotoxique (174).

Notre projet se focalisera sur l'étude de l'effet de deux cardénolides, l'ouabaïne et l'UNBS1450, par comparaison avec celui d'autres cardénolides (digitoxine et digoxine) et bufadiénolides (proscillaridine A et cinobufagine) (Tableau 5).

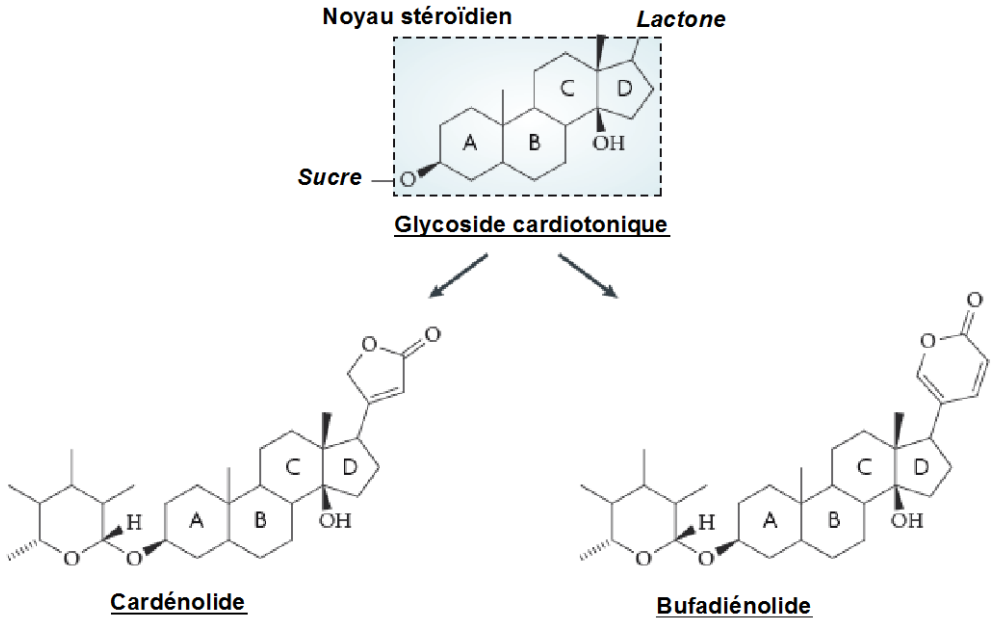


Figure 10 : Classification des glycosides cardiaques

Représentation de la structure chimique et de la classification des glycosides cardiaques. Cette famille de molécules pourra être séparée en deux sous-groupes en fonction de la nature de la lactone présente sur le cycle D en position 17 (modifié de (125)*).*

6.4.2.1. L'UNBS1450

L'UNBS1450 est un cardénolide hémi-synthétique, dérivé du cardénolide 2''-oxovoruscharine. Le précurseur de ce composé a été extrait à partir de la plante africaine *Calotropis procera* présente en Afrique Tropicale, Inde, Chine, Australie ou Amérique du Sud et vivant dans des climats arides et semi-arides (Figure 11). Cette plante a montré de nombreux effets biologiques comme par exemple des effets anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, cytotoxiques ou encore analgésiques. Il a été extrait de cette plante de nombreux cardénolides tels que la calotropine, la calactine, la voruscharine, l'uscharine et la 2''-oxovoruscharine (175). Les deux derniers composés montrant une meilleure activité anti-tumorale ont servi de base pour le design de 31 composés hémisynthétiques. Ces tests ont permis d'une part de connaître les groupements actifs pour les effets de la molécules, mais aussi de déterminer le plus actif avec le moins d'effets secondaires : l'UNBS1450 (175).

UNBS1450 peut avoir un effet anti-cancéreux notamment en diminuant l'activité transcriptionnelle de NF-κB et la fixation de p65 à l'ADN dans les lignées A549 (cancer du poumon), ainsi que la prolifération de ces cellules que ce soit *in vitro* ou lors de xénogreffes sur des souris (176). Dans ce même cancer, à savoir le cancer du poumon *in vitro* et *in vivo*, lors de xénogreffes, un traitement à l'UNBS1450 diminue l'expression de Hsp70 (*Heat shock factor protein*), une protéine de survie. Ces effets sont observés en même temps qu'un arrêt en phase S, ainsi qu'une induction de la mort cellulaire notamment par la perméabilisation du lysosome induite par la protéine LMP (*Lysosomal Membrane Permeabilization*) (176).

Les effets sur le lysosome et l'apparition de vacuoles peuvent laisser présager un effet sur une mort cellulaire induite par autophagie. En effet quelque temps après il a été montré que la pompe NKA est surexprimée dans les glioblastomes. Une surexpression de la pompe NKA α1 est aussi observée dans de nombreux cancers ; il a été proposé d'utiliser cette altération comme marqueur pour les cellules cancéreuses (177). Une étude dans cette lignée montre que l'inhibition de la pompe NKA α1 est 200 fois plus efficace avec l'UNBS1450 qu'avec l'ouabaïne. De plus, l'UNBS1450 induit une désorganisation du cytosquelette et l'autophagie notamment avec une conversion de LC3-I en LC3-II et de la surexpression de Beclin-1 (178). Des études en cours dans notre laboratoire, confirment les effets de l'UNBS1450 sur le lysosome dans les lignées SH-SY5Y et SK-N-AS, et suggèrent l'importance des lysosomes notamment lorsqu'ils sont perméabilisés et relarguent la cathepsine. Sous ces conditions, l'UNBS1450 induit la mort cellulaire par l'apoptose ou par nécroptose suite à l'induction de l'autophagie dans les deux cas.

Dans la lignée cancéreuse de prostate PC-3, des études ont montré que l'UNBS1450 avait un effet antiprolifératif indépendant de la mort cellulaire et de la modulation de la concentration du calcium intracellulaire (123). Lors d'un traitement avec l'UNBS1450, une modification de l'organisation nucléaire lors de l'induction de la mort cellulaire (non apoptotique), due à une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène et une rapide diminution de c-Myc sont observées. c-Myc modifie à son tour l'expression des CDK et de p-Rb (179).

Des études menées dans notre laboratoire ont montré que l'UNBS1450 pouvait induire l'apoptose des cellules hématopoïétiques à partir de 20 nM, notamment par l'inhibition de voies inflammatoires contrôlées par NF-κB et l'activation de caspases (-9, -7, -8 et -3) (127). De plus, une forte diminution de la protéine Mcl-1 a été observée en utilisant ce composé (180).

Nos premiers tests ont montré que l'UNBS1450 présente des effets cytostatiques et cytotoxiques à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans des cellules hématopoïétiques. L'UNBS1450 module également l'expression de la protéine Mcl-1 sans modifier l'expression de Bcl-2 et induit la mort cellulaire induite par l'activation de l'apoptose *via* la voie intrinsèque, impliquant la mitochondrie et l'activation des protéines Bax/Bak. (127). De plus, contrairement aux traitements qui utilisent des cardénolides cardiaques, l'UNBS1450 n'a que très peu d'effets toxiques sur les cellules saines du sang (127). Ces observations font de l'UNBS1450 un composé thérapeutique prometteur, méritant des études mécanistiques plus poussées.

6.4.2.2. L'ouabaïne

L'ouabaïne (ou strophantine) est un cardénolide avec différentes origines. Cette molécule peut être extraite de la plante strophante ou être endogène à l'organisme (Figure 12). Sa zone de stockage et sa biosynthèse se localisent au niveau de la glande surrénale et dans les cellules hypothalamiques. Ces cellules utilisent la prégnenolone et la progestérone comme précurseurs de l'ouabaïne endogène. L'inhibition de la conversion de la prégnenolone en progestérone inhibe la formation de l'ouabaïne. Chez les bovins, la synthèse de l'ouabaïne est stimulée par l'angiotensine II, l'ACTH et les récepteurs adrénergiques α1. Par contre, dans des lignées humaines dérivées des cellules surrénales (CLR7050), seule l'arginine, la vasopressine et la phénylphrine stimulent la synthèse de l'ouabaïne.

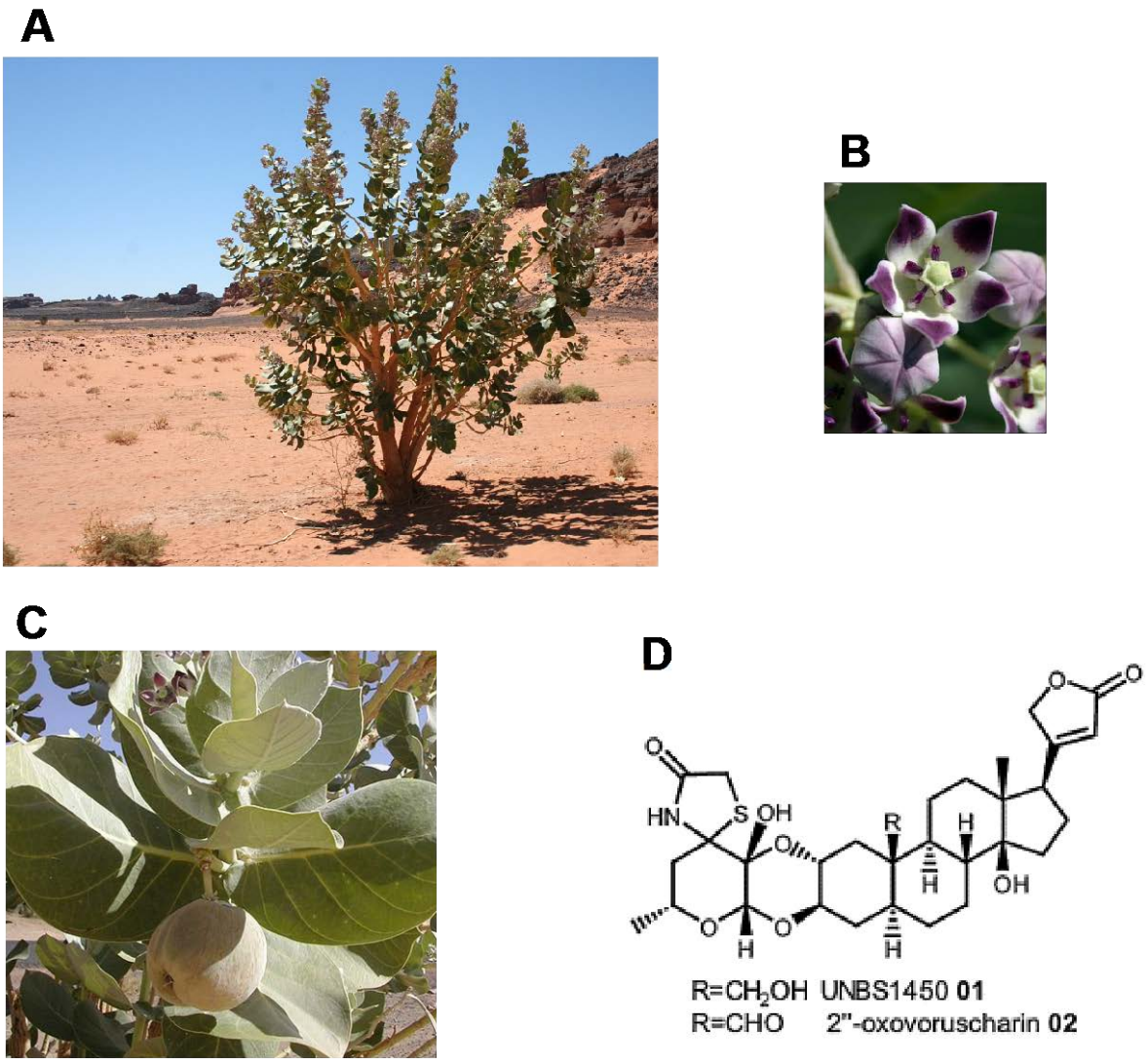


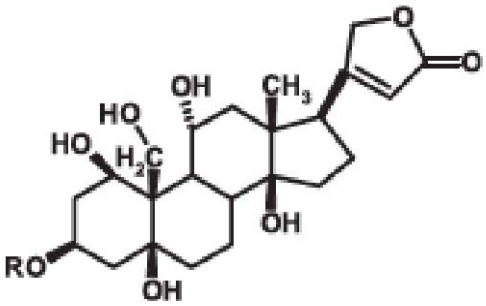
Figure 11 : *Calotropis procera* et sa molécule active UNBS1450

*Calotropis procera (A) (« pommier de sodome ») est un arbuste toxique de la famille des Asclepiadaceae qui pousse dans les zones arides (*i.e. *: Sahara). Ses fleurs sont blanches avec des extrémités violacées (B). Cet arbuste forme des fruits jaunâtres (C). De son latex blanc est extrait le cardénolide 2-oxovorusharine, à partir duquel est synthétisé l'UNBS1450 (D)* **(180)**.

A



B



Ouabaïne
R = Rhamnose

Figure 12 : *Strophantus gratus et sa substance active* ouabaïne

Strophantus gratus (A) est un arbuste à partir duquel est extrait l'ouabaïne. (B) Formule chimique de l'ouabaïne.

Dans ces deux cas, cette synthèse est inhibée par la doxazosine, un antagoniste des récepteurs adrénergiques α1. Par conséquent, le relargage de cette hormone dans le sang est sous le contrôle du système nerveux sympathique.

Comme tous les cardénolides, l'ouabaïne joue un effet inhibiteur sur la pompe Na+/K+-ATPase, avec des effets en aval tels qu'une augmentation du calcium intracellulaire et une activation de la cascade Ras (174).

6.4.3. Autres glycosides cardiaques

La nature est source d'autres glycosides cardiaques tels que la digitoxine et la digoxine, deux cardénolides extraits de *Digitalis purpurea*. La digitoxine connue également sous le nom de digitaline, fût utilisée dès le XVIII siècle par le botaniste Withering mais son composé actif ne fût isolé que cent ans plus tard. La digitoxine fût la première molécule utilisée pour le traitement de pathologies cardiaques. La digoxine, quant à elle, est extraite de la feuille de la digitale laiteuse et est également présente dans l'urine humaine.

Le glycoside cardiaque le plus actif fait partie de la famille des bufadiénolides. Il s'agit de la proscillaridine A, présente au niveau du sérum humain mais également en plus grande quantité dans la plante marine *Scilla maritima*. La cinobufagine est, pour sa part, extraite de la sécrétion de la peau du crapaud asiatique *Bufo gargarizans* (125).

De nombreuses publications ont montré que les glycosides cardiaques avaient un effet sur les flux ioniques et qu'en fonction de leur concentration ils pouvaient également jouer un rôle sur l'activation du signalosome et de nombreuses kinases suite à leur fixation sur la pompe Na^+-K^+-ATPase. Cette seconde voie est appelée « non-ionique » en opposition à la voie « ionique » (Figure 13) (181).

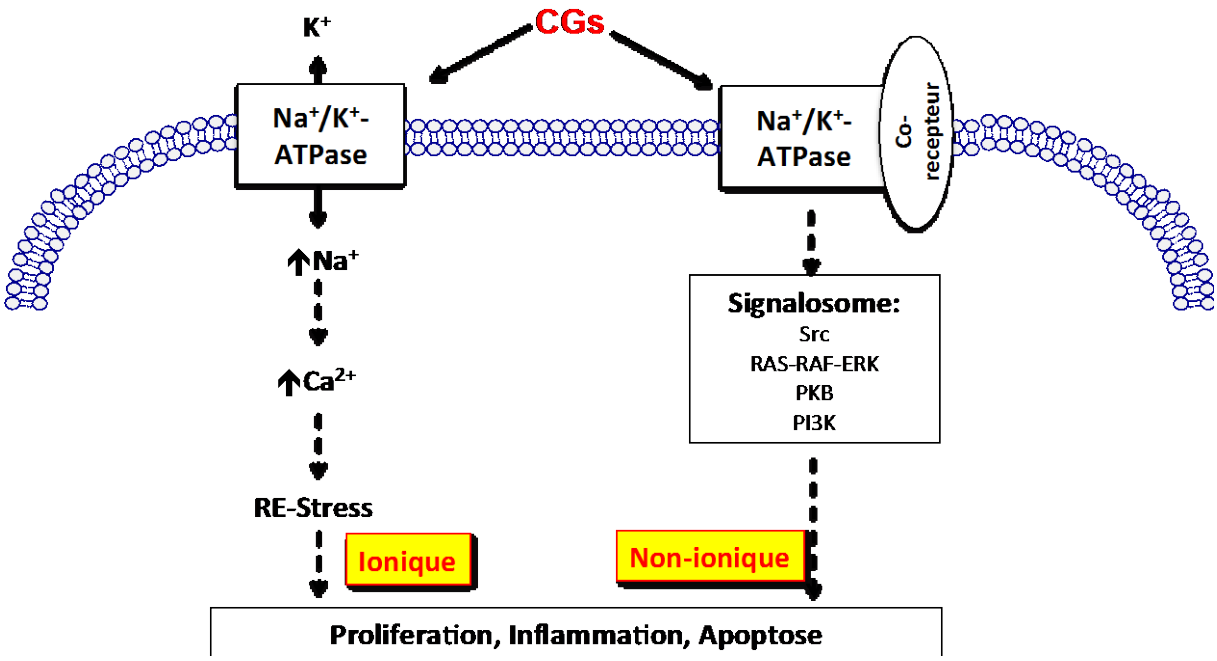


Figure 13 : Voies ionique et non-ionique

Les effets des glycosides cardiaques dépendent de leur concentration et peuvent induire deux voies cellulaires différentes ionique et non-ionique, avec des effets parfois antagonistes. RE : Réticulum Endoplasmique, PKB : Protéine kinase B, ERK : Extracellular-Regulated Kinase, PI3K : Phosphatidyl Inositol-3 Kinase.

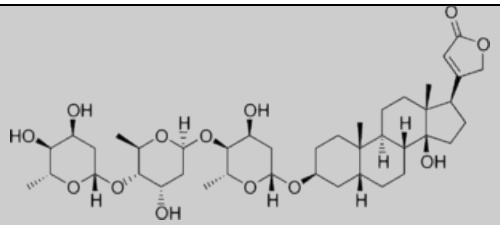
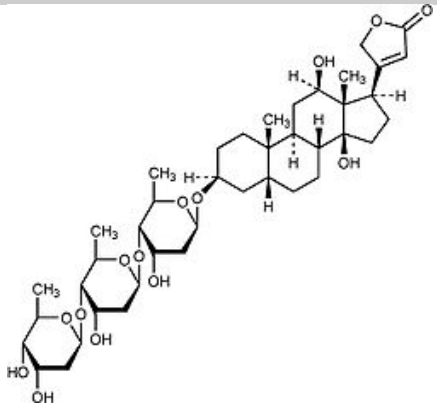
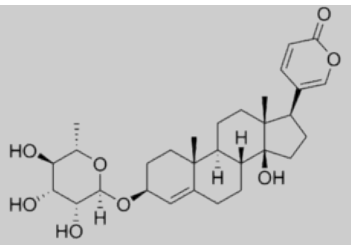
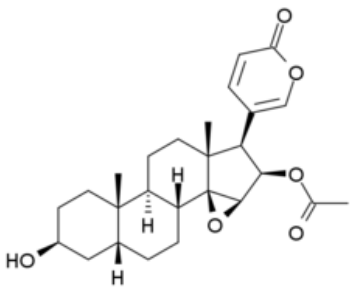
6.4.4. Application des glycosides cardiaques dans le traitement du cancer

Les premières observations des effets anti-cancéreux des glycosides cardiaques, ont été réalisées par Stenkvist, chez des femmes traitées avec des digitaliques en parallèle de traitement contre le cancer, qui ont ainsi développé des tumeurs de forme bégnine comparé aux patientes non traitées, avec un taux de rechute plus faible à 5 ans après mastectomie. Plus tard, la même équipe montrera un taux de mortalité de 6% (2 morts sur 32) contre 34% pour un groupe contrôle non traité en parallèle (48 morts sur 143) avec des glycosides cardiaques. En opposition une étude menée par Haux, à plus large spectre, n'a pas permis d'établir de liens entre les effets anti-cancéreux et digitaliques. En revanche ils ont mis en évidence un lien entre la protection contre les leucémies et la concentration de digitalique dans le sang (44).

Les preuves, *in vitro*, du potentiel anti-cancéreux des glycosides cardiaques sont claires, puisque l'ouabaïne, la digoxine et la digitoxine, utilisés à des concentrations non apoptotiques, présentent des effets cytostatiques sur les cellules de la lignée MDA-MB-435s en activant la voie EGFR/Src/ERK ainsi que p21cip1 (11). Une autre étude a montré un effet antiprolifératif de ces substances sur des cellules cancéreuses, mais inducteur de prolifération sur des cellules saines. Cette différence d'activité biologique peut être liée à la différence du nombre des récepteurs membranaires présents dans les cellules saines et les cellules cancéreuses. En effet, plus le nombre de récepteurs NKAα1 est élevé, plus le signal découlant de la fixation des glycosides cardiaques sera amplifié, exacerbant ainsi le message de prolifération déjà présent dans les cellules tumorales qui couplé à un changement du pH de ces cellules, peut inhiber leur croissance et induire l'apoptose (175). Les glycosides cardiaques peuvent aussi induire la mort cellulaire, c'est notamment le cas du cardénolide UNBS1450 sur les cellules hématopoïétiques (182), d'autres cardénolides (*i.e.* la digitoxine, la digoxine, l'oléandrine) ou bufadiénolides (*i.e.* la cinobufagine et la proscillaridine A) dans différents types de cancer. Généralement l'apoptose est induite par la voie mitochondriale avec des effets sur Mcl-1 et Bcl-xL (176). Cependant l'apoptose n'est pas la seule mort induite par les glycosides cardiaques, puisque l'autophagie peut aussi être induite, comme dans le cas de glioblastomes traités par l'UNBS1450 (183), de l'oléandrine dans des cellules pancréatiques (173) et de la bufaline dans les cellules HT-29 et Caco-2 (Tableau 5)(184).

Tableau 5 : Liste des glycosides cardiaques testés

Liste des glycosides cardiaques utilisés dans cette étude en comparaison à l'UNBS1450 et à l'ouabaïne.

Nom	Formule chimique
Digitoxine	
Digoxine	
Proscillaridine A	
Cinobufagine	

6.4.5. Liens entre les glycosides cardiaques et la famille Bcl-2

Une étude récente a démontré que la digitoxine et un de ses dérivés avaient la particularité d'induire la dégradation de Mcl-1 par la voie du protéasome après une phosphorylation de la protéine par la GSK-3-β et induire l'anoïkis, encore une fois la mort cellulaire est induite sans effet sur l'expression de la protéine Bcl-2 (185). L'importance de Mcl-1 dans la mort cellulaire est encore démontrée dans deux autres publications, qui mettent en lumière le rôle de cette protéine dans la mort cellulaire, d'une part en montrant que l'ouabaïne et la bufadiénolide sont capables de diminuer l'expression de cette protéine et plus modestement diminuer l'expression de Bcl-xL, mais pas seulement, ils démontrent en plus que ces composés de part leur effet sur Mcl-1 permettent de sensibiliser les cellules à l'induction de la mort cellulaire par TRAIL (142, 186). L'ouabaïne diminue l'expression Bcl-xL a des effets sur l'expression de Bcl-2 à de fortes concentrations (micromolaire) dans les neuroblastomes et induit la mort cellulaire (187). Une étude sur les bufadiénolides, plus particulièrement la bufotaline, utilisée en prétraitement, a montré un pouvoir de sensibilisation pour TRAIL et le TNF-α en induisant la mort cellulaire et en montrant une forte diminution de Mcl-1, Bcl-xL et d'autres protéines de survie cellulaire (Bcl-2 n'a pas été étudiée) (188).

L'ensemble des publications, étudiant les effets des glycosides cardiaques, montre que ces composés diminuent l'expression de Mcl-1 avec des effets plus modestes sur l'expression de Bcl-xL et Bcl-2. De plus, il semblerait que plus particulièrement Mcl-1 soit une protéine centrale dans les effets de sensibilisation, notamment pour TRAIL.

Mcl-1 est une protéine responsable de la résistance des cellules cancéreuses. Nous avons montré que de nombreuses publications scientifiques étudiant les effets des glycosides cardiaques sur l'expression des protéines de la famille Bcl-2 ont observé un fort effet de ces composés sur l'expression de Mcl-1 en plus de leur pouvoir sensibilisateur lors de co-traitement avec d'autres composés anti-cancéreux. Il sera intéressant d'étudier les actions des glycosides cardiaques, plus précisément, sur la régulation de Mcl-1, afin de mieux connaître leurs effets anti-cancéreux.

OBJECTIFS

Les glycosides cardiaques sont des molécules utilisées couramment en clinique dans le cadre du traitement de pathologies cardiaques. Leur mécanisme d'action consiste à se lier et à inhiber la pompe sodium-potassium ou Na^+-K^+-ATPase. Récemment, un potentiel anti-cancéreux a été attribué à cette classe de médicaments. Leurs effets sur la prolifération et la viabilité de différentes cellules cancéreuses ont été mis en évidence dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. La fixation et l'inhibition de la pompe Na^+-K^+-ATPase ont été proposées comme étant les deux événements les plus précoces expliquant les activités biologiques engendrées. Cette hypothèse est confortée par le fait que ces pompes sont souvent surexprimées par différents types de cancers. Cependant bien que les glycosides cardiaques soient connus pour cibler la pompe Na^+-K^+-ATPase et que leur utilisation en clinique pour le traitement des maladies cardiaques soit validée, leur utilisation en cancérologie reste encore floue. En effet, les effets pléiotropiques de ces composés ont tendance à rendre difficile l'identification de leur première cible et par conséquent la compréhension de leur effets anti-cancéreux.

Des études antérieures menées au laboratoire ont mis en évidence l'effet cytostatique et cytotoxique de l'UNBS1450, un dérivé hémisynthétique de la 2''-oxovoruscharine extraite de la plante *Calotropis procera* qui induit la mort des cellules leucémiques par apoptose. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que Mcl-1 est une cible précoce dans la lignée leucémique U937. Cette propriété est commune à d'autres cardénolides telles l'ouabaïne (186), la digoxine (185, 189) et les bufadienolides (142).

Notre hypothèse de travail est que la protéine Mcl-1 est une cible précoce et ubiquitaire des glycosides cardiaques dans différentes types de cancers (*i.e.* leucémies, poumon, prostate, sein, neuroblastome) et que la modulation de cette protéine peut-être un indicateur du potentiel anti-cancéreux de cette classe de composés.

Afin de valider notre hypothèse, nous utiliserons différentes stratégies pour étudier le rôle de Mcl-1 dans l'effet anti-cancéreux des glycosides cardiaques.

1. Tout d'abord nous analyserons les effets de l'UNBS1450 sur l'expression des protéines de la famille Bcl-2 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses en utilisant différentes approches.
    a. Dans un premier temps, nous analyserons la cinétique d'expression des protéines de la famille Bcl-2 par Western blot dans les lignées U937 et Jurkat afin de montrer que Mcl-1 est une cible précoce de l'UNBS1450. Ensuite, de manière à vérifier si cet effet de l'UNBS1450 sur Mcl-1 est spécifique aux lignées étudiées, nous étudierons l'expression de ces protéines de survie dans différentes lignées cellulaires en issues de plusieurs types de cancers. Finalement, afin de vérifier si l'effet induit par l'UNBS1450 sur les protéines de la famille Bcl-2 ainsi que sur l'apoptose peut être généralisé à d'autres glycosides cardiaques, nous évaluerons l'effet des cardénolides et des bufadiénolides sur la lignée hématopoïétique U937.
    b. Nous analyserons ensuite le niveau de régulation de l'expression de Mcl-1 par l'UNBS1450, notamment en étudiant l'effet de ce cardénolide sur l'ARN messager et la stabilité protéique de Mcl-1, ainsi qu'en évaluant les effets de divers inhibiteurs de la régulation protéique, tels que le cycloheximide et le MG132 sur l'expression de Mcl-1, en co-traitement avec l'UNBS1450. Nous étudierons également l'implication des caspases et de NOXA dans cette régulation.
    c. Finalement, nous tenterons d'élucider l'implication de Mcl-1 dans les effets observés sur la mort cellulaire. Cette étude sera réalisée sur la lignée de neuroblastome SH-SY5Y, connue pour être un bon modèle pour les transfections et dans laquelle l'UNBS1450 induit les mêmes modulations de l'apoptose et de Mcl-1, que celles observées dans la lignée U937. Nous analyserons l'effet de l'UNBS1450 sur ces lignées transfectées avec un plasmide de surexpression de Mcl-1 ainsi qu'un plasmide de Mcl-1 mutée (Mcl-1 KR) non-ubiquitinable ; nous vérifierons ensuite l'habilité d'un inhibiteur du protéasome à protéger ces cellules de la mort cellulaire par apoptose induite par l'UNBS1450.

2. Une seconde partie de ce travail sera consacrée à l'étude des voies de signalisation impliquées en amont des effets induits sur l'apoptose et sur Mcl-1 par les glycosides cardiaques dans la lignée U937.
   a. Nous déterminerons si les effets anti-cancéreux observés sont liés aux mécanismes ioniques ou non-ioniques de la pompe Na^+/K^+-ATPase. Nous étudierons d'une part, les flux de calcium lors de traitements avec l'UNBS1450, ainsi que les effets de chélateurs de calcium sur l'apoptose et la réduction de Mcl-1 induite par l'UNBS1450.
   b. D'autre part, nous définirons l'implication de kinases dans l'activité du signalosome en aval de la pompe Na^+/K^+-ATPase, en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces kinases et en observant leurs effets sur l'apoptose et la réduction de l'expression de Mcl-1 induite par l'UNBS1450.
   c. Finalement, nous étudierons les effets de dépléteurs du cholestérol membranaire tels que, le méthyl-β-cyclodextrine, afin de savoir si les effets observés sont liés ou non à des interactions de la pompe Na^+/K^+-ATPase avec d'autres protéines de signalisation (*i.e.* Src).

3. Dans une dernière partie de cette thèse, nous proposons de généraliser les effets de l'UNBS1450 également sur les cellules du cancer du sein puisque les glycosides cardiaques sont connus pour leur potentiel anti-cancéreux dans les cancers du sein (125). Nous étudierons l'action de l'UNBS1450 sur le cycle cellulaire ainsi que ses effets cytotoxiques sur les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231.

En résumé, ce projet vise à identifier la cible cellulaire des glycosides cardiaques et de comprendre les voies de signalisation intracellulaires activées, ainsi que le rôle de Mcl-1 dans l'apoptose induite par ces composés.

MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

Les cellules U937 ont été établies à partir de cellules malignes prélevées dans l'épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytique diffus en 1974. Ces cellules présentent les propriétés et caractéristiques des monocytes (190).

Les cellules Jurkat sont issues d'une lignée immortalisée de lymphocytes T prélevées chez un enfant de 14 ans atteint d'une leucémie lymphocytaire aigüe. Cette lignée a la particularité de produire une grande quantité d'interleukine-2 (191).

Les cellules K562 sont des lymphoblastes originaires d'une leucémie myéloïde chronique développée par une femme de 53ans. Cette lignée a été immortalisée (192).

Les cellules Raji sont des lymphocytes B d'un lymphome de Burkitt développé chez un enfant de 11 ans.

Les cellules PC3 sont des cellules provenant de métastases osseuses d'un cancer de la prostate chez un patient de 62 ans (193).

Les cellules DU145 (194), tout comme les PC3, sont des cellules issues de métastases d'un cancer de la prostate, prélevées au niveau du cerveau et non pas des os, comme les PC3. Elles ne sont pas sensibles aux hormones.

Les cellules SH-SY5Y (195), SK-N-AS (196) et BE(2)-M17 sont issues de neuroblastomes isolés respectivement chez une fille de 4 ans, une fille de 6 ans et chez un garçon de 2 ans. Ces trois lignées sont des cellules épithéliales.

Les cellules MDA-MB-231 correspondent une lignée épithéliale d'adénocarcinome du sein, prélevée chez une femme de 51 ans. Elles expriment les récepteurs EGF and TGFβ (197) .

Les cellules MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) (198), sont des cellules de cancer du sein canalaire invasif métastasé de type luminal. Elles ont été prélevées dans un épanchement pleural chez une patiente de 69 ans.

Issue des MCF-7, la lignée VCREMS, est une lignée MCF-7 exposée à l'agent mutagène éthyl-méthane-sulphonate et sélectionnée avec la vincristine (199).

Les cellules sont cultivées, dans un milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute,* Lonza, Verviers, Belgique) ou DMEM (*Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*) supplémentés avec 1% de pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF), et placées dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO_2.

2. Traitements

L'UNBS1450 nous a été fourni par Unibioscreen (Bruxelles, Belgique). Ce composé est solubilisé dans du diméthyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) à une concentration stock de 5 mM, tout comme les autres glycosides cardiaques : digoxine, digitoxine, proscillaridine A et cinobufagine (Sigma-Aldrich). Seule l'ouabaïne (Sigma-Aldrich) est préparée dans de l'eau distillée stérile à une concentration stock de 10 mM.

Ces substances étant sensibles à la lumière, toutes les expériences sont réalisées à l'obscurité. Concernant les traitements, les cellules en suspension ont été ensemencées à une concentration de 300 000 cellules/mL, puis laissées au repos pendant une heure, avant le traitement avec les glycosides cardiaques. Les cellules adhérentes ont été ensemencées à 300 000 cellules/mL, le jour précédent le traitement.

3. Evaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du kit « CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit » (Promega, Leiden, Pays-Bas), qui mesure l'activité métabolique d'une cellule par sa fabrication d'ATP. La luciférase aura une activité proportionnelle à la présence d'ATP dans la cellule et transformera la « Beetle Luciferin » en « Oxyluciferin ». Le principe de ce système consiste à mesurer le taux de cellules viables en quantifiant l'ATP qui sert d'indicateur d'activité métabolique. Le tampon de réaction est ajouté aux cellules traitées ou non (volume/volume), puis l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 10 min sous agitation dans l'obscurité. Le signal luminescent, mesuré grâce à un luminomètre (Orion Microplate Luminometer, Berthold, Pforzheim, Germany), est proportionnel au taux d'ATP présent dans le milieu et est représentatif du taux de cellules viables. Les cellules non traitées servent de contrôle positif et représentent 100% de viabilité, permettant ainsi de définir l'IC_{50} (Inhibition concentration) de chaque produit testé sur chacun de nos modèles cellulaires.

La viabilité cellulaire a également été évaluée par la méthode d'exclusion au bleu Trypan. En raison de la rupture de leur membrane plasmique, les cellules mortes sont perméables au bleu Trypan et apparaissent bleues. A l'inverse, les cellules vivantes, dont la membrane est intègre, ne l'incorporent pas et restent incolores. Les cellules sont diluées avec cette solution de marquage (dilution 1:1), puis les cellules vivantes sont comptées sous microscope grâce à une cellule de Malassez.

Une autre approche consiste à utiliser du « XTT », qui permet de doser de l'activité métabolique de la cellule, basée sur le principe qu'une cellule vivante présentant une activité métabolique mitochondriale peut ainsi réduire le sel de tétrazolium XTT en un composé orange qui présente une longueur d'onde d'absorbance à 450 nm. L'expérience est réalisée en plaque de 96 puits, les cellules en phase exponentielle de croissance (200 000 cellules/mL) placées dans 100 µL de milieu sont incubées avec 50 µL de XTT, et la plaque est lue au spectrophotomètre (SpectraMax Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) à 450 nm.

4. Evaluation de l'apoptose

4.1. Analyse de la morphologie nucléaire

Un aliquot de cellules (un million de cellules) traitées ou non est prélevé et marqué pendant quinze minutes à 37°C avec une solution de Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), un agent intercalant qui colore spécifiquement le noyau des cellules et permet de distinguer la morphologie des noyaux par microscopie à fluorescence (Leica, Luxembourg, Luxembourg). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 350 et 450 nm. Les cellules sont considérées comme apoptotiques si elles présentent une chromatine sous forme de « mottes » ou une fragmentation nucléaire. Les cellules vivantes présentent un noyau rond avec une chromatine homogène (200). La fraction de cellules présentant une morphologie nucléaire apoptotique a été déterminée par comptage d'au moins 300 cellules dans trois champs optiques indépendants. Les images ont été analysées par ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html).

4.2. Analyse de l'activation des caspases

De manière à prouver l'induction de l'apoptose, l'activité des caspases a été analysée à l'aide du kit « Caspase-3/7 Glo Assay » (Promega), qui permet, par luminométrie, de déterminer le moment d'activation des Caspase-3/7. La réaction se passe en deux étapes : le clivage de la molécule (le premier substrat) par les caspases permet de libérer l'aminoluciférine (le second substrat), qui est luminescente et émet de la lumière après avoir été transformée par la luciférase.

Suite au mélange du tampon et du substrat présents dans le kit, 25 µL d'échantillon sont prélevés et ajoutés au même volume de mélange dans une plaque 96 puits. Après 15 minutes

d’incubation, la plaque est lue au luminomètre.

5. Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux

5.1. Principe

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des cellules, des particules ou encore des molécules, une à une, à grande vitesse à travers un faisceau laser qui va exciter les fluorochromes utilisés pour les marquages. La lumière réémise par diffusion ou fluorescence est utilisée pour classer et caractériser les cellules, elle sera captée par différents capteurs :

- SSC (*Side SCatter*) : permet de déterminer la granularité des cellules
- FSC (*Forward SCatter*) : donnera la taille des cellules
- FL1 : capteur qui lira les fluorescences émises dans le vert (530/540 nm)
- FL2 : capteur qui lira les fluorescences émises dans l’orange (575/625 nm)
- FL3 : capteur qui lira les fluorescences émises dans le rouge (613/720 nm)

Afin de mesurer un paramètre spécifique de la cellule, des fluorochromes sont utilisés, comme le MitoTracker Red® (MTR) qui permet d’estimer le potentiel membranaire de la mitochondrie ainsi que le statut apoptotique ou non apoptotique de la cellule, ou l’iodure de propidium qui permet d’analyser le cycle cellulaire.

5.2. Etude du potentiel mitochondrial

Pour chaque échantillon, un million de cellules traitées ou non sont prélevées, puis incubées avec du MitoTracker Red® (ThermoFisher Scientific, Gent, Belgique) pendant 15 minutes à une concentration finale de 50 nM. Les échantillons sont ensuite analysés au cytomètre en flux (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). L’interprétation des résultats de cytométrie a été réalisée grâce au logiciel d’analyse FlowJo® (Flowjo, Oregon, USA). Les résultats permettent de distinguer deux pics, celui de faible intensité qui traduit la perte du potentiel mitochondrial des cellules en apoptose et celui de forte intensité correspondant aux cellules vivantes.

5.3. Etude du cycle cellulaire

Pour chaque échantillon, un million de cellules traitées ou non sont prélevées, et marquées à l’iodure de propidium (1 µg/mL) supplémenté avec 10 µg/mL d’ARNase. Les échantillons

sont ensuite analysés au cytomètre en flux (BD FACScalibur). L'interprétation des résultats de cytométrie a été réalisée grâce au logiciel d'analyse FlowJo®. Les résultats permettent de distinguer plusieurs phases en fonction de la quantité de fluorescence émise. Plus la fluorescence sera élevée, plus la quantité en ADN sera grande. La première zone nommée « SubG1 » est visible lorsque l'apoptose est induite car l'ADN est fragmenté, dans les cellules. La second zone « G1/G0 » correspond à la phase du cycle qui contient n ADN. La troisième zone est la phase « S », au cours de laquelle l'ADN commence à être répliqué et sa quantité augmente, La 4ième zone correspond à la phase « G2/M » pendant laquelle l'ADN est répliqué à une quantité 2n et la cinquième zone plus rare est la zone « SupG2 » qui correspond aux cellules ayant plus de 2n chromosomes. Cette étude nous permet de distinguer quelle phase du cycle cellulaire est modulée par un traitement donné.

5.4. Marquage MPM-2

Le marquage avec l'anticorps MPM-2 (*Mitotic Protein Monoclonal-2*) permet de mettre en évidence les processus de phosphorylation spécifiques lors de la mitose. En effet l'anticorps se fixe sur les domaines FTPLQ et LTPLK phosphorylés, présents dans une grande partie des protéines impliquées durant la phase de mitose. Les cellules traitées ou non sont récupérées par centrifugation (350 g, 5 minutes, 4 °C), sont lavées avec du PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM) puis fixées avec de l'éthanol 70%. Après fixation les cellules sont resuspendues avec 500 µL de PBS supplémenté avec 0,25% de Triton X-100, puis placées sur glace pendant 15 minutes. Les culots de cellules sont resuspendus et marqués pendant une heure à température ambiante avec 100 µL d'anticorps anti-MPM-2 dilué au $1/100^e$ dans du PBS1X supplémenté avec 1% de sérum de veau fœtal. Après lavage les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 100 µL d'un anticorps secondaire Alexafluor 488 spécifique (Invitrogen, Tournai, Belgique) dilué au 1/100e, dans une solution de PBS1X supplémenté de 1% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont ensuite marquées dans une solution de PBS 1X contenant de l'iodure de propidium (1 µg/mL) + ARNase 10 µg/mL, puis analysées en biparamétre : cycle cellulaire (FL3-H) et MPM-2 (FL1-H). L'interprétation des résultats de cytométrie a été réalisée grâce au logiciel d'analyse FlowJo®.

6. Etude de l'expression de gènes par PCR en temps réel

6.1. Extraction de l'ARNm

Trois millions de cellules sont lysées avec 500 µL de TRIzol® (Invitrogen). Après homogénéisation, 200 µl de 1-bromo-3-chloropropane est ajouté pour 1 mL de Trizol®, le tout est homogénéisé au vortex puis incubé à température ambiante pendant trois minutes avant d'être centrifugé à 14 000 g pendant quinze minutes à 4°C. La phase aqueuse, contenant les ARNm, est ensuite récupérée. L'ARNm est ensuite précipité grâce à l'ajout de 500 µl d'isopropanol pour 1 ml de TRIzol®. Le tout est homogénéisé par vortex puis placé 30 minutes à -20°C. Les échantillons sont centrifugés pendant dix minutes à 14 000 g à 4°C. Les culots sont conservés, séchés et lavés avec de l'éthanol 75%. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 8 600 g à 4°C. Les culots obtenus sont conservés, puis placés à 40 °C pendant 3 minutes afin d'éliminer toute trace du solvant, et enfin sont resuspendus dans 60 µl d'eau Ultra pure. Le dosage et la vérification de la pureté des échantillons sont effectués à l'aide d'un spectromètre Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Gent, Belgique).

6.2. PCR en temps réel

6.2.1. Transcription inverse

Cette étape permet de former de l'ADNc complémentaire à partir d'ARNm totaux grâce au kit "SuperScript First-Strand" (Synthesis System, Invitrogen, Fisher Scientific).

Un premier mix de dNTP et "Random hexamère" est ajouté à 2ug d'ARN, puis incubé 5 minutes à 65 °C et 5 minutes sur glace. Pour l'étape de transcription inverse un second mix (10 µl), contenant du DTT (DL-Dithiothreitol), $MgCl_2$, 10XRT buffer, RNase Out et Superscript III (Synthesis System, Invitrogen), est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 10 minutes à 25 °C, 50 minutes à 50 °C et 5 minutes à 80 °C. Enfin, 1 µl de RNase H est ajouté et les échantillons sont incubés pendant 20 minutes à 37 °C afin d'éliminer les résidus d'ARN.

6.2.2. Amplification par PCR en temps réel

Cette expérience permet de visualiser en temps réel la quantité d'ADNc amplifiée. Aux échantillons déposés dans une plaque 96 puits est ajouté un mix contenant les deux amorces du gène (sens et anti-sens) (Tableau 6), de l'eau Ultra pure et le SYBR® Green PCR Master Mix (Power SYBR® Green PCR Master mix 1X, Applied Biosystems, Halle, Belgium). La PCR (*Polymerase chain reaction*) en temps réel (Applied Biosystem, Lennik, Belgium) se fait en quatre cycles : dénaturation, hybridation, élongation et terminaison.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Gène étudié	Amorce sens	Amorce anti-sens
Actine-β	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
c-Myc	TGCTCCATGAGGAGACACC	TCGATTTCTTCCTCATCTTCTTG
Mcl-1	CCAAGGCATGCTTCGGAAA	TCACAATCCTGCCCCAGTTT
NOXA	TTTCTGCCGGAAGTTCAGTT	GAGATGCCTGGGAAGAAGG

7. Transfections

Le plasmide sera intégré aux cellules par l'intermédiaire d'un polymère. Les cellules U937, Jurkat et SH-SY5Y sont transfectées avec différents plasmides ampicilline résistants. Le premier (WT Mcl-1), fourni par le Pr. Carine Michiels de l'université de Namur (Belgique), permet une expression constitutive de Mcl-1 (201). Le second plasmide utilisé dans notre étude correspond à une protéine Mcl-1 mutée sur ses zones d'ubiquitination (Mcl-1 KR) ; les lysines 5, 40, 136, 194, et 197 ont été remplacées par des arginines. Ce second plasmide nous a été offert par le Pr. Gregory J. Gores du Collège de Médecine « Mayo Clinic » du Minnesota, USA (202).

Avant de pouvoir transfecter les cellules, les plasmides ont été amplifiés en utilisant des bactéries E.coli compétentes.

7.1. Amplification

Le plasmide est réceptionné sur papier buvard, et remis en suspension dans de l'eau ultrapure, avant d'être inséré dans des bactéries compétentes Escherichia coli One Shot® TOP10 (Invitrogen) par choc thermique. Les bactéries sont ensuite mises en culture pendant une nuit dans des boites de pétri sur un milieu Luria-Bertani (LB) agar contenant de l'ampicilline. Une colonie (correspondant à des bactéries ayant intégré le plasmide avec le gène de résistance à l'ampicilline ainsi que celui de la protéine d'intérêt) est mise en pré-culture dans 5 mL de milieu de culture LB Broth à 37 °C pendant 8 h. Au terme de la pré-culture, 250 µL des 5 mL sont ajoutés dans 250 mL de milieu LB Broth liquide. L'ensemble est incubé sous agitation à 37 °C pendant une nuit. pour permettre la multiplication des bactéries. Ces dernières sont ensuite centrifugées, lysées et le plasmide est récupéré grâce au kit d'extraction « Nucleobond PC 500, Macherey-Nagel » (MN, Hoerd, France). Le plasmide extrait est dosé grâce au Nanodrop, puis conservé à -20 °C.

7.2. Analyse de la pureté

Afin de contrôler la qualité du plasmide et si la séquence du gène a la même taille que le gène connu. Les plasmides sont digérés avec des enzymes de restrictions afin de séparer les séquences de Mcl-1 du reste du plasmide selon le protocole fourni par Promega. La carte du plasmide vecteur est utilisée de manière à connaître quels sont les sites de restrictions ayant servi à ouvrir le plasmide et insérer la séquence de la protéine d'intérêt. Dans notre cas, le plasmide vecteur est le plasmide pCMV-HA. Les enzymes de restriction, EcoR1 et *Bgl*III, (Promega), permettent le retrait de la séquence Mcl-1 insérée en coupant avant et après la séquence, sachant que le nombre de sites de coupure à l'intérieur du gène Mcl-1 est faible (une pour chaque enzyme). Le protocole fourni permet de déterminer la solution tampon adaptée à chaque enzyme utilisée (Ici *Eco*R1 ainsi que *Bgl*III) afin que l'efficacité pour les deux enzymes en solution soit comprise entre 75 et 100%. Le plasmide est ensuite digéré avec les enzymes. Les fragments issus de cette digestion sont mis à migrer sur gel d'agarose 1%, dans lequel est ajouté du bromure d'éthidium (BET), un intercalant de l'ADN, permettant de détecter ce dernier grâce au « Molecular Imager® Gel DoxTM XR » (BioRad, Hercules, Californie, USA) piloté par le logiciel Quantity One® (BioRad) et de comparer les tailles des fragments obtenus avec les tailles connues de la séquence d'ADN de Mcl-1 décrites dans la littérature sachant que la séquence insérée dans le plasmide correspond uniquement à la région traduite de Mcl-1.

7.3. Transfection

Les cellules sont transfectées avec le kit jetPRIME (Polyplus, Illkirch, France). Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 200 000 cellules/mL pour les lignées U937 et Jurkat et de 300 000 cellules pour puits pour la lignée SH-SY5Y. Vingt-quatre heures après ensemencement un mélange, préalablement incubé 10 minutes, contenant le plasmide (2 µg de plasmide pour U937 et Jurkat ou 3 µg pour la lignée SH-SY5Y), la solution tampon (200 µL) ainsi que le réactif contenant les polymères pour la transfection (4 µL), est ajouté aux puits contenant 2 mL de milieu ainsi que les cellules au gouttes par gouttes. Après 16 h d'incubation (pour les lignées cellulaires U937 and Jurkat) ou 24 h (pour la lignées SH-SY5Y), les cellules sont remises en culture dans une plaque 6 puits dans un milieu de culture, ne contenant pas le mélange de transfection, puis sont traitées ou non.

8. Western Blot

8.1. Principe

Le Western Blot est une technique qui permet de déterminer le niveau d'expression d'une protéine. Cette technique permet de séparer les différentes protéines selon leur poids moléculaire par électrophorèse en appliquant un champ électrique à un gel de polyacrylamide contenant du SDS (*Sodium Dodécyl Sulfate*), un agent dénaturant. Il s'agit alors de SDS-PAGE (*SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

8.2. Approche technique

Les protéines sont extraites à partir de dix millions de cellules prélevées dans chaque échantillon. Les cellules adhérentes sont détachées du fond des flasques à l'aide d'un scrapeur. Les cellules sont lavées au PBS 1X et centrifugées à 300 g pendant cinq minutes. A partir de ces culots, l'extraction des protéines totales est effectuée au moyen d'un mix contenant du M-PER® (*Mammalian Protein Extraction Reagent* ; Perbio, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) (solution hypertonique) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Ces échantillons sont agités pendant 15 minutes au vortex à 4°C, puis centrifugés à 15 000g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines totales est ensuite récupéré et stocké à -80 °C. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford, une méthode

colorimétrique basée sur le changement de couleur du Bleu de Coomassie lorsqu'il se lie à des acides aminés.

Un volume contenant 20 µg ou 40 µg de protéines (selon les protéines étudiées) est dilué au demi avec un tampon de chargement composé de β-mercaptoéthanol, de glycérol, de SDS et de bleu de bromophénol. Le β-mercaptoéthanol permet de dénaturer les structures secondaires des protéines, le glycérol facilite le dépôt des protéines en augmentant leur densité, et le bleu de bromophénol permet de suivre l'évolution de la migration pendant l'électrophorèse. Les protéines sont dénaturées par chauffage pendant 5 minutes à 100 °C puis refroidies rapidement à 4 °C. Elles sont ensuite déposées dans le gel de concentration dans lequel elle migrent à 200 Volt pendant 45 minutes dans du tampon d'électrophorèse 1X.

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinyldène fluoride (PVDF), préalablement activée dans du méthanol pendant 30 secondes et rincée à l'eau distillée. Les gels sont mis au contact des membranes. L'ensemble est placé pendant 40 minutes dans une cuve sous tension (100 Volt) contenant du tampon de transfert 1X afin de permettre le transfert des protéines du gel vers la membrane, Chaque membrane est ensuite saturée à température ambiante dans du PBS-Tween 1X contenant 5% de lait ou de BSA, puis incubée avec l'anticorps primaire, dilué dans du PBS-Tween 1X contenant 5% de lait ou 5% de BSA, qui se fixera à la protéine cible. Les membranes sont lavées à 3 reprises avec du PBS-Tween 1X pendant 10 minutes pour éliminer les anticorps fixés de manière aspécifique. L'anticorps secondaire, qui cible les anticorps primaires, est ensuite ajouté. Après trois lavages avec du PBS-tween 1X, le substrat ECL (*enhanced chemiluminescent*) de la peroxydase de l'anticorps secondaire (kit ECL, GE Healthcare) est déposé sur la membrane. Le produit émet une luminescence qui sera captée et enregistrée sous format image par le système ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare). Les conditions utilisées pour les anticorps sont spécifiées dans le Tableau 7.

.

Tableau 7 : Anticorps utilisés pour le Western blot

Anticorps	Références	Saturation	Dilution anticorps primaire	Dilution anticorps secondaire	Origine
Actine β	Sigma	Lait 5%-PBS-T,	1/20000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/20000 Lait 5%-PBS-T	Souris
Bcl-2	Calbiochem	Lait 5%-PBS-T	1/2000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/5000 Lait 5%-PBS-T	Souris
Bcl-xL	BD Pharmingen	Lait 5%-PBS-T	1/1000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/4000 Lait 5%-PBS-T	Lapin
Caspase-3	Santa Cruz	Lait 5%-PBS-T	1/1000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/4000 Lait 5%-PBS-T	Souris
Caspase-9	Cell Signaling	Lait 5%-PBS-T	1/1000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/5000 Lait 5%-PBS-T	Lapin
C-Myc	BD Pharmingen	Lait 5%-PBS-T	1/250 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/1000 Lait 5%-PBS-T	Souris
Cycline D1	Cell Signaling	Lait 5%-PBS-T	1/1000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/4000 Lait 5%-PBS-T	Souris
Cycline B1	Cell Signaling	Lait 5%-PBS-T	1/1000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/2000 Lait 5%-PBS-T	Lapin
Mcl-1	Cell Signaling	BSA 5%-PBS-T	1/1000 BSA 5%-PBS-T, toute une nuit	1/4000 Lait 5%-PBS-T	Lapin
PCNA	Santa cruz	Lait 5%-PBS-T	1/10000 Lait 5%-PBS-T, toute une nuit	1/10000 Lait 5%-PBS-T	Lapin
Anti-souris	Santa Cruz				
Anti-lapin	Santa Cruz		Anticorps Secondaires		
Anti-souris (pour Bcl-2)	BD Pharmingen				

9. Autres traitements

9.1. Inhibition de la synthèse protéique

Afin d'estimer si un composé affecte la stabilité protéique, un inhibiteur de la traduction, le cycloheximide (10 µg/ml, CHX, Sigma-Aldrich), est utilisé afin d'éviter le turn-over habituel des cellules. Ce traitement permet d'étudier l'expression de la protéine en bloquant sa resynthèse. Cette approche permet d'estimer le temps de demi-vie d'une protéine dans la cellule, lors d'un traitement avec le composé d'intérêt ou non. Les cellules sont traitées pendant 6 h avec l'UNBS1450 (temps nécessaire à la diminution de Mcl-1) puis traitées avec le CHX, pour estimer la vitesse de dégradation de la protéine en fonction des traitements pendant les deux heures suivants le traitement. Les cellules sont prélevées toutes les 30 minutes et le niveau d'expression des protéines est évalué par Western blot.

9.2. Inhibition du protéasome

Dans le but de déterminer l'implication du protéasome dans la dégradation des protéines, l'activité de ce dernier a été inhibée par co-traitement avec 5 µM de l'inhibiteur MG132 (Millipore Calbiochem, Billerica, USA) qui bloque l'effet du protéasome. La concentration effective du MG132 a été déterminée à l'aide du kit « Cell-Based Proteasome Glo Assay » (Promega), qui permet de mesurer indépendamment l'activité « caspase-like », « trypsin-like » et « chemotrypsin-like ». Les cellules U937 ont été traitées pendant 6 h avec l'UNBS1450 (durée nécessaire à la diminution de Mcl-1) puis avec du MG132, pour analyser, par Western blot, l'expression de Mcl-1 pendant les 4 h suivantes, par récupération des culots cellulaires toutes les deux heures. Quant aux cellules SH-SY5Y, elles ont été traitées pendant 10 h avec l'UNBS1450, puis 4 h avec le MG132.

9.3. Inhibition des caspases

Afin de déterminer l'importance des caspases dans divers mécanismes tels que, l'apoptose ou le clivage de protéines, nous utilisons un inhibiteur de leur activité appelé « caspase-I inhibitor » (Z-VAD FMK; Millipore Calbiochem), utilisé à la concentration de 50 µM pendant une heure en co-traitement. Cet inhibiteur permet de déterminer si la mort cellulaire est dépendante ou non des caspases et si l'activité de ces enzymes se déroule avant ou après la dégradation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

9.4. Inhibition des kinases

Sachant que les protéines de la famille Bcl-2 peuvent-être phosphorylées, mais aussi que la pompe NKA peut activer certaines kinases, des inhibiteurs des kinases ont été utilisés pour comprendre l'implication de ces kinases dans l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450. Dans le Tableau 8 ci-dessous sont répertoriés les inhibiteurs utilisés en prétraitements pendant une heure avant le traitement avec l'UNBS1450.

Tableau 8 : Inhibiteurs de kinases

Nom	Kinase ciblée	Concentration (µM)	Provenance
PD98059	ERK	25	Promega
SB203580	P38	25	Promega
SP60012	JNK	10	Millipore Calbiochem
LY294002	Akt	20	Millipore Calbiochem
U0126	MEK	5	Millipore Calbiochem
PP2	Src family	10/20	Millipore Calbiochem

9.5. Expériences de sensibilisation

Nous avons voulu chercher à savoir si l'UNBS1450 ou l'ouabaïne pouvaient sensibiliser les cellules à un traitement avec TRAIL (Enzo Life Sciences, Antwerpen, Belgium), un inducteur physiologique de l'apoptose déjà utilisé dans la littérature en cotraitement avec la digitoxine (203). Nous avons tout d'abord utilisé l'UNBS1450 et l'ouabaïne à différentes concentrations en cotraitement avec TRAIL 50 ng/mL sur les cellules U937 en phase exponentielle. Puis nous avons inversé et utilisé des concentrations non-apoptotiques d'UNBS1450 et d'ouabaïne, avec différentes concentrations de TRAIL. Dans les deux cas nous avons étudié l'induction de l'apoptose par observation de la morphologie nucléaire.

10. Analyse du calcium intracellulaire

10.1. Flux de calcium

Afin de mesurer les flux de calcium, les cellules traitées ou non ont été marquées avec le « Fluo-4 AM » (ThermoFisher Scientific), une molécule excitable à 488 nm qui devient fluorescente en se fixant sur le calcium cytosolique. La thapsigargine (Sigma-Aldrich), un inhibiteur de la pompe SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase), est utilisée comme contrôle positif, afin d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, et suspendues dans une solution de HBSS (*Hank's buffered salt solution*) (0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na2HPO4, 0.1g glucose, 0.44 mM KH2PO4, 1.3 mM CaCl2, 1.0 mM MgSO4 4.2 mM NaHCO3), puis marquées avec le Fluo-4 AM (1µM) pendant 40 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées, resuspendues dans du tampon HBSS et incubées à nouveau à l'obscurité pendant 20 minutes, puis analysées par cytométrie (FL1) de manière à déterminer le niveau de calcium présent dans une cellule avant et après un traitement avec les composés à tester.

10.2. Chélateurs de calcium

Afin de déterminer l'importance du calcium, des chélateurs de calcium ont été utilisés pour inhiber les effets intra et extracellulaires de l'UNBS1450. Les cellules ont été traitées soit avec un chélateur extracellulaire, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma-Aldrich), soit avec un chélateur intracellulaire BAPTA-AM, un acide (BAPTA) couplé à un perméabilisant membranaire AM ester (AcétoxyMethyl ester) (Millipore Calbiochem, Billerica, USA). Pour ce dernier, la méthodologie est différente. En effet les cellules sont incubées pendant 20 minutes avec le BAPTA-AM pour permettre son entrée dans le cytoplasme seulement, où il sera dissocié de la partie AM, qui lui a permis de traverser les membranes. BAPTA sera alors piégé dans la cytoplasme où il chélatera le calcium. Les cellules sont remises en suspension dans un milieu sans BAPTA-AM avant les traitements (204).

11. Modulation du cholestérol intracellulaire

Afin de moduler le cholestérol dans les cellules, nous avons utilisé le dépléteur de cholestérol méthyl-β-cyclodextrine (MBC ; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) qui va forcer les

molécules de cholestérol à quitter la membrane à 1 mM ; le modulateur de cholestérol membranaire, la filipine III (Sigma) utilisée à 1 μg/mL qui se lie au cholestérol et modifie la perméabilité membranaire ; et l'inhibiteur du trafic du cholestérol U18666A (Sigma), qui augmente le cholestérol présent dans le lysosome, utilisé à 10 μg/mL. Ces trois molécules sont utilisées en prétraitement pendant une heure.

12. Puces à ADN

Les cellules ont été traitées, en phase exponentielle, avec l'UNBS1450 pendant 3 h, 6 h et 9 h. L'ARN total a été extrait par TRIzol (Invitrogen) et le lavé par RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). La quantification a été faite par Nanodrop. L'intégrité des ARN a été vérifiée par « Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Belgium, Diegem) ». Les ARNm sont retrotranscripts en ADNc et marqués avec Cy3 ou Cy5 pour chaque échantillons traités ou non, puis ils sont mélangés ensemble et mis en contact de la puce à ADN contenant les sondes pour chaque gène. La puce à ADN utilisée est « Agilent 4112F Whole Human Genome Oligo microarrays (Agilent Technologies, Belgium, Diegem) ». Les puces ont été scannées avec Axon 4100A microarray scanner (Sunnyvale, CA, USA) et les données numérisées avec Axon GenePix Pro.

Les gènes ont été étudiés par BioConductor, package LIMMA (205) dans l'environnement R. Pour le contrôle qualité, les points ont été sélectionnés par rapport à deux marqueurs : « Flag » qui détermine l'existence du point et le ratio signal/bruit. Le prétraitement inclus le retrait du bruit de fond (« normexp »), et la normalisation intra et inter-puce par « Aquantile ». L'association entre les noms de gènes et les sondes est effectuée grâce à « Entrez Gene ID », les gènes significatifs entre le contrôle et le traitements sont désignés avec un fold change supérieur à 1,3 et $p<0,05$. Les gènes sont ensuite analysés par groupe avec Cytoscape (206).

13. Analyses statistiques

Pour la plupart des tests statistiques, nous avons utilisé soit le test ANOVA 1, lorsque seul un facteur variait, soit le test ANOVA 2 lorsque deux facteurs variaient, au cours de l'expérience. Selon les expériences à analyser, nous avons utilisé des test *post-hoc* différents, précisé dans les légendes des figures. Les calculs ont été réalisés grâce au logiciel GraphpPad Prisme (Ritme, Paris, France). Le seuil de significativité choisi est de $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***), $p<0,0001$ (****).

RESULTATS

1. Les glycosides cardiaques ciblent Mcl-1

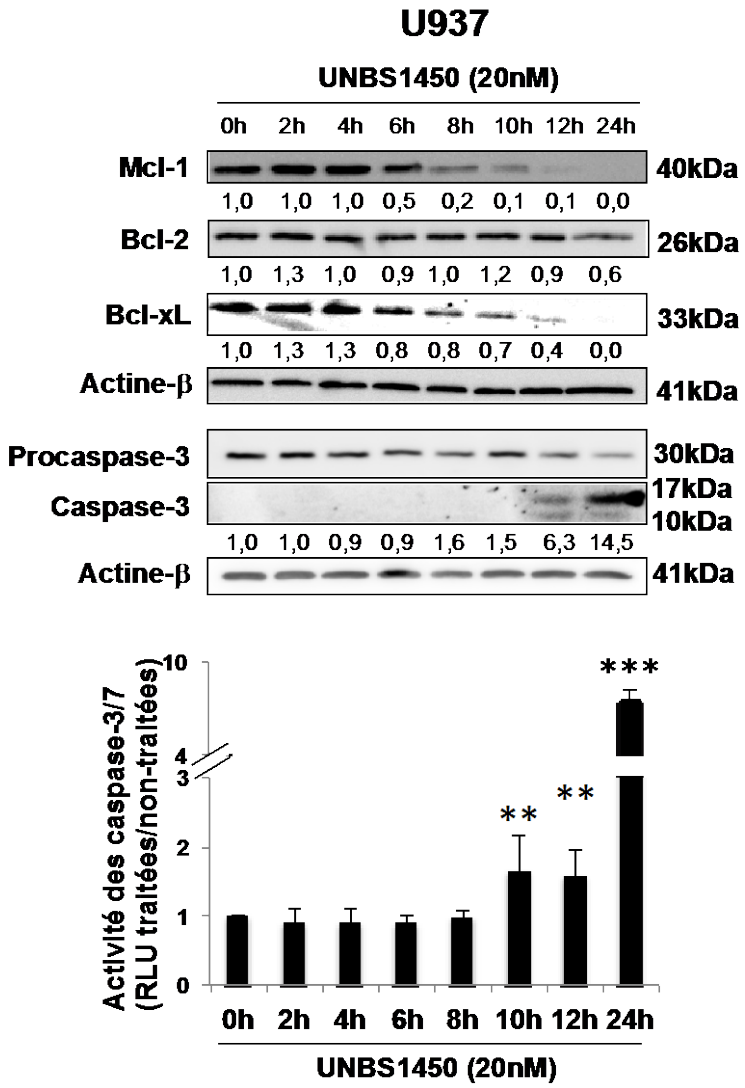
1.1. Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques

1.1.1. La dégradation de Mcl-1 est précocement et ubiquitairement induite par l'UNBS1450 dans des lignées cancéreuses

L'UNBS1450 a montré un pouvoir apoptotique sur les lignées cellulaires leucémiques. Notre but consiste à savoir à quel moment l'UNBS1450 induit la dégradation des protéines de la famille Bcl-2. Ainsi le niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques, Mcl-1, Bcl-xL et Bcl-2, a été analysées par Western Blot après 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24 h de traitement avec 20 nM d'UNBS1450 dans les cellules U937 (Figure 14A) et Jurkat (Figure 14B). A partir de 6 h de traitement, sur des cellules U937, les résultats montrent une forte diminution de l'expression de Mcl-1, suivie par une baisse plus modérée de Bcl-xL à partir de 8 h. En revanche, Bcl-2 ne diminue pas significativement dans la lignée U937. La caspase-3 est clivée dans cette même lignée à partir de 12 h. Ces résultats corrèlent avec les travaux publiés par Junker *et al.* (127). Une cinétique semblable, mais plus tardive est observée après traitement des cellules Jurkat (Mcl-1 diminue après 12 h, et au-delà de 24 h pour Bcl-xL et pour induire le clivage de la caspase-3). Cette première approche montre que l'UNBS1450 cible de façon précoce Mcl-1 dans les deux lignées cancéreuses hématopoïétiques. Cet effet de l'UNBS1450 sera vérifié dans d'autres lignées cellulaires, en suspension et adhérentes.

La prochaine étape a consisté à déterminer si Mcl-1 est une cible ubiquitaire. Nous avons étendu notre analyse à d'autres lignées cancéreuses humaines, hétérogènes de par leur origine (différents types de cancers) et leur niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les lignées hématopoïétiques expriment pour la plupart Mcl-1 et Bcl-xL, sauf la lignée U937 qui exprime de façon plus forte Bcl-2 alors que cette même protéine est peu exprimée dans la lignée K562. Les lignées cancéreuses du poumon ou de la prostate, quant à elles, expriment fortement Bcl-xL alors que dans les lignées de neuroblastome, Mcl-1 est la protéine la plus fortement exprimée parmi les trois protéines étudiées. Les lignées de cancer du sein, MCF-7 et MDA-MB-231 expriment faiblement Mcl-1 et Bcl-2, et seule la lignée MDA-MB-231 exprime fortement Bcl-xL (Figure 15).

A



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante).

B

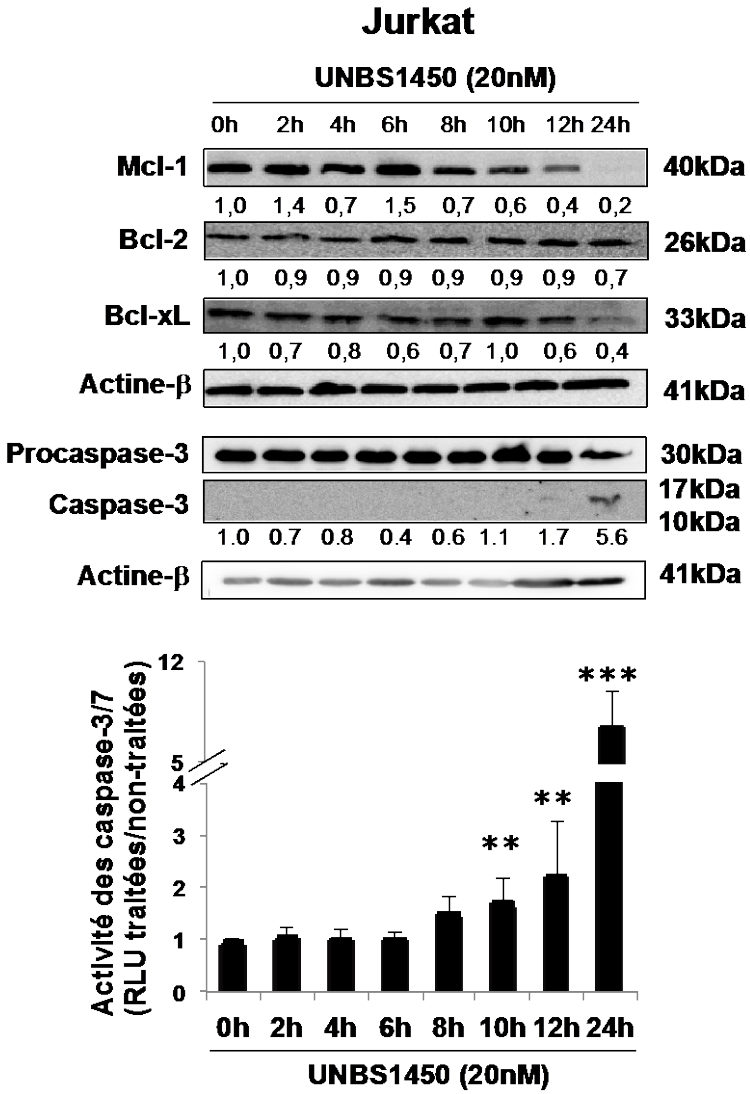


Figure 14 : Mcl-1 est une cible précoce de l'UNBS1450 dans les lignées cancéreuses hématopoïétiques U937 et Jurkat

*Les cellules U937 (A) et Jurkat (B) ont été ensemencées à 300 000/ml et exposées à 20 nM d'UNBS1450. Les expressions de Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL et le clivage de la pro-caspase-3, sont étudiées par Western Blot aux temps indiqués. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (panel haut). L'expression de ces protéines anti-apoptotiques est quantifiée par rapport à l'actine-β. Les graphiques représentent l'activité des caspases-3 et -7 pour les même temps de traitement avec l'UNBS1450, que ceux analysés par Western blot, dans les lignées Jurkat et U937. Cette activité est définie par le kit Caspase-Glo® 3/7 Assay et normalisée au temps 0. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) (panel bas). ** p : < 0,01 ; *** : p < 0,001 par ANOVA 1 – Sidak, comparé au contrôle. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.*

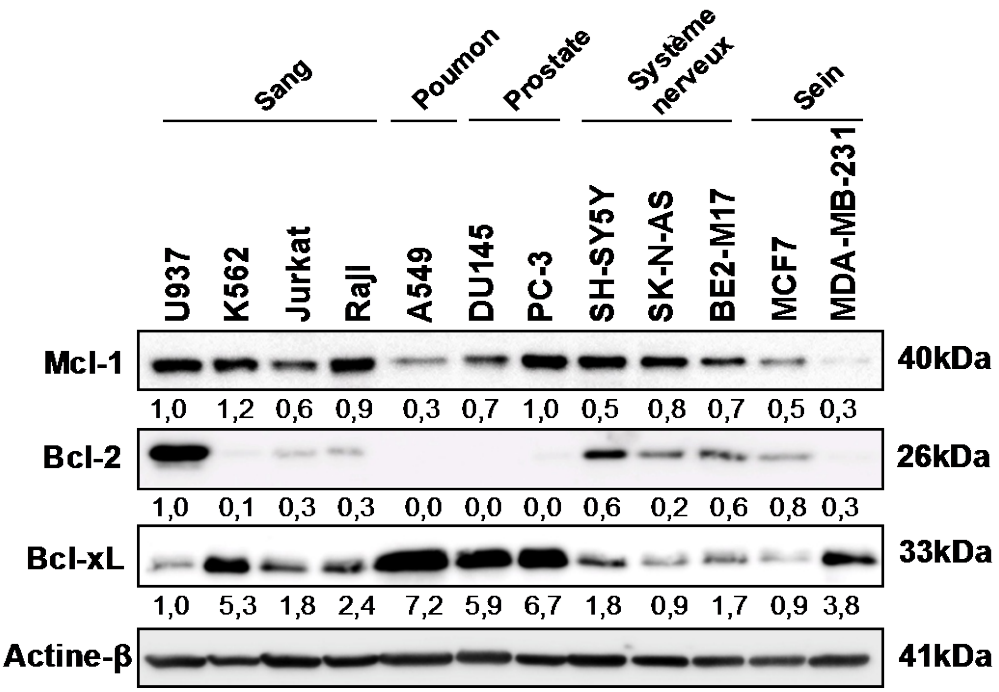


Figure 15 : Expression basale des principales protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans différentes lignées cancéreuses

Les cellules ont été ensemencées et récupérées en phase exponentielle. Les expressions de Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL, sont étudiées par Western Blot. L'expression de ces protéines anti-apoptotiques est quantifiée par rapport à l'Actine-β. L'expression de ces protéines dans la lignée U937 est utilisée comme référence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Afin de connaître la sensibilité de ces différentes lignées cellulaires face à l'UNBS1450, les effets de l'UNBS1450 sur le métabolisme ont été déterminés par l'utilisation du CellTiter-Glo®. L'UNBS1450 est actif dans chaque lignée cellulaire à des concentrations de l'ordre du nanomolaire après 24 h de traitements. Parmi ces lignées, les plus sensibles sont la lignée de neuroblastome SH-SY5Y ainsi que les lignées hématopoïétiques Jurkat et U937 (Tableau 9).

Le traitement à l'UNBS1450, avec des concentrations correspondantes aux IC50, dans toutes les lignées étudiées, montre que ce composé diminue l'expression de Mcl-1 quelque soit la lignée étudiée. Concernant Bcl-xL, sa diminution est propre au contexte cellulaire. Bcl-2 n'est pas ou peu touchée par le traitement (Figure 16). Nous pouvons remarquer que les cellules qui expriment Mcl-1 sont plus sensibles si elles ne surexpriment pas Bcl-xL.

1.1.2. Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques

Afin de savoir si les effets de l'UNBS1450 sont généralisables à d'autres glycosides cardiaques, deux bufadienolides (proscillaridine A et cinobufagine) ainsi que trois autres cardénolides (ouabaïne, digoxine et digitoxine) ont été testés. Dans un premier temps, nous avons testé des gammes de concentrations de 10 à 200 nM afin d'étudier l'induction de l'apoptose par morphologie nucléaire. Tous les composés étudiés induisent l'apoptose à des concentrations de l'ordre du nanomolaire après 24 h de traitement dans les cellules U937, mais avec des sensibilités différentes. En effet, pour une gamme de concentration identique, les cardénolides telles la digoxine induisent l'apoptose à hauteur de 19,67 +/- 2,49%, la digitoxine 47,00 +/- 20,05% et l'ouabaïne 32,00 +/-11,04% à 75 nM, ainsi que les bufadiénolides : cinobufagin 20,33 +/- 1,25% à 75 nM. La proscillaridine A, plus active, induit l'apoptose à hauteur de 27,67 +/- 8,18% à 10 nM.

En parallèle de l'analyse de l'apoptose, l'étude de l'expression des trois protéines anti-apoptotiques (Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL) par Western blot a permis de mettre en évidence que Mcl-1 diminue à des concentrations plus faibles que Bcl-xL, tout comme avec l'UNBS1450 et l'ouabaïne. En effet, lorsque l'apoptose est induite, une diminution de Mcl-1 est observée. Par contre, dans tous les cas, Bcl-2 n'est que peu ou pas touchée. Lors du traitement avec les bufadiénolides, notamment avec la proscillaridine A, nous pouvons observer que Bcl-xL est peu touchée par le traitement malgré une très forte diminution de Mcl-1 et une forte induction de l'apoptose (Figure 17).

Tableau 9 : IC50 de l'UNBS1450 après 24 h de traitement dans différentes lignées cellulaires cancéreuses

Différentes lignées en phase exponentielle de croissance ont été traitées avec différentes concentrations d'UNBS1450. L'effet de cette substance sur l'activité métabolique des cellules a été analysé par CellTiter-Glo® et *les IC50 correspondant à chaque lignée ont été déterminées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- ES (erreur standard).*

Lignée cellulaire	IC50 24h (nM)	Origine
U937	**17,8 ±1,0**	**Sang**
Raji	**40,2 ±3,7**	
K562	**32,7 ±3,1**	
Jurkat	**15,6 ±0,7**	
PC3	**51,0 ±17,0**	**Prostate**
DU145	**21,0 ±3,0**	
A549	**32,0 ±3,0**	**Poumon**
SH-SY5Y	**28,4 ±0,4**	**Système nerveux**
S-K-NAS	**48,7 ±4,9**	
BE2-M17	**25,0 ±2,0**	
MDA-MB-231	**> 100**	**Sein**
MCF7	**> 100**	

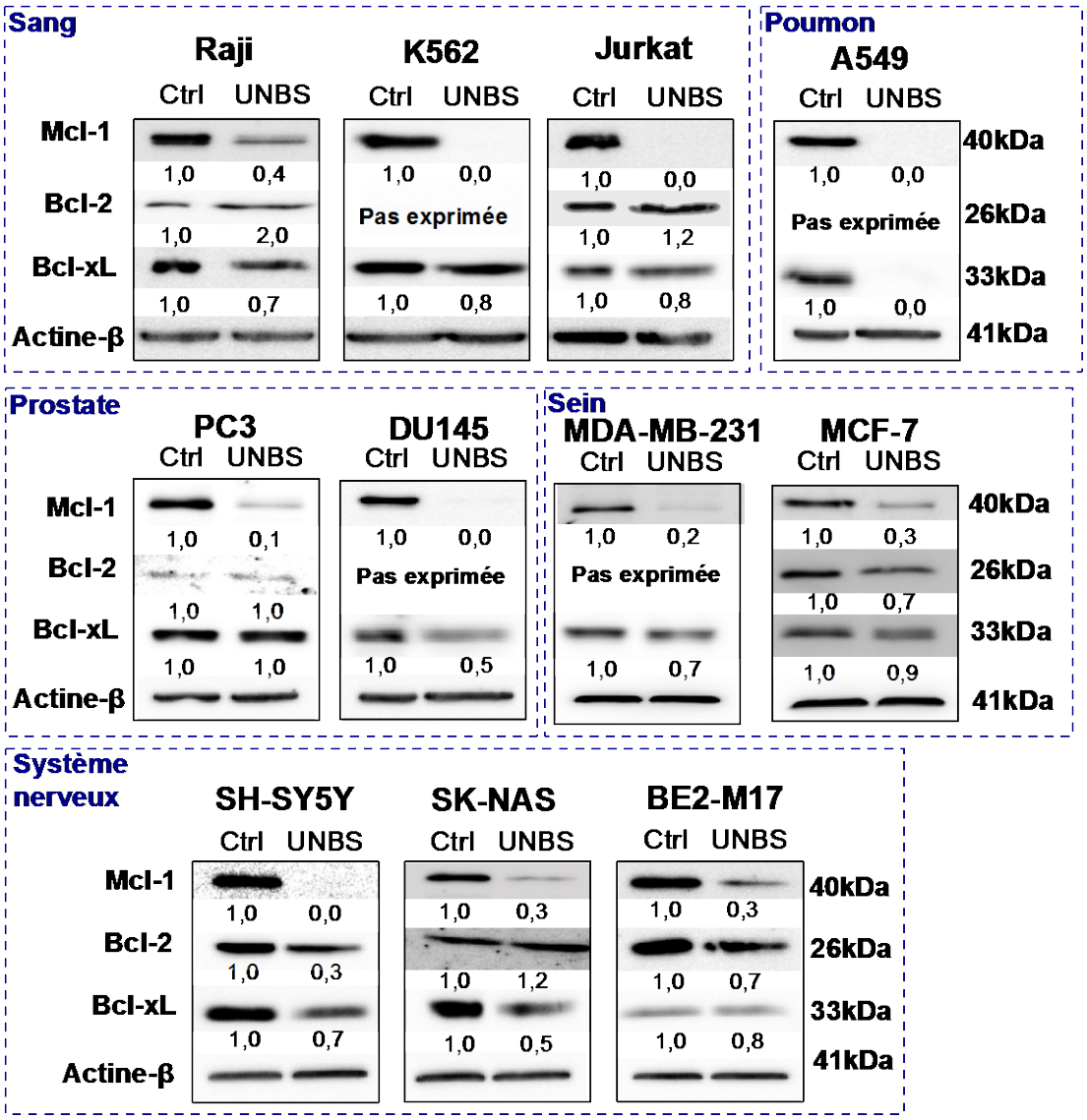


Figure 16 : Effet de l'UNBS1450 sur l'expression de protéines anti-apoptotiques

Les cellules ont été ensemencées et récupérées en phase exponentielle. Les expressions de Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL, sont étudiées par Western Blot. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Ctrl : contrôle (cellules non traitées), UNBS : UNBS1450 (cellules traitées à l'UNBS1450 à des concentrations correspondantes aux IC50, après 24 h).

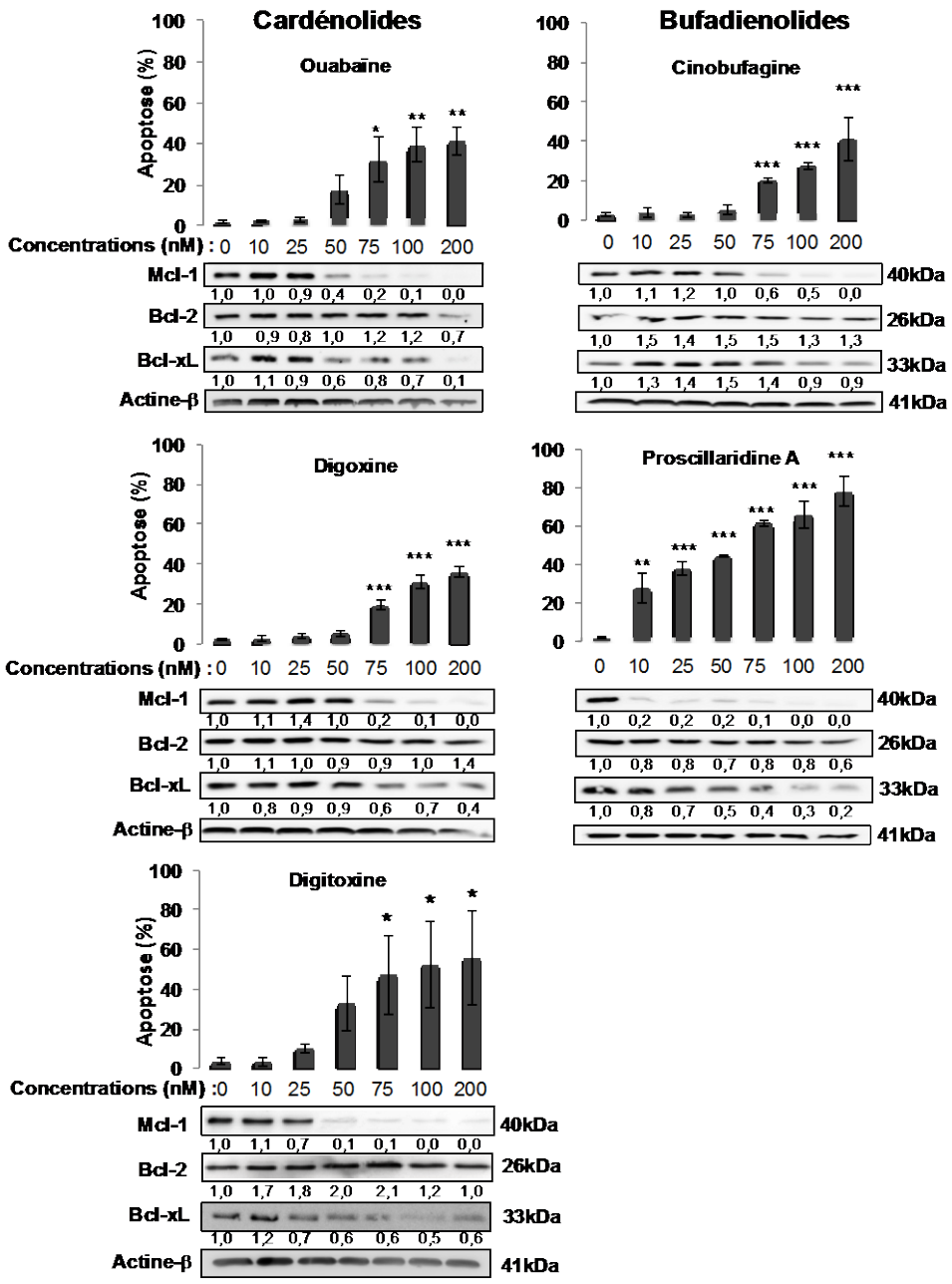


Figure 17 : Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques

*Les cellules U937, ensemencées à 300 000/ml, ont été exposées à différentes concentrations de trois cardénolides (A) et deux bufadienolides (B). L'induction de l'apoptose a été étudiée par suivie de la morphologie nucléaire par microscopie et de l'expression de trois protéines anti-apoptotiques (Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL) par Western blot. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** p : < 0,01 ; *** : p < 0,001 par ANOVA 1 - Sidak, comparé au contrôle.*

1.1.3. Mcl-1 est la première protéine anti-apoptotique affectée par les glycosides cardiaques

Notre objectif suivant était de déterminer si la protéine Mcl-1 est la première protéine affectée par le traitement avec des glycosides cardiaques. La cinétique de dégradation de Mcl-1, Bcl-xL et Bcl-2 a été étudiée pendant 8h pour un traitement à une concentration apoptotique connue pour induire une dégradation significative de Bcl-xL. Dans tous les cas, Mcl-1 apparaît comme la première protéine anti-apoptotique affectée à partir de 6 h de traitement par les cardénolides utilisés à des concentrations apoptotiques telles que, l'ouabaïne (100 nM) et la digoxine (50 nM), ainsi que par les bufadiénolides tels que la proscillaridine A (10 nM) et la cinobufagine (100 nM). Dans certains cas, nous observons une diminution de Bcl-xL. Quant à Bcl-2, une très faible voire inexistante diminution est observable que très faiblement voire pas du tout pendant la durée de traitement étudiée (Figure 18).

Cette partie montre que l'UNBS1450 induit une dégradation de Mcl-1 de façon ubiquitaire dans les lignées cellulaires étudiées, à une concentration de l'ordre du nanomolaire. De plus, Mcl-1 n'est pas seulement une cible de l'UNBS1450, mais de tous les glycosides cardiaques étudiés dans cette étude.

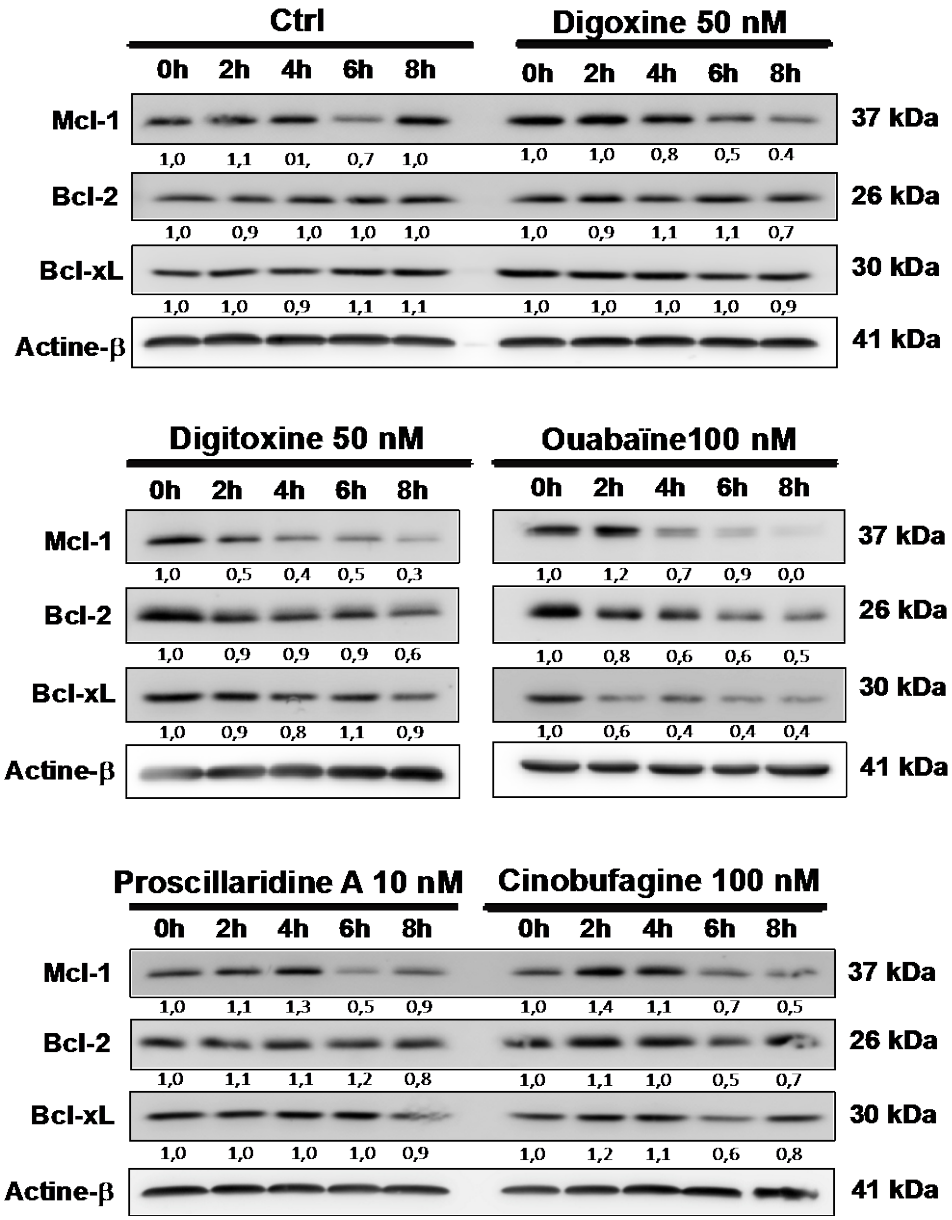


Figure 18 : Cinétique d'étude de l'expression des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 durant un traitement avec différents glycosides cardiaques

Les cellules U937 ont été ensemencées à 300 000/ml et exposées à différents glycosides cardiaques (ouabaïne, digoxine, proscillaridine A, cinobufagine, digitoxine). Les expressions de Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL, sont étudiées par Western Blot aux temps indiqués. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.. L'expression de ces protéines anti-apoptotiques est quantifiée par rapport à l'actine-β.

1.2. Régulation de Mcl-1 lors de traitement avec l'UNBS1450

1.2.1. Les effets de l'UNBS1450 ne sont pas dépendants d'une modulation transcriptionnelle

Afin de déterminer si l'UNBS1450 a un effet sur la transcription d'autres gènes que celui de Mcl-1, une expérience réalisée par puce à ADN a permis d'étudier l'induction des gènes après 3 h, 6 h et 9 h de traitement avec 20 nM d'UNBS1450 dans les lignées U937. La Figure 19A montre qu'il n'y a pas d'induction significative de la transcription d'un gène spécifique au cours des 9 h de traitement. Les parties B, C et D montrent les inductions ou inhibitions de certains gènes, à 3 h, 6 h et 9 h, en fonction de leur rôle dans la cellule. Les effets de l'UNBS1450 apparaissent indépendants de la transcription et se produiraient plutôt au niveau de la régulation des protéines. La **partie E**, nous montre qu'il n'y a pas de régulation des protéines de la famille Bcl-2 au niveau transcriptionnel (Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL) pendant les 9 premières heures du traitement. Cependant, les résultats montrent que l'ARNm de c-Myc semble être régulé négativement par l'UNBS1450.

1.2.2. Etude de la dégradation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450

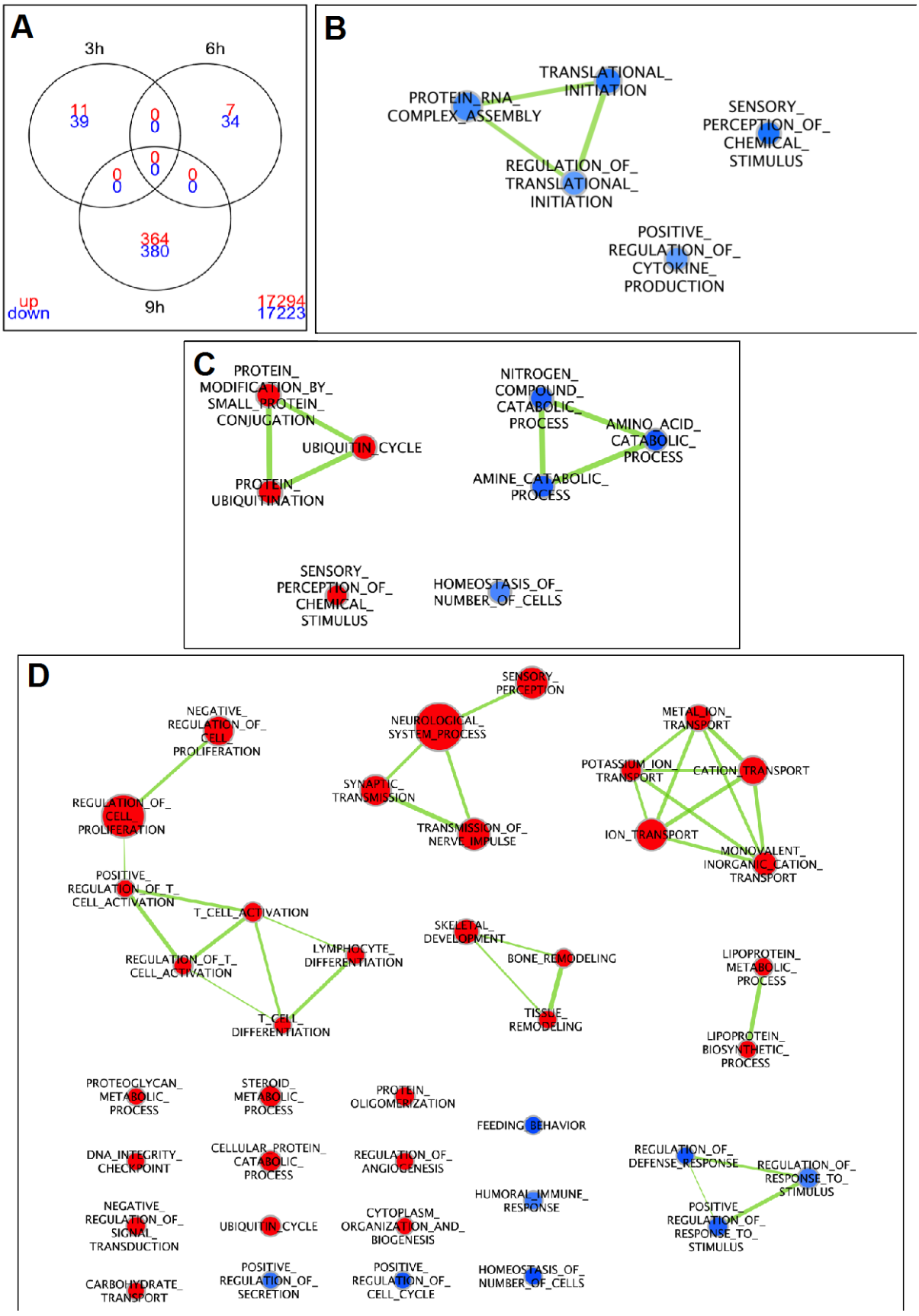
1.2.2.1. L'UNBS1450 n'a pas d'effet sur l' ARNm de Mcl-1

Au vue de la diminution de l'expression de Mcl-1 et Bcl-xL mise en évidence dans nos travaux et dans les précédentes études, notre approche s'est ensuite focalisée sur l'étude de Mcl-1, une des premières protéines régulée par l'UNBS1450 qui semble par ailleurs être la plus affectée par ce traitement. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la diminution de l'expression de Mcl-1 est causée ou non par une diminution de l'expression de l'ARNm de Mcl-1. Son expression a été étudiée par PCR en temps réel dans les cellules U937 à 0 h, 2 h, 4 h, 6 h et 8 h, après un traitement à l'UNBS1450 à 20 nM ou à l'ouabaïne à 100 nM (Figure 20A). Cette analyse ne montre aucune différence significative entre 0 h et 8 h pour les cellules U937 traitées à l'ouabaïne, alors qu'une diminution de l'expression de la protéine Mcl-1 était observée dans les 8 premières heures de traitement. Dans le cas du traitement par l'UNBS1450, nous observons une diminution transitoire de l'expression de l'ARNm de Mcl-1 significative à deux heures de traitement, suivie d'une augmentation non significative par rapport au contrôle.

Cependant, tant pour l'UNBS1450 que pour l'ouabaïne, aucune tendance générale à la diminution de l'expression de l'ARNm de Mcl-1 n'est observée, ce qui suggère que la diminution de l'expression de la protéine n'est pas due à une baisse de la transcription de son gène. Cette observation a été confirmée dans la lignée Jurkat (Figure 20B) ainsi que par puce à ADN. Ces résultats orientent notre analyse vers une étude de la stabilité de la protéine Mcl-1.

1.2.2.2. La diminution de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 intervient au niveau de la protéine

Dans un deuxième temps, la stabilité de Mcl-1 a été étudiée dans les cellules U937 après 6 h de traitement avec l'UNBS1450 20 nM (6 h correspondant au temps minimum requis pour observer une diminution de Mcl-1), suivie d'un co-traitement de deux heures avec le cycloheximide (10 µg/ml CHX), un inhibiteur de la traduction. La stabilité de Mcl-1 étudiée toutes les trente minutes pendant ces deux heures de traitement au CHX met en évidence une diminution plus forte lorsque les cellules sont co-traitées avec l'UNBS1450 et le CHX, que lorsqu'elles sont traitées uniquement avec l'UNBS1450 ou le CHX. La comparaison de la tendance des courbes montre une différence significative entre les traitements au CHX, à l'UNBS1450 et et au CHX+UNBS1450 par rapport au contrôle. Des résultats similaires sont observés en comparant les courbes obtenues pour le contrôle et après traitement au CHX et à l'UNBS1450 par comparaison à celle obtenue suite au co-traitement CHX+UNBS1450. Ces analyses tendent à montrer que l'UNBS1450 a un effet sur la stabilité de la protéine Mcl-1 (Figure 21).



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

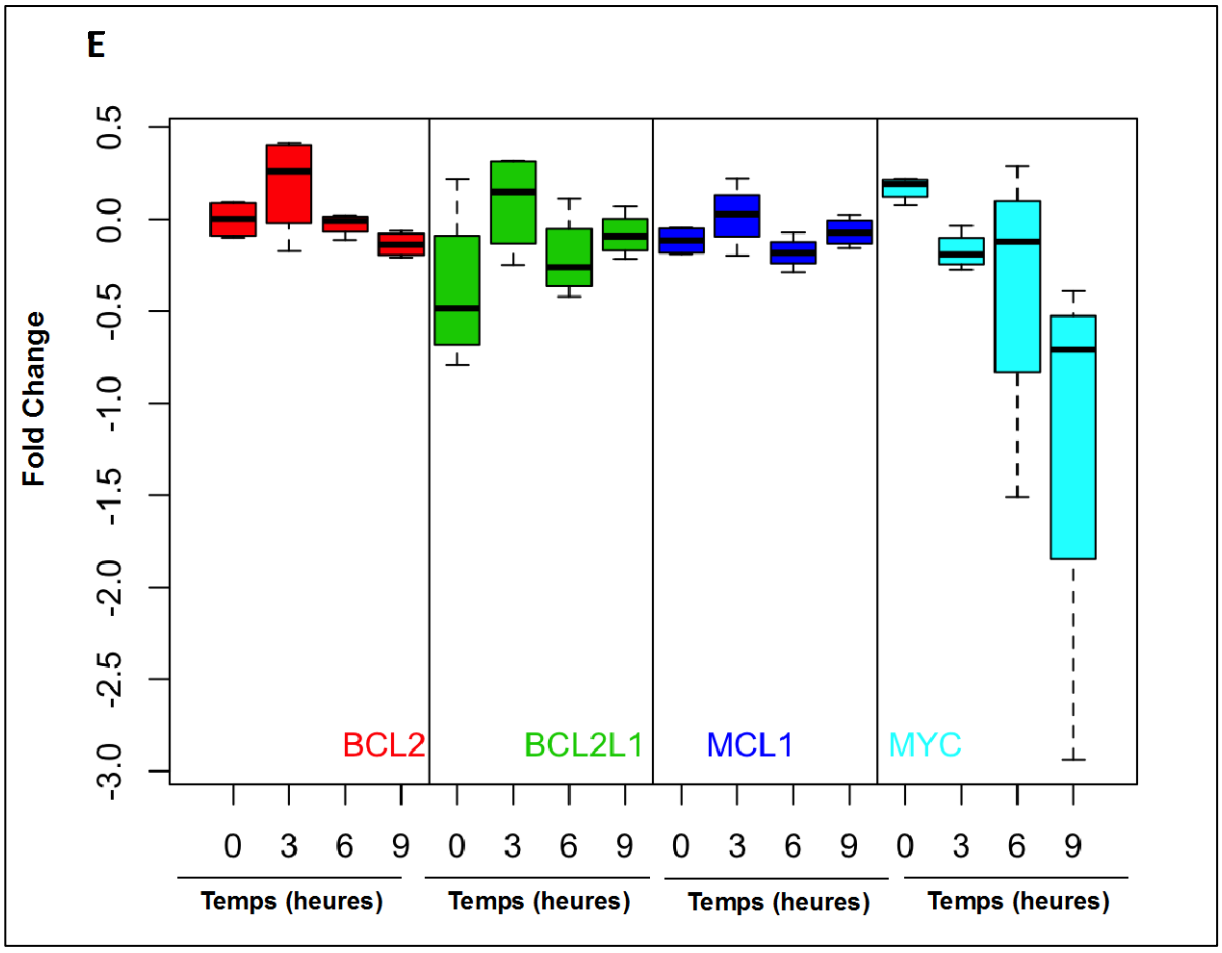
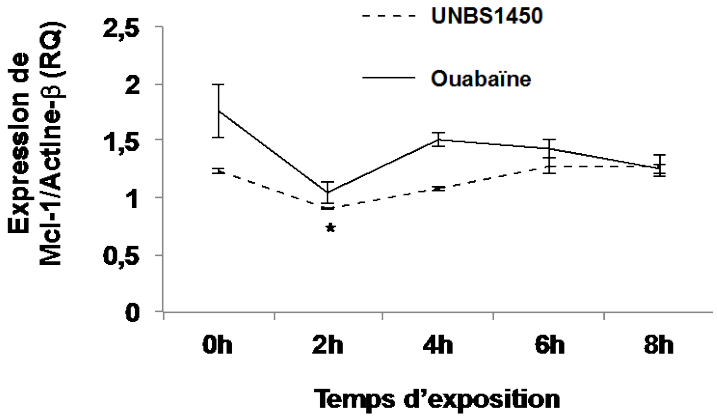


Figure 19 : Analyse par puce à ADN après traitement à l'UNBS1450

A, Diagramme de Venn, montrant l'induction ou non des gènes à chaque temps. B, C et D, représentent l'expression des gènes ordonnés en famille, respectivement à 3, 6 et 9 h de traitement dans la lignée U937, en rouge les augmentations, en bleu les baisses d'expression de l'ARNm. Les liens entres les familles sont représentés par des traits verts Le « Fold change » des protéines Bcl-2, Bcl-xL (BCL2L1), Mcl-1 et c-Myc, est étudié par puce à ADN. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (En rouge : les gènes activés, en bleu : les gènes inhibés).

A



B

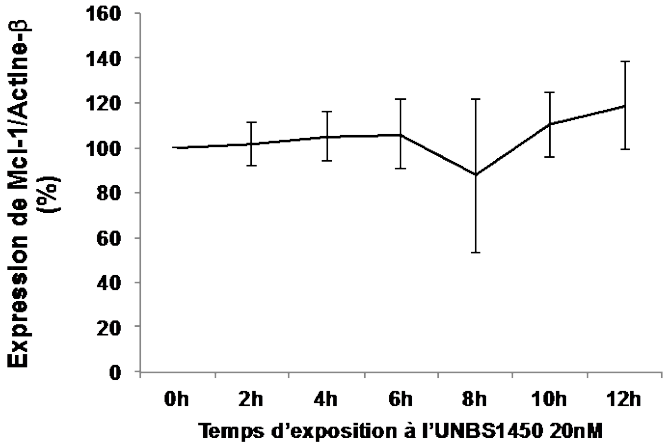


Figure 20 : Expression de l'ARNm de Mcl-1, lors d'un traitement à l'UNBS1450

*Les cellules U937 ont été ensemencées à 300 000/ml et exposées à l'UNBS1450 20 nM ou l'ouabaïne 100 nM (A). Expression de l'ARNm de Mcl-1 dans la lignée Jurkat (B). L'expression de l'ARNm de Mcl-1 est analysée par PCR en temps réel aux temps indiqués. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes. * : p < 0,05 par ANOVA 1 – Sidak comparé au contrôle.*

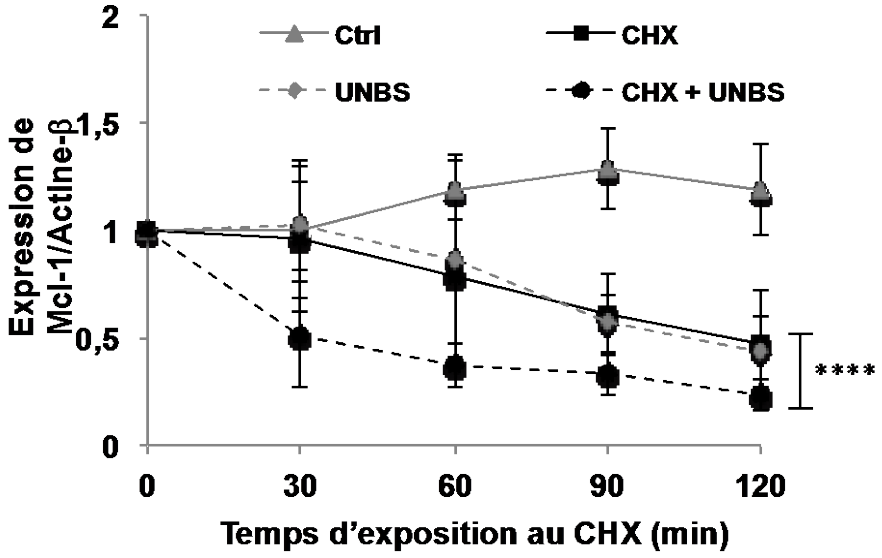


Figure 21 : Stabilité de Mcl-1 après traitement avec l'UNBS1450

*Les cellules U937 ensemencées à 300 000/ml ont été traitées avec 20 nM d'UNBS1450 (UNBS) pendant 6 h puis co-traitées pendant deux heures avec le cycloheximide (CHX). Ici nous représentons l'expression de Mcl-1 durant c'est deux heures de traitement au CHX, analysée par Western Blot et quantifiée par le logiciel « Image J ». Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes, **** : p < 0,0001 par ANOVA 2, test de Tukey.*

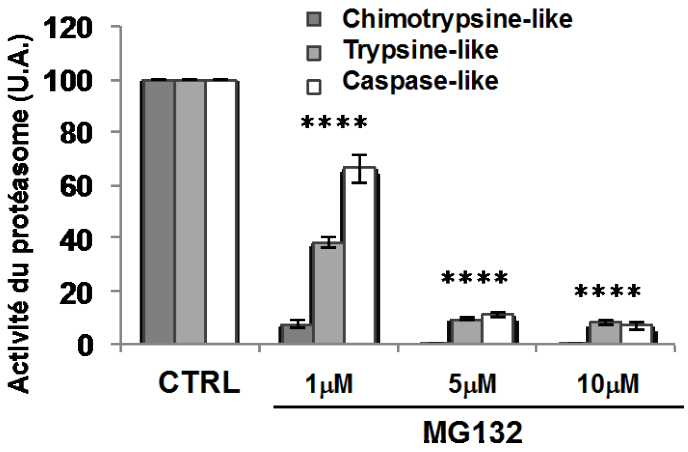
1.2.2.3. La dégradation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 implique le protéasome

Pour déterminer l'implication ou non du protéasome dans la dégradation de Mcl-1, un inhibiteur du protéasome (MG132) a été utilisé en co-traitement avec l'UNBS1450 20 nM (Figure 22). Trois concentrations de MG132 ont été testées de manière à déterminer la plus efficace pour inhiber l'activité du protéasome. Une concentration de 5 µM de MG132 sera retenue pour les expériences ultérieures (Figure 22A). Après 6 h de traitement avec l'UNBS1450 à 20 nM, le MG132 (5 µM) est ajouté pendant 4 h durant lesquelles l'expression de Mcl-1 est étudiée, par Western Blot, toutes les deux heures (Figure 22B). Dans la série contrôle, l'expression de Mcl-1 n'est pas modifiée, alors que dans la série traitée seulement avec le MG132, nous observons une légère augmentation de l'expression de Mcl-1 qui traduit une modulation de la dégradation de Mcl-1 et une augmentation de sa durée de vie. Dans la série traitée à l'UNBS1450, les résultats sont similaires aux résultats précédents, c'est-à-dire que nous observons une diminution de l'expression de Mcl-1 après 6 h de traitement. Lors d'un co-traitement avec l'UNBS1450 et l'inhibiteur de protéasome, le MG132 empêche la diminution de l'expression de Mcl-1. Ces résultats montrent que l'activité inhibitrice de l'UNBS1450 sur Mcl-1, est due en grande partie à sa dégradation par le protéasome qui induit une diminution de sa demi-vie, comme observé lors de l'étude de la stabilité de Mcl-1 (Figure 21).

1.2.2.4. Expression de NOXA

NOXA, une protéine inductible en cas de stress, peut séquestrer et induire la dégradation de Mcl-1, et conduire à l'apoptose (88). Afin de savoir si NOXA joue un rôle dans les effets de l'UNBS1450 sur la modulation précoce de la protéine Mcl-1, nous avons analysé si l'UNBS1450 induit l'expression de cette protéine BH3 (Figure 23). L'expression de l'ARNm de NOXA a été étudiée par PCR en temps réel toutes les deux heures pendant un traitement de 12 h des cellules U937 avec 20 nM d'UNBS1450. Nous avons ensuite étudié l'expression de la protéine NOXA. Les résultats montrent que l'ARNm de NOXA est induit significativement après 10 h de traitement avec l'UNBS1450. Ces résultats sont confirmés par l'étude de l'expression de la protéine NOXA qui augmente également après 10 h de traitement, cependant la diminution de Mcl-1 est induite entre 6 h et 8 h.

A



B

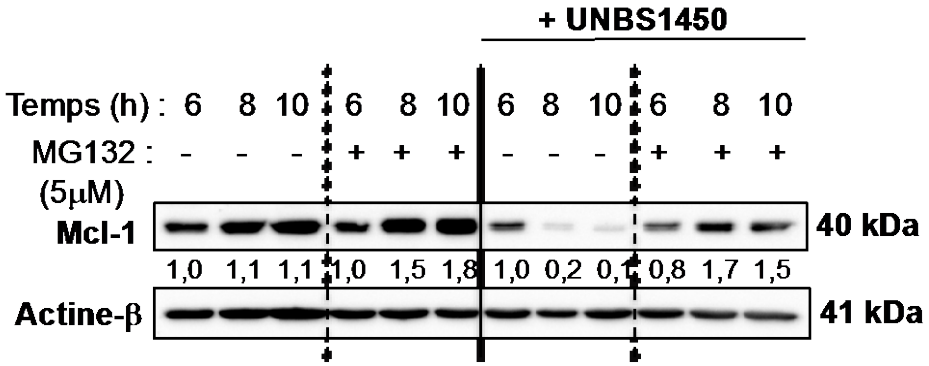


Figure 22 : Expression de Mcl-1 lors du co-traitement UNBS1450 et MG132

*A, Analyse de l'effet inhibiteur de protéasome du composé MG132 utilisé à différentes concentrations. **** : p < 0,0001 par ANOVA 1 – Sidak comparé au contrôle respectif. B, Les cellules U937, ensemencées à 300 000/ml, ont été traitées pendant 6h avec 20 nM d'UNBS1450 puis co-traitées avec 5 µM de MG132 pendant 4h, durant lesquelles l'expression de Mcl-1 a été étudiée, par Western Blot, toutes les deux heures, Le panel présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.*

L'induction de NOXA semble être la conséquence de l'induction de la machinerie apoptotique après une exposition prolongée à l'UNBS1450.

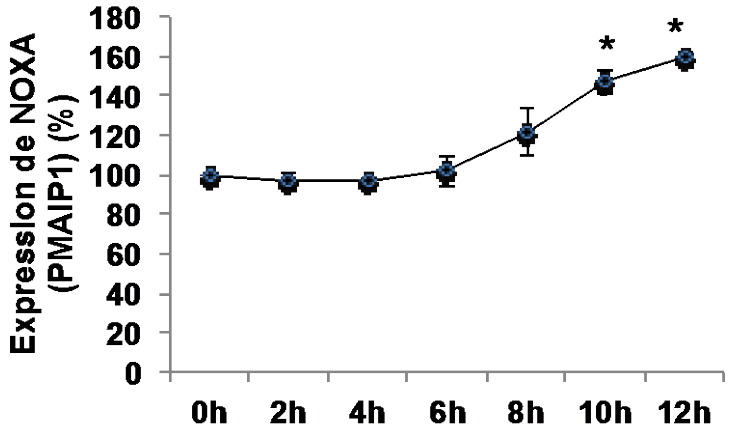
Par conséquent, la diminution précoce de Mcl-1 doit avoir une autre origine, comme par exemple la phosphorylation de la protéine connue pour induire le signal d'ubiquitination et de destruction par le protéasome.

1.2.2.5. Les caspases ne sont pas impliquées dans la dégradation précoce de Mcl-1 et Bcl-xL

Sous certaines conditions, les caspases peuvent cliver les protéines anti-apoptotiques afin d'amplifier un message apoptotique ou simplement initier un message apoptotique. Pour savoir si cette seconde option est impliquée lors du traitement à l'UNBS1450 (20 nM), les cellules U937 ont été co-traitées avec un inhibiteur ubiquitaire des caspases (Zvad, 50 μM) et l'UNBS1450 (20 nM) pendant 12 h, un temps suffisant pour induire le clivage de la pro-caspase-3). La mort des cellules par apoptose et l'expression de Mcl-1 et de Bcl-xL analysées après 12 h de co-traitement montrent que l'apoptose est totalement inhibée, ce qui signifie que l'UNBS1450 a besoin des caspases pour induire la mort des cellules U937 par apoptose. Ces résultats confirment ceux déjà publiés, à savoir que l'apoptose induite par l'UNBS1450 est dépendante des caspases. L'expression de Mcl-1 et de Bcl-xL ne sont pas affectées par un traitement au Zvad et que par conséquent la diminution de ces deux protéines anti-apoptotiques doit s'effectuer avant l'activation des caspases. En conclusion, les caspases ne sont pas impliquées dans la dégradation précoce de ces deux protéines anti-apoptotiques (Figure 24).

Dans cette partie, nous avons démontré que la régulation de Mcl-1 ne s'effectue pas au niveau de sa transcription mais au niveau de la protéine. La dégradation précoce de Mcl-1 implique le protéasome mais pas les caspases, ni NOXA.

A



B

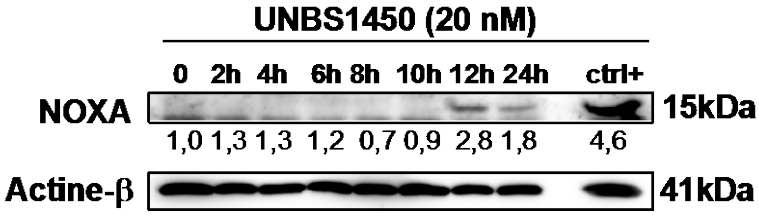


Figure 23 : Expression de NOXA lors d'un traitement à l'UNBS1450

*Les cellules U937 ont été ensemencées à 300 000/ml et exposées à 20nM d'UNBS1450 20. Aux temps indiqués, l'analyse de l'expression l'ARNm de NOXA (PMAIP1) a été réalisée par PCR en temps réel (A) et l'expression de la protéine par Western Blot (B). Les résultats (A) représentent la moyenne +/- ES (erreur standard). * : p < 0,05 par ANOVA 1 – Sidak comparé au contrôle. Les résultats (B) sont représentatifs de trois expériences indépendantes.*

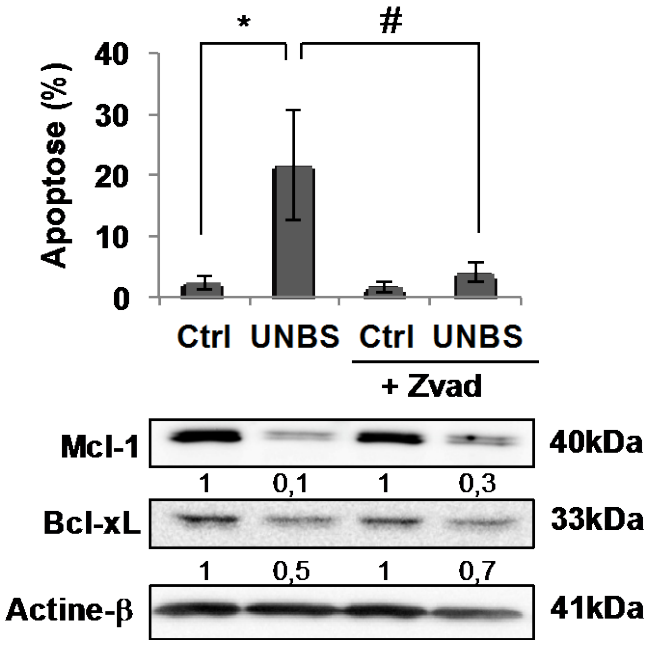


Figure 24 : Implication des caspases dans la mort induite par l'UNBS1450

Les cellules U937, ensemencées à 300 000/ml, ont été co-traitées pendant 12 h avec 20 nM d'UNBS1450 en présence ou non d'un inhibiteur ubiquitaire des caspases (Zvad, 50 µM). L'expression de Mcl-1 et Bcl-xL ont été étudiées par Western blot. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes +/- ES (erreur standard/# : p < 0,05) par ANOVA 1 – Sidak.*

1.3. Importance de Mcl-1 dans les effets induit par l'UNBS1450

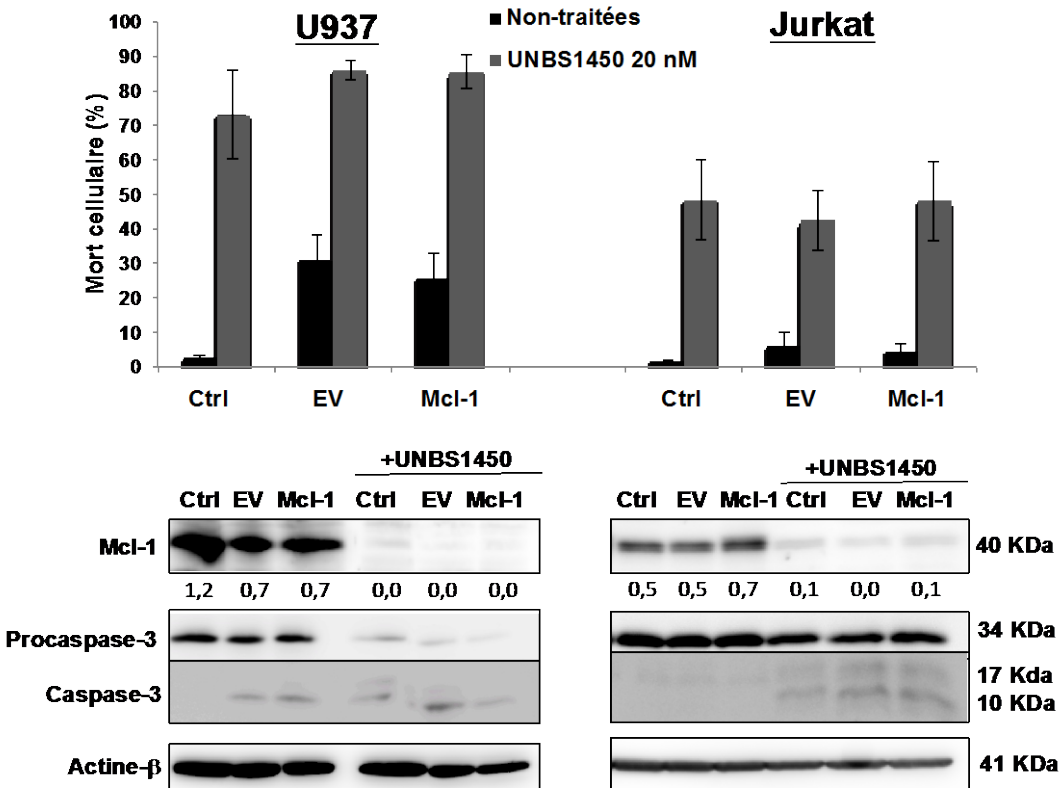
1.3.1. Importance de Mcl-1 dans l'induction de l'apoptose induite par l'UNBS1450

De manière à déterminer si la diminution d'expression de la protéine Mcl-1 suite aux traitements avec les glycosides cardiaques est impliquée dans l'induction de l'apoptose, les cellules ont été d'une part, transfectées avec un plasmide Mcl-1 permettant la surexpression de la forme sauvage de Mcl-1, et d'autre part avec un plasmide Mcl-1 KR comportant une mutation sur ses sites d'ubiquitination, qui empêche sa dégradation par le protéasome, normalement consécutive à son ubiquitination.

Les lignées U937 et Jurkat ne sont pas de bons modèles de transfection. En effet les premières sont difficilement transfectables, et la deuxième lignée ne maintient pas, au cours du temps, la surexpression de Mcl-1 induite par transfection (Figure 25). Cette étude a été par conséquent réalisée sur les cellules SH-SY5Y facilement transfectables et qui réagissent de manière similaire aux cellules U937 et Jurkat au traitement avec l'UNBS1450 (étude en cours au laboratoire LBMCC).

Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec le plasmide permettant de surexprimer Mcl-1 WT (Mcl-1), puis avec le plasmide Mcl-1 KR. Les cellules SH-SY5Y transfectées mais non traitées montrent une bonne efficacité de transfection avec les deux plasmides testés (Figure 26). Ces cellules transfectées ont été traitées à 25 nM d'UNBS1450 pendant 16 h, le délai nécessaire pour obtenir une accumulation suffisante de cellules présentant une morphologie nucléaire apoptotique et un bon niveau de clivage des pro-caspases-3 et -7. L'analyse de l'expression de Mcl-1 et du clivage de la pro-caspase-3 et -7 par Western Blot, ainsi que de l'induction de l'apoptose par étude de la morphologie nucléaire, ont mis en évidence que la surexpression de la protéine Mcl-1, induite par transfection avec le plasmide Mcl-1 WT, est totalement supprimée après un traitement à l'UNBS1450 (Figure 26B) et que de plus, aucune réversion de l'apoptose, ni du clivage des pro-caspase-3 et -7 ne sont observés comparé au contrôle.

A



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

B

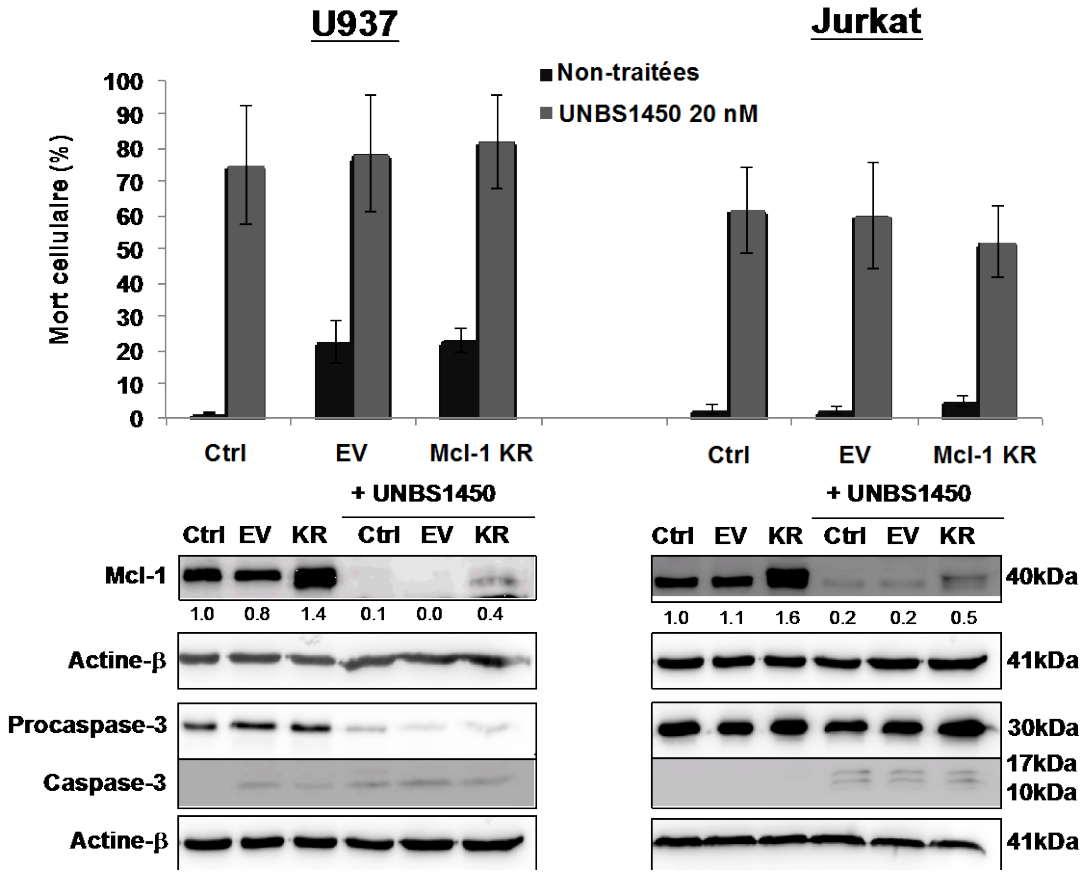


Figure 25 : Mise au point des transfections sur les lignées U937 et Jurkat

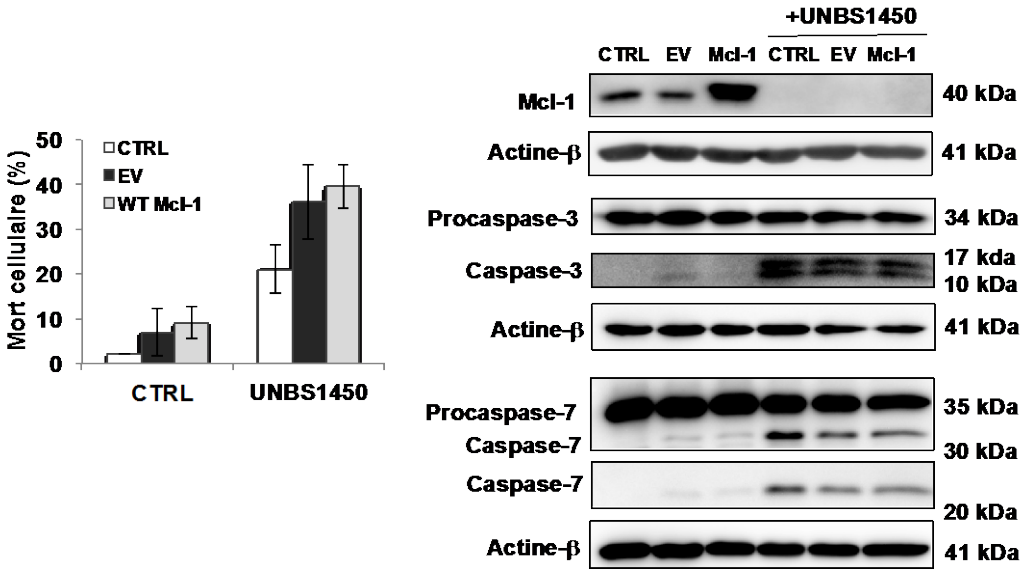
*Les cellules ensemencées à 200 000 cellules/mL (U937 et Jurkat), dans une plaque 6 puits ont été transfectées avec Mcl-1 WT (A) ou MCL-1 KR (B) à l'aide du kit JetPrime pendant 16 h, puis ont été remises en culture dans un milieu en présence d'UNBS1450 pendant 24 h. L'apoptose a été analysée par étude de la morphologie nucléaire et de l'expression des protéines par Western Blot. Les résultats représentent la moyenne de pourcentage d'apoptose +/- ES (erreur standard). ** : p < 0,01 par ANOVA 1 – Sidak. EV : plasmide contrôle.*

Les cellules SH-SY5Y ont ensuite été transfectées avec le plasmide Mcl-1 KR. Dans cette lignée, la présence de Mcl-1 mutée et non ubiquitinable, permet aux cellules de diminuer l'apoptose induite par l'UNBS1450 comme démontré par l'étude de la morphologie nucléaire et de la diminution du clivage des pro-caspases -3 et -7 comparé au contrôle. Par ailleurs, la surexpression de Mcl-1 est préservée malgré le traitement à l'UNBS1450.

Afin d'appuyer les observations précédentes suggérant une implication de l'ubiquitination de Mcl-1 dans le mécanisme d'action de l'UNBS1450, nous avons utilisé une autre stratégie expérimentale utilisant un inhibiteur de protéasome de manière à vérifier l'effet de l'UNBS1450 sur l'expression de Mcl-1 et l'induction de l'apoptose en inhibant la dégradation des protéines. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées pendant 10 h (correspondant au temps minimum requis pour observer une diminution de Mcl-1 dans cette lignée cellulaire) avec 25 nM d'UNBS1450 puis pendant 6 h avec 5 μM d'inhibiteur du protéasome MG132 afin d'étudier l'induction de l'apoptose et le clivage des pro-caspases. Tout comme avec l'utilisation du plasmide Mcl-1 KR, l'inhibition du protéasome inhibe la dégradation de Mcl-1 par l'UNBS1450 et induit une réversion de l'apoptose cependant il n'y a pas de différence entre le clivage des procaspase-3 et -7 dans les cellules transfectées avec le plasmide contre ou Mcl-1 KR (Figure 27).

Ces expériences montrent que dans la lignée SH-SY5Y, il semble exister un lien entre la présence de Mcl-1 et l'induction de l'apoptose induite par l'UNBS1450. Par ailleurs, la dégradation de Mcl-1 par l'UNBS1450 semble impliquer et nécessiter l'induction de l'ubiquitination de Mcl-1 par l'UNBS1450.

A



B

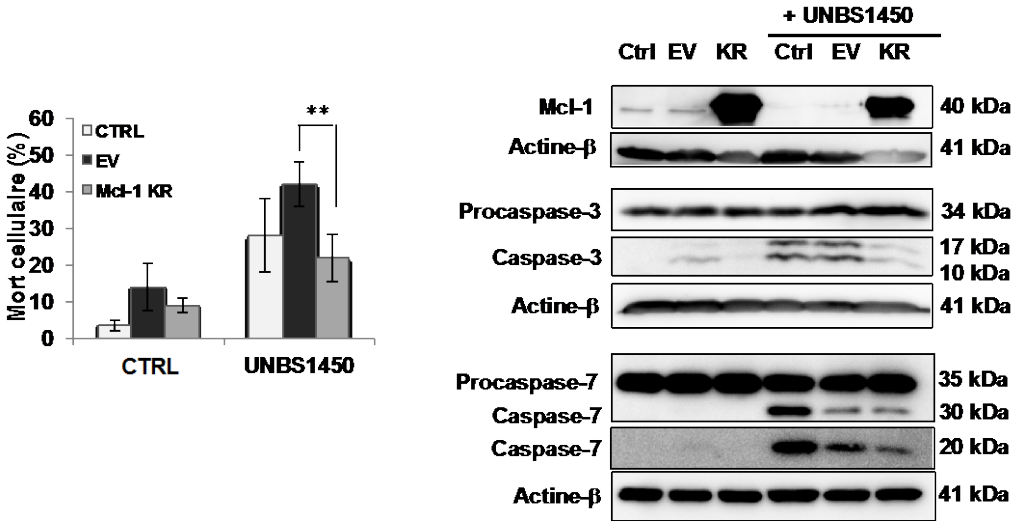
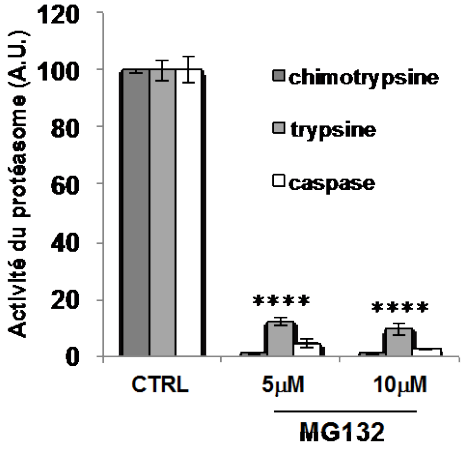


Figure 26 : Effet de l'UNBS1450 lors d'une surexpression de Mcl-1 dans la lignées SH-SY5Y

*Les cellules ensemencées 300 000 cellules/mL, dans une plaque 6 puits ont été transfectées avec Mcl-1 WT ou MCL-1 KR à l'aide du kit JetPrime pendant 24 h, puis ont été remises en culture dans un milieu en présence d'UNBS1450 pendant 24 h. L'apoptose a été analysée par étude de la morphologie nucléaire et de l'expression des protéines par Western Blot. Les résultats représentent la moyenne de pourcentage d'apoptose +/- ES (erreur standard). ** : p < 0,01 par ANOVA 1 – Sidak. EV : vecteur vide. A : Transfection des SH-SY5Y avec le plasmide Mcl-1 WT. C, Transfection des cellules SH-SY5Y avec le plasmide Mcl-1 KR.*

A



B

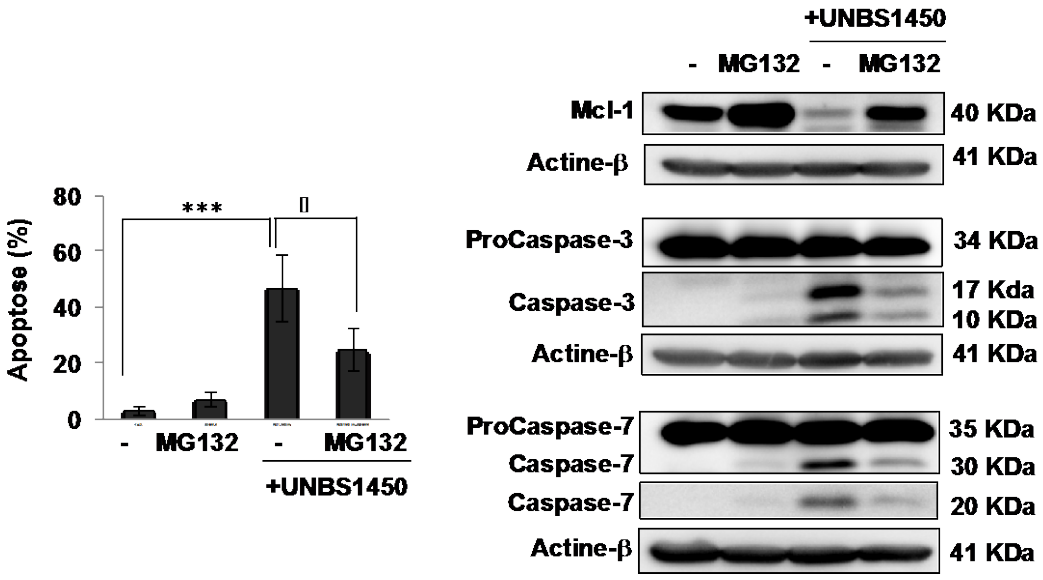


Figure 27 : Effet de l'UNBS1450 lorsque le protéasome est inhibé

Les cellules ont été ensemencées à 300 000/mL dans une plaque 6 puits, et traitées avec 25 nM d'UNBS1450 pendant 10 h, puis pendant 6h avec 5 µM MG132. L'apoptose a été analysée par l'étude de la morphologie nucléaire par microscopie et l'expression des protéines par Western blot. A, Analyse de l'activité du protéasome « Cell-Based Proteasome Glo Assay » lors de traitement au MG132 *.B, Analyse de l'apoptose par l'étude de la morphologie nucléaire et de l'expression de Mcl-1 et des caspases-3/7 par Western blot. Les résultats sont exprimés en moyenne (+/- SE) de pourcentage de cellules apoptotiques. Les expériences ont été répétées 3 fois.* * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.001 par *ANOVA 2 – Dunnett, comparé au contrôle respectif.*

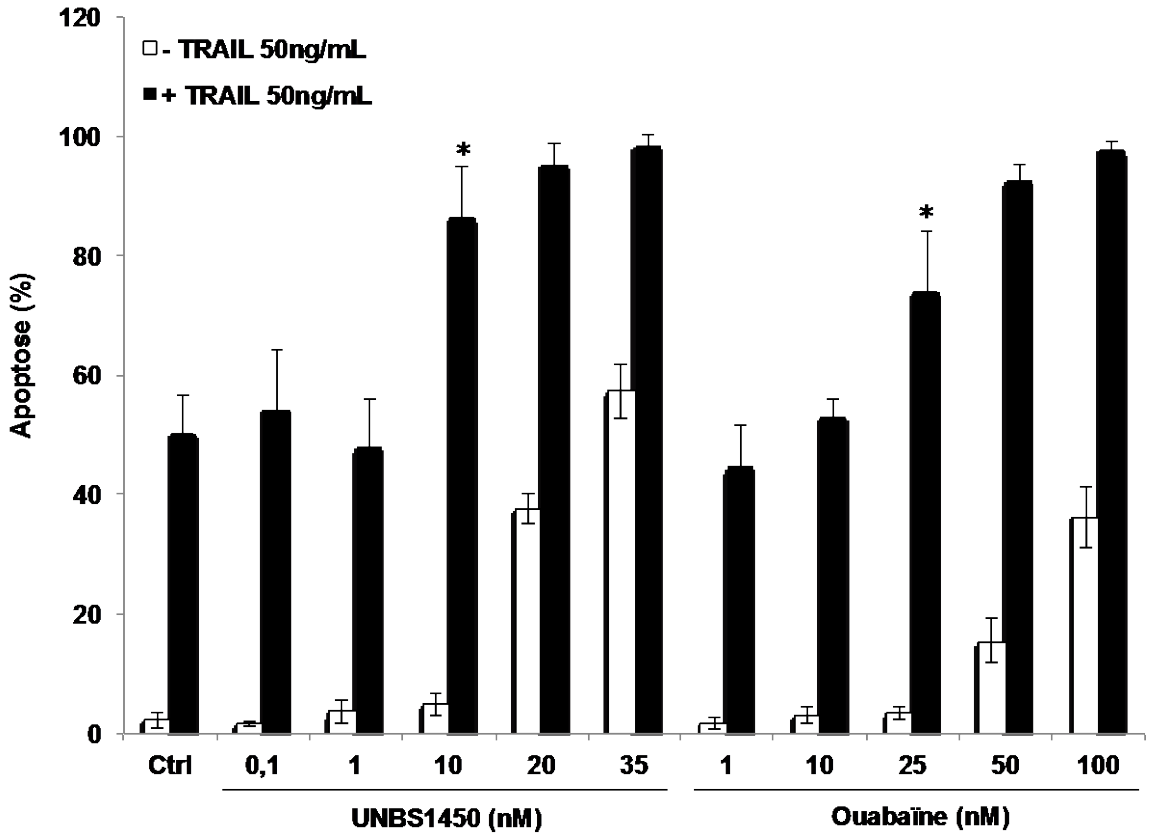
1.3.2. Effets de sensibilisation de l'UNBS1450 lors d'un co-traitement avec TRAIL

D'après la littérature, de nombreux glycosides cardiaques permettent de sensibiliser les cellules à un traitement avec TRAIL. Les cellules U937 ont été co-traitées à l'UNBS1450 ou à l'ouabaïne à différentes concentrations, et avec TRAIL, une cytokine qui se fixe à ses récepteurs et induit l'apoptose extrinsèque. Nous avons étudié l'apoptose lors d'un traitement avec 50 ng/mL de TRAIL suivant un traitement avec différentes concentrations d'UNBS1450 ou d'ouabaïne. Les résultats montrent que les cellules sont sensibilisées par un traitement à des concentrations sub-apoptotiques d'UNBS1450 (10 nM) ou ouabaïne (25 nM) (Figure 28A). Ces deux concentrations ont été utilisées en co-traitement avec une gamme de concentration de TRAIL incluant des concentrations sub-apoptotiques pour ce composé (Figure 28B). Les résultats obtenus mettent en évidence que l'UNBS1450 et l'ouabaïne, à une concentration sub-apoptotique, permettent de sensibiliser les cellules au traitement avec TRAIL, même lorsque ce composé est utilisé à une concentration sub-apoptotique (1 ng/mL). Des études ultérieures permettront de définir si cette sensibilité est liée à un effet sur Mcl-1.

Ces résultats suggèrent que la protéine Mcl-1 peut avoir un rôle important dans l'apoptose induite par l'UNBS1450. Si cette protéine n'est pas dégradée par l'inhibition de son ubiquitination, dans les lignées SH-SY5Y, nous observons une protection des cellules face à l'apoptose normalement induite par l'UNBS1450.

De plus, nous avons démontré qu'à des concentrations sub-apoptotiques, ce composé permet de sensibiliser les cellules au traitement avec TRAIL.

A



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

B

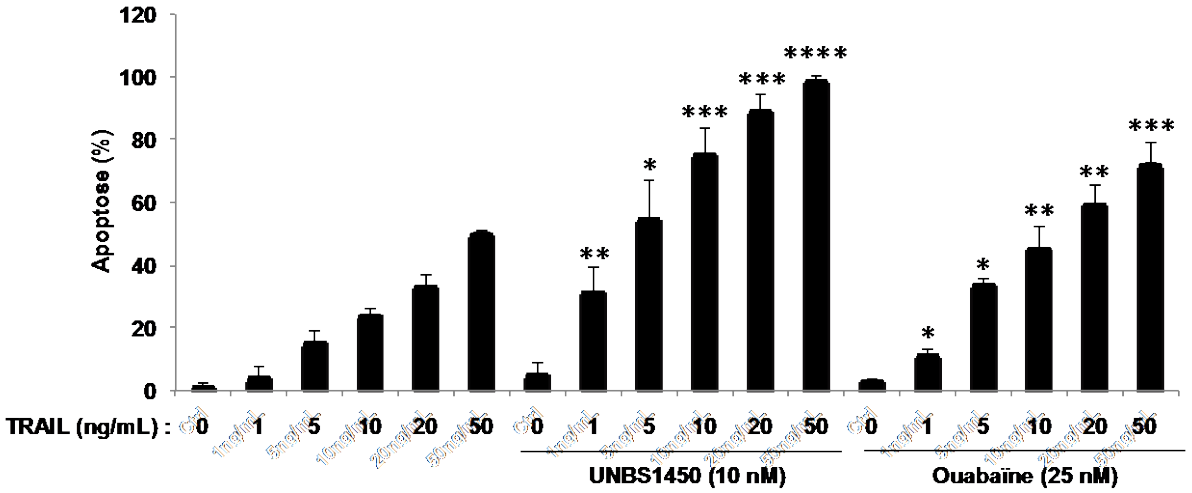


Figure 28 : Sensibilisation des cellules cancéreuses par les glycosides cardiaques

*L'induction de l'apoptose a été analysée par l'étude par microscopie de la morphologie nucléaire correspondant à des figures apoptotiques. Les cellules U937, ensemencées à 300 00 cellules/mL, ont été prétraitées avec un glycoside cardiaque (UNBS1450 ou ouabaïne) aux concentrations indiquées pendant une heure, puis traitées pendant 16h avec TRAIL aux concentrations indiquées. (A) Traitement avec des concentrations différentes d'UNBS1450 (< 20 nM sub-apoptotique) ou ouabaïne (< 50 nM sub-apoptotique). (B) Traitement avec des concentrations différentes de TRAIL (< 5 ng/mL sub-apoptotique). Les résultats sont exprimés en moyenne (+/- SE) de pourcentage de cellules apoptotiques. Les expériences ont été répétées 3 fois. *** : p < 0,01, ** : p < 0,01, * : p < 0,05 par ANOVA – Sidak, comparé aux contrôles respectifs.*

2. Implication de la voie ionique

Les effets des glycosides cardiaques sont liés à la pompe NKA par l'implication potentielle des voies ionique et non-ionique. La voie ionique fait intervenir une modulation de la concentration de calcium intracellulaire, tandis que la voie non-ionique implique l'activation de différentes kinases. Dans cette partie, nous étudierons les effets de l'UNBS1450 et de l'ouabaïne sur ces deux voies afin de déterminer laquelle est impliquée dans les effets induits par ces deux composés.

2.1. Non implication de la voie ionique dans les effets induits par l'UNBS1450 ou l'ouabaïne

Les glycosides cardiaques sont connus pour induire le flux de calcium dans les cellules, suite à l'inhibition de la pompe NKA. Afin de vérifier l'implication du calcium dans l'effet pro-apoptotique et la modulation de Mcl-1 induits par l'UNBS1450, plusieurs stratégies ont été établies. La première stratégie consiste à analyser si les glycosides cardiaques, utilisés à des concentrations induisant l'apoptose, sont capables de modifier la mobilisation du calcium. Le flux de calcium a été analysé par cytométrie en flux après traitement des cellules U937 avec 100 nM d'ouabaïne ou 20 nM d'UNBS1450, et marquage avec le Fluo-4, un marqueur spécifique du calcium cytosolique (Figure 29). Une étude similaire a été réalisée en présence d'un inhibiteur spécifique de la pompe SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+}-*ATPase*), à savoir la thapsigargine (10 nM), connue pour inhiber le transporteur du calcium intracellulaire vers la réticulum endoplasmique (207). Les résultats obtenus ne montrent aucune modulation de la concentration cytoplasmique du calcium, suggérant ainsi que le calcium n'est pas être impliqué dans les effets pro-apoptotiques induits par l'ouabaïne et l'UNBS1450. Une chélation du calcium permettrait de confirmer cette hypothèse.

Afin de confirmer ou non l'implication du calcium dans l'apoptose induite par l'ouabaïne ou l'UNBS1450, ainsi que son effet sur Mcl-1, les cellules U937 ont été prétraitées avec des chélateurs de calcium puis traitées avec les deux cardénolides. 12 h et 24 h après le traitement, l'induction d'apoptose a été étudiée par observation de la morphologie nucléaire et de la dégradation de Mcl-1 (Figure 30). Les deux agents chélatants sont : l'EDTA, un chélateur extracellulaire, utilisé aux concentrations de 50 μM and 500 μM ; et le BAPTA-AM, chélateur intracellulaire, utilisé aux concentrations de 5 μM et 10 μM. Dans ces deux cas de co-traitements, la chélation du calcium n'a entrainé aucune modification des effets de

l'ouabaïne et de l'UNBS1450 sur l'induction de l'apoptose et la diminution de l'expression de Mcl-1. Ces résultats suggèrent que l'activité ionique de la pompe NKA n'est pas directement responsable de l'effet de l'ouabaïne et de l'UNBS1450.

2.2. Implication de la voie non-ionique dans les effets induits par l'UNBS1450

2.2.1. Effet de l'inhibition de kinases sur l'apoptose et la modulation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450 et l'ouabaïne

Les kinases sont des enzymes souvent impliquées dans l'augmentation ou la diminution de la stabilité de protéines dans le cytoplasme par le biais de mécanismes de phosphorylation de la protéine-cible, ainsi que dans le mécanisme d'apoptose. Comme Mcl-1 présente de nombreux sites de phosphorylation pour différentes kinases, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs de kinases sur le potentiel apoptotique de l'UNBS1450 et de l'ouabaïne (Figure 31). De manière générale, les résultats montrent que chaque kinase inhibée séparément réduit modérément l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450. Concernant l'ouabaïne, il semble que l'inhibition des kinases n'ait pas d'effet sur son potentiel d'induction de l'apoptose.

Afin de déterminer si les kinases sont importantes pour la dégradation de Mcl-1 et Bcl-xL, l'expression de ces deux protéines a été étudiée après un co-traitement avec l'UNBS1450 ou l'ouabaïne et des inhibiteurs de kinases (Figure 31). Dans tous les cas, les réversions étaient faibles et pas assez marquées pour conclure à une totale implication d'une kinase seule dans la dégradation de Mcl-1 ou de Bcl-xL. Cependant, plusieurs kinases peuvent être impliquées en même temps. Ces résultats suggèrent d'étudier à l'avenir l'activation d'autres kinases (telle la famille Src, connues pour interagir avec la pompe NKA (208), ainsi que la combinaison d'inhibiteurs de kinases lors de traitement avec l'UNBS1450.

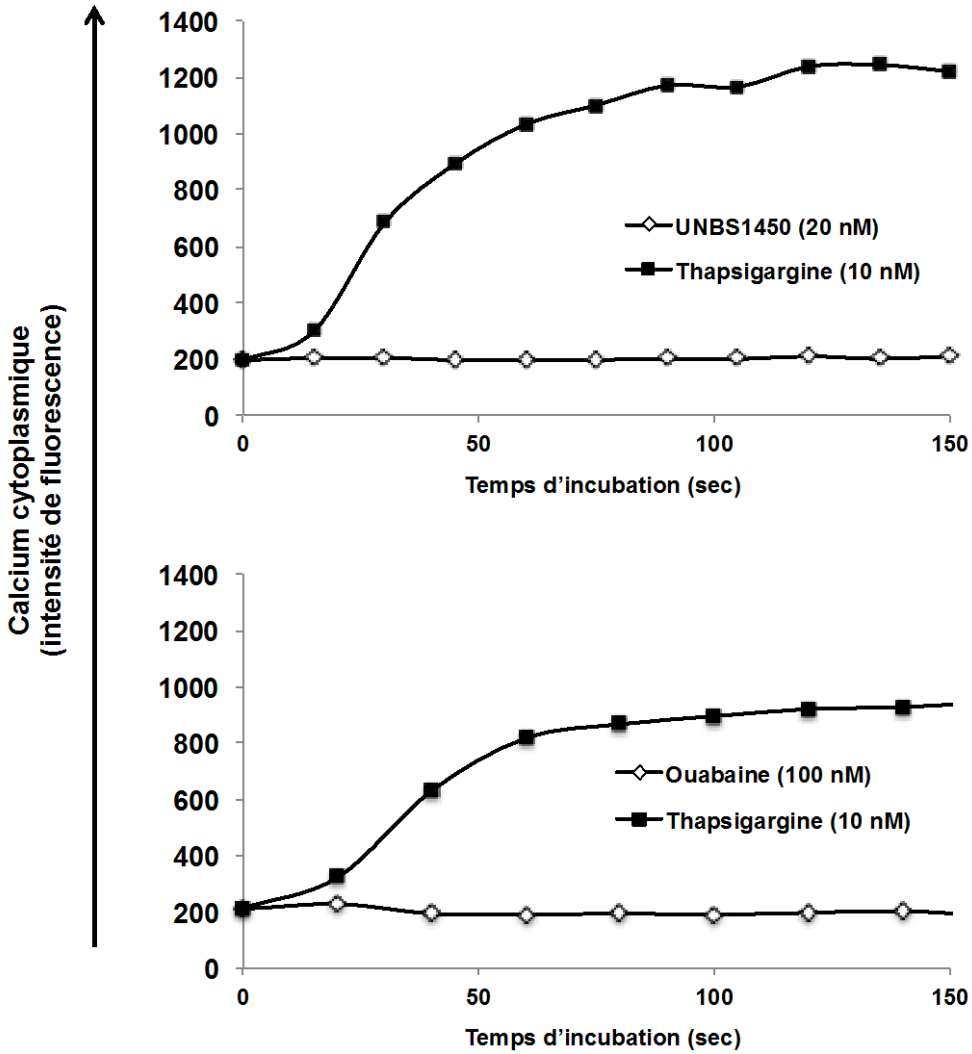


Figure 29 : Analyse des effets des glycosides cardiaques sur la mobilisation intracellulaire du calcium

Les cellules U937 ont été traitées avec des doses apoptotiques d'ouabaïne et d'UNBS1450. Le flux du calcium cytoplasmique a été observé au cours du temps suivant le traitement à l'UNBS1450 ou l'ouabaïne, grâce à une étude par cytométrie et au marqueur de calcium (Fluo-4). La thapsigargine, un inhibiteur de SERCA, est utilisée en tant que contrôle positif. Les expériences ont été répétées 3 fois.

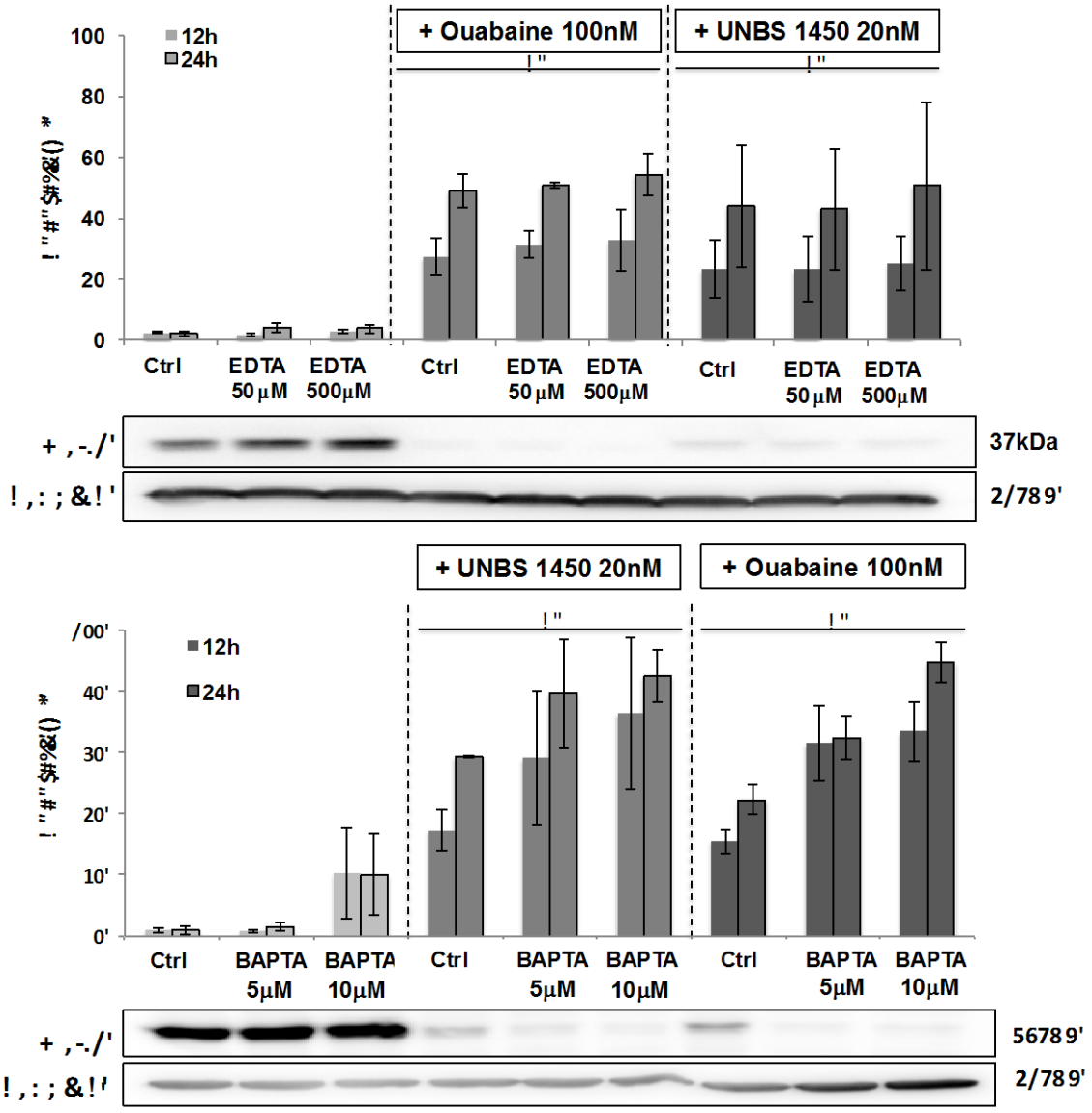
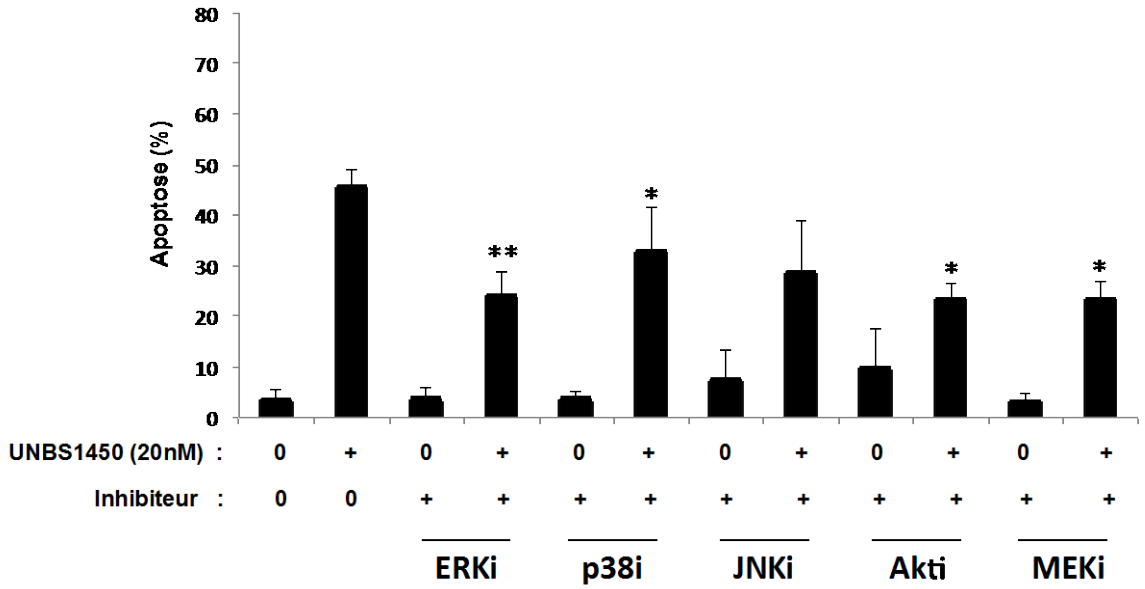
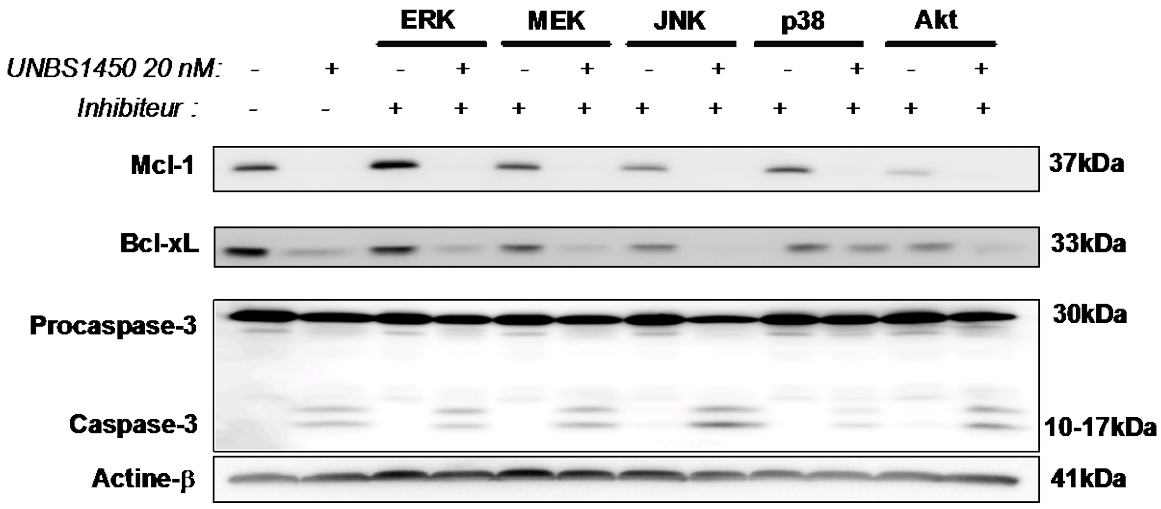


Figure 30 : Effet de la chélation du calcium sur l'apoptose et la modulation de Mcl-1 induites par l'UNBS1450 et l'ouabaïne.

*Les cellules U937 ont été traitées avec l'ouabaïne ou l'UNBS1450, à des concentrations apoptotiques, respectivement de 100 et 20 nM ; en présence ou non de chélateurs de calcium intracellulaire (EDTA) (haut) ou extracellulaire (BAPTA-AM) (bas). L'apoptose a été évaluée par l'analyse de la morphologie nucléaire après 12 h et 24 h et celle de l'expression de Mcl-1 après 12 h. Les expériences ont été répétées 3 fois. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak, comparé aux contrôles respectifs.*

A





(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

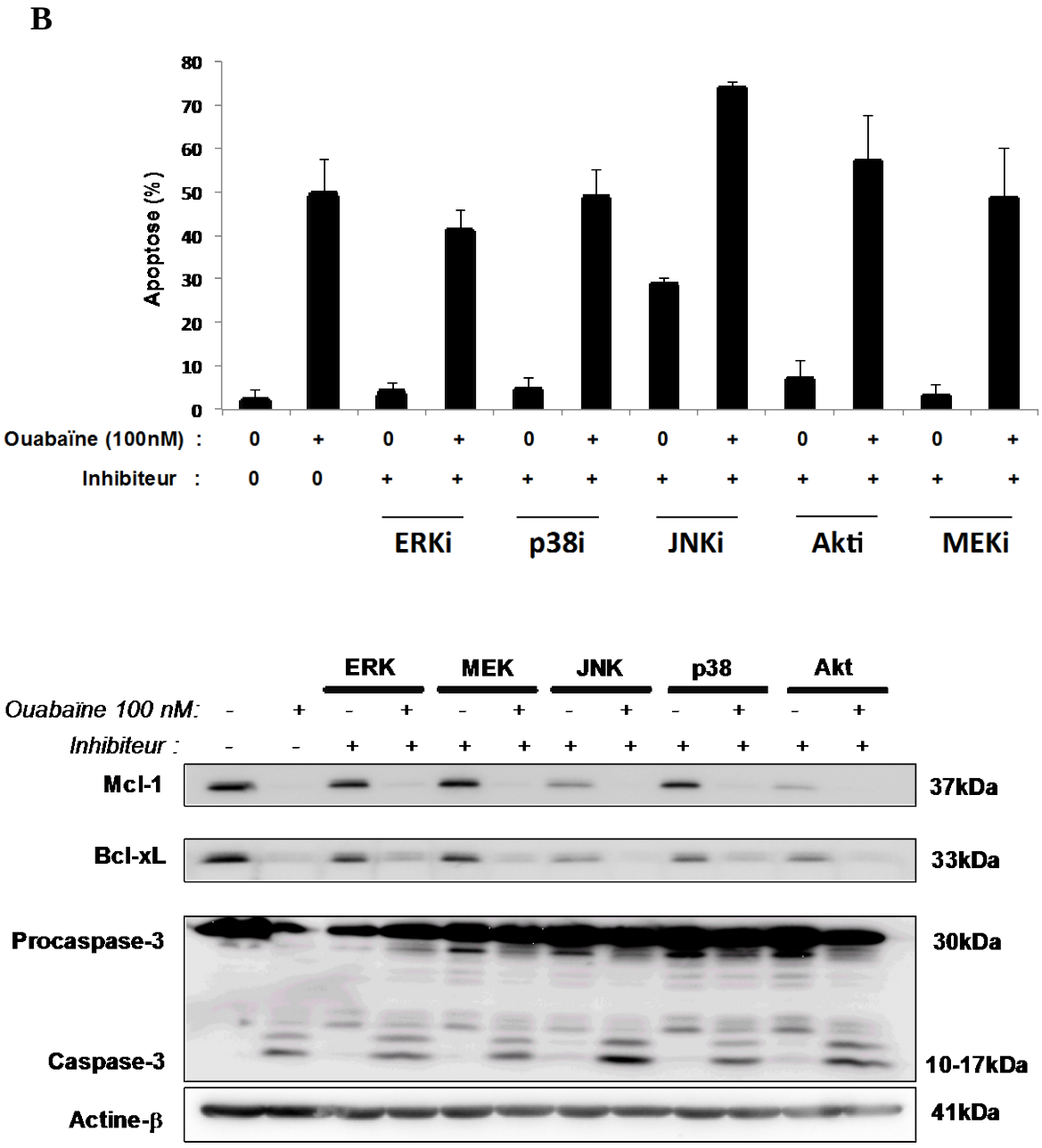


Figure 31 : Analyse de l'effet d'inhibiteurs de kinases, sur l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450 (A) et la ouabaïne (B)

*Les cellules U937 ensemencées à 300 000/ml sont co-traitées ou non avec 20 nM d'UNBS1450 (A) ou 100 nM d'ouabaïne (B) et avec un inhibiteur de kinase. L'apoptose est analysée par l'étude de la morphologie nucléaire après 24 h de traitement (en haut), et par étude par Western blot de l'expression des protéines Mcl-1, Bcl-xL ainsi que du clivage de la procaspase-3 (bas). Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de trois expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak, comparé aux contrôles respectifs. ERKi, p38i, JNKi, Akti, MEKi : inhibiteurs de kinases*

2.2.2. Effet de l'UNBS1450 et l'ouabaïne après modulation du cholestérol cellulaire

Dans le but de déterminer l'implication de la pompe NKA et de son interaction avec Src dans le mécanisme d'action des glycosides cardiaques, les cellules U937 ont été traitées avec 1 mM de méthyl-β-cyclodextrine (MBC), un dépléteur de cholestérol et un inhibiteur de radeaux lipidiques qui concentrent Src et la pompe NKA. Cette modification des radeaux lipidiques module l'activation de Src (209) et empêche les effets pléiotropiques des glycosides cardiaques (Figure 32). En présence de MBC, l'apoptose ainsi que la diminution de Mcl-1 induites par 20 nM d'UNBS1450 sont totalement inhibées alors que le MBC reste sans effet dans le cas d'un traitement avec 100 nM d'ouabaïne. Ces résultats tendent à montrer que ces deux composés utilisent des voies de signalisation différentes pour induire l'apoptose, et que ces deux composés n'utilisent pas tous les deux la voie de signalisation de Src pour induire leurs effets. Pour prouver ces hypothèses, les cellules seront co-traitées avec ces glycosides cardiaques et un inhibiteur de Src (PP2) respectivement des molécules qui modulent le niveau du cholestérol membranaire.

Afin de déterminer si l'UNBS1450 et l'ouabaïne ont des cibles communes ou non, nous avons co-traité les cellules U937 avec la MBC à des concentrations croissantes d'UNBS1450 et d'ouabaïne (0 à 100 nM) (Figure 33). Nos résultats ont montré que, dans tous les cas, les effets de l'ouabaïne n'étaient jamais modifiés par le co-traitement avec la MBC. Cependant pour l'UNBS1450, nous pouvons observer une inhibition de l'apoptose uniquement induite par des concentrations d'UNBS1450 inférieures à 60 nM. Pour de telles concentrations, MBC est capable d'empêcher la diminution de Mcl-1 induite par l'UNBS1450. Ces observations suggèrent que les deux glycosides cardiaques étudiés interagissent différemment avec la pompe NKA ou qu'ils induisent des effets intracellulaires différents, comme par exemple l'activation différentielle de kinases.

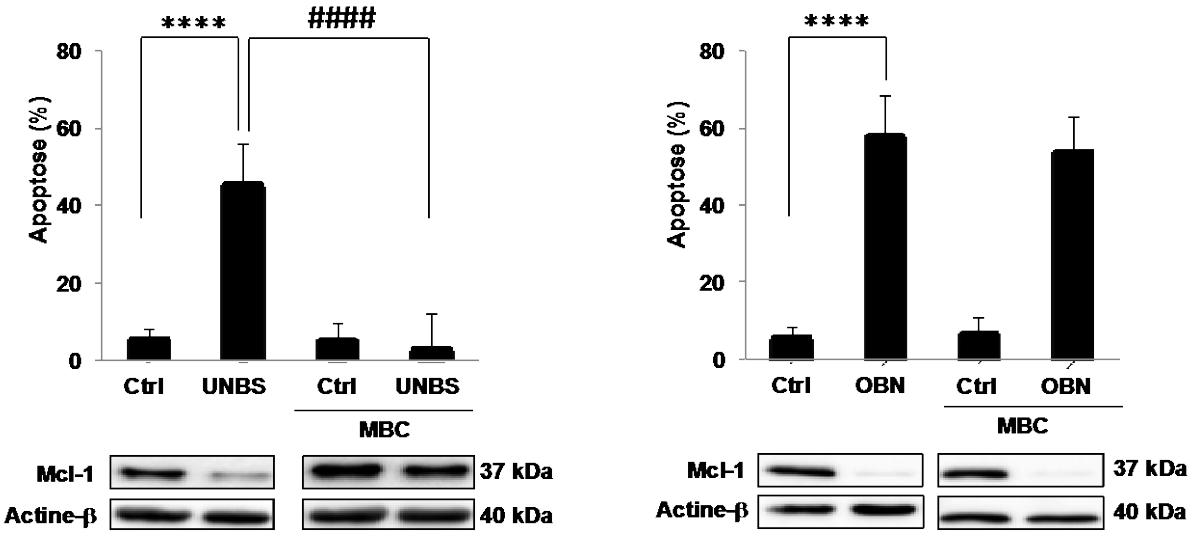


Figure 32 : MBC reverse les effets de l'UNBS1450

Les cellules U937 ensemencées à 300 000/ml ont été pré-traitées pendant une heure avec de la méthyl-β-cyclodextrine *(MBC), puis traitées soit avec 20 nM d'UNBS1450, soit avec 100 nM d'ouabaïne (OBN) pendant 12 h pour l'étude de l'expression de Mcl-1 par Western Blot et pendant 24h pour l'observation de la morphologie nucléaire spécifique de l'apoptose. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de 3 expériences indépendantes. ****/#### : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak, comparé aux contrôles respectifs.*

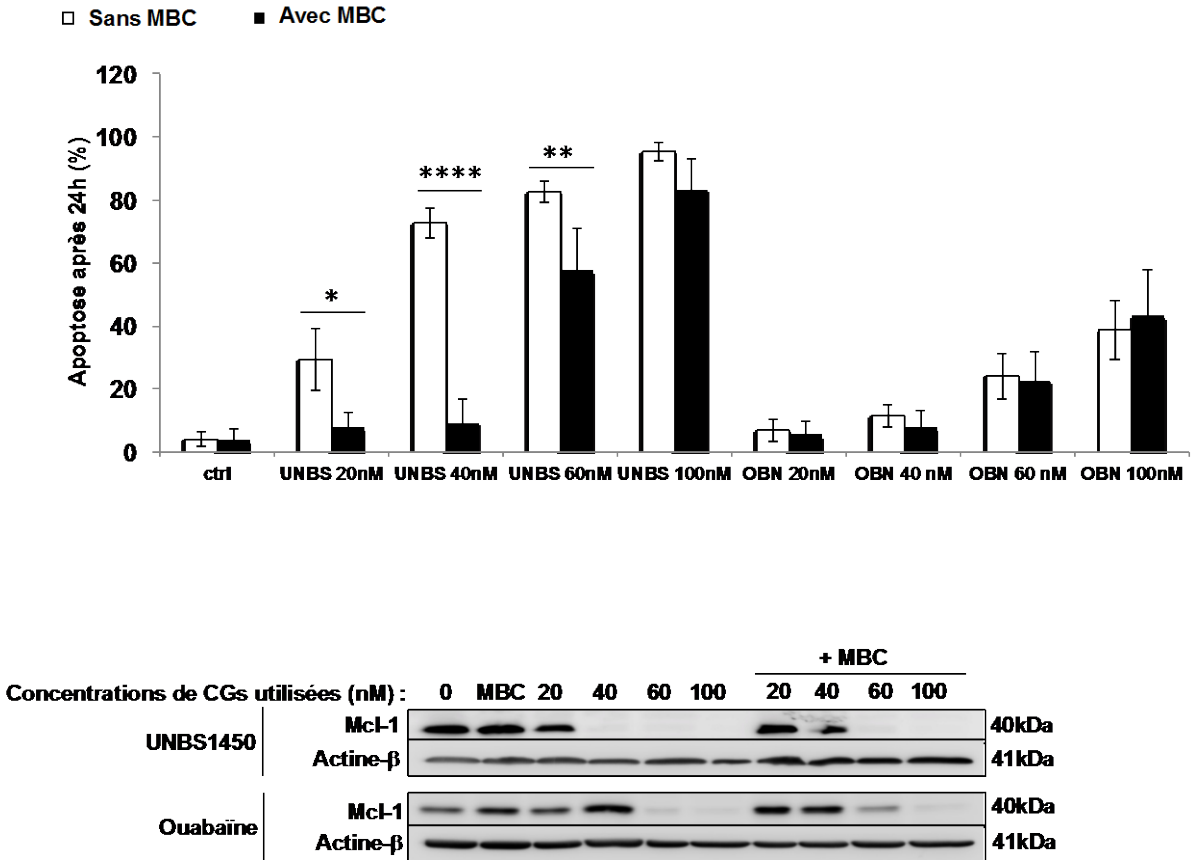


Figure 33 : MBC révèle des effets différents en co-traitement avec l'UNBS1450 ou l'ouabaïne

*Les cellules U937 en phase exponentielle ont été traitées avec des concentrations croissantes d'UNBS1450 et d'ouabaïne (20 nM à 100 nM), avec ou sans 1 mM de MBC (Dépléteur de cholestérol membranaire). L'induction de l'apoptose a été évaluée par l'étude de la morphologie nucléaire grâce à un marquage par du Hoechst 33342 et par l'étude par Western blot de l'expression de Mcl-1 respectivement après 24 h et 12 h de traitement avec les glycosides cardiaques. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de 3 expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak (Sans MBC vs avec MBC).*

D’autres molécules modulant le cholestérol intracellulaire telles que, la filipine III, inhibiteur de perméabilité membranaire et d’endocytose, qui agit en fixant le cholestérol, et l’U18666A (Figure 34), un inducteur de l’accumulation du cholestérol dans le réticulum endoplasmique ont été utilisées en co-traitements avec l’ouabaïne ou l’UNBS1450 avec des concentrations allant de 20 nM à 100 nM. L’étude de la morphologie nucléaire a mis en évidence que la modulation du cholestérol membranaire induite par la filipine III n’affecte pas l’induction d’apoptose par les glycosides cardiaques, contrairement à l’augmentation de cholestérol au sein du réticulum endoplasmique induite par l’U18666A qui induit un effet synergique en doublant le niveau d’apoptose induit par l’UNBS1450 (20 nM) et l’ouabaïne (60 nM et 100 nM). Ces résultats suggèrent que les effets pro-apoptotiques des deux glycosides cardiaques étudiés (ouabaïne et UNBS1450) sont liés à la présence de cholestérol dans la cellule.

2.2.3. L’inhibition de Src réduit les effets de l’UNBS1450 sur l’induction de l’apoptose

Il a été démontré que la voie Src peut-être activée lorsque la pompe NKA fixe un glycoside cardiaque. En effet la pompe NKA peut recruter un co-récepteur (*i.e.* EGF-R) au niveau des radeaux lipidiques et activer la voie Src/Ras (208). Pour montrer l’implication de Src dans les mécanismes d’apoptose induits par l’UNBS1450 et/ou l’ouabaïne, les cellules U937 et Jurkat ont été traitées avec différentes concentrations d’un inhibiteur ubiquitaire de la famille Src (PP2). L’analyse de la morphologie nucléaire et du potentiel mitochondrial ont mis en évidence que l’inhibiteur de la famille des kinases Src induit une diminution de l’apoptose des cellules U937 et Jurkat traitées avec 20 nM d’UNBS1450 alors qu’aucune modification n’a été observée dans le cas d’un traitement avec l’ouabaïne (Figure 35). Ces résultats sont cohérents avec les observations faites avec la MBC. Par la suite, nous étudierons les kinases activées par Src.

L’activation de Src peut être consécutive à la fixation des glycosides cardiaques sur la pompe NKA et peut être impliquée dans les mécanismes d’apoptose induits par l’UNBS1450. L’inhibition de l’activité de Src par PP2 ou de l’interaction de Src avec la pompe NKA par la MBC induisent toutes les deux une réversion partielle ou non de l’apoptose induite par l’UNBS1450, mais pas dans le cas d’un traitement à l’ouabaïne.

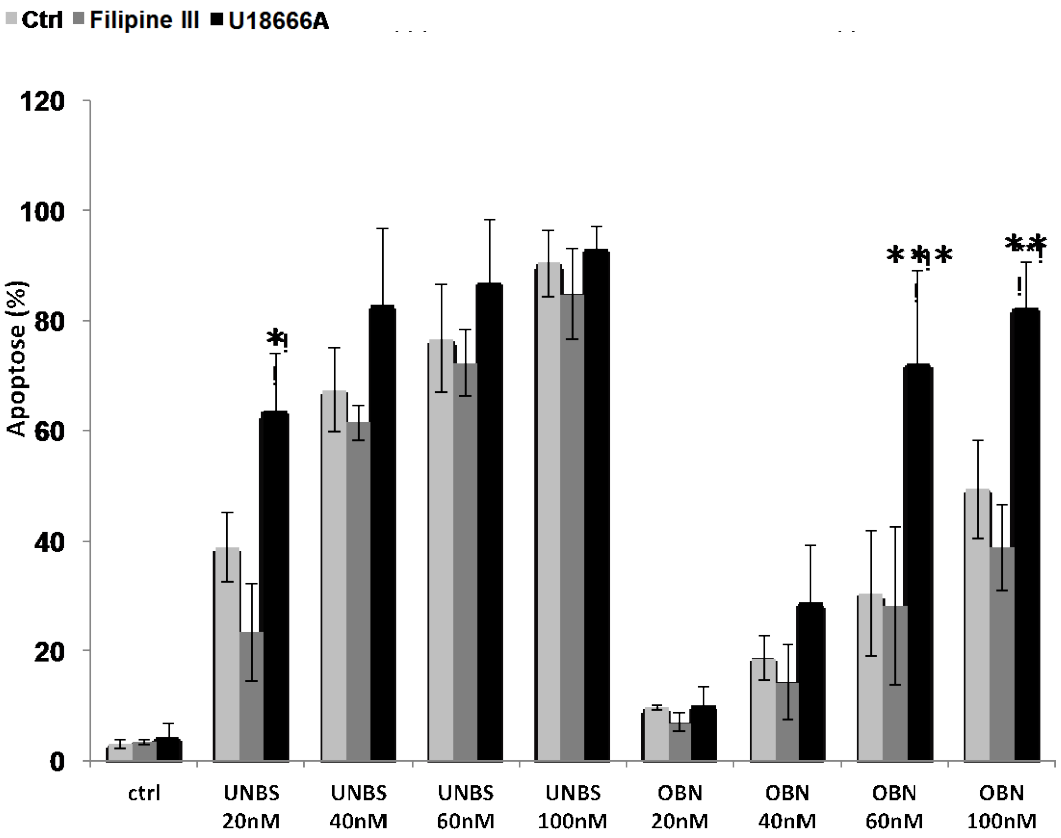
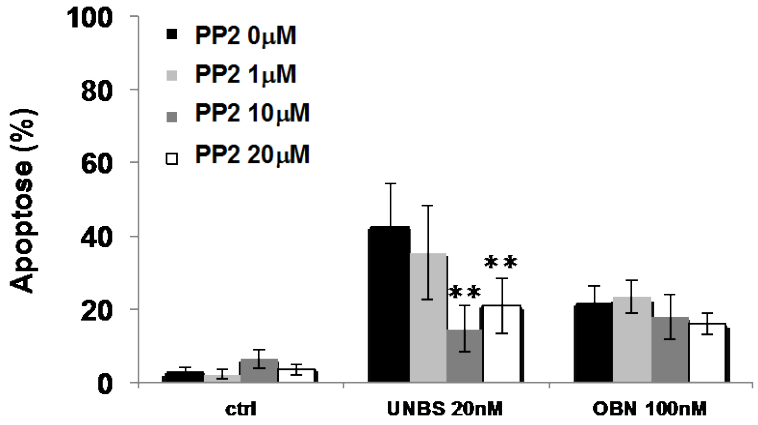


Figure 34 : Induction de l'apoptose lors de co-traitements avec des molécules modifiant les concentrations de cholestérol intracellulaire

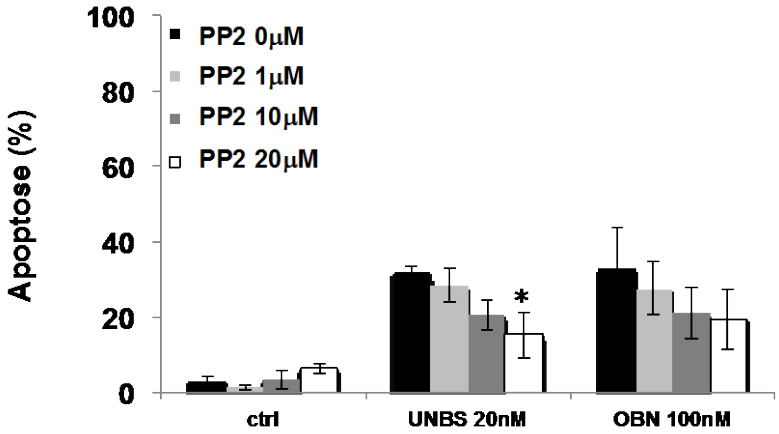
*Les cellules U937 en phase exponentielle de croissance ont été traitées avec des concentrations croissantes d'UNBS1450 et d'ouabaïne (20 à 100 nM), en présence ou absence de modulateurs du cholestérol cellulaire. Le niveau d'induction de l'apoptose a été étudié par l'observation microscopique de la morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de 3 expériences indépendantes. U18666A ; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak (Sans modulateurs vs avec modulateurs),*

A

U937



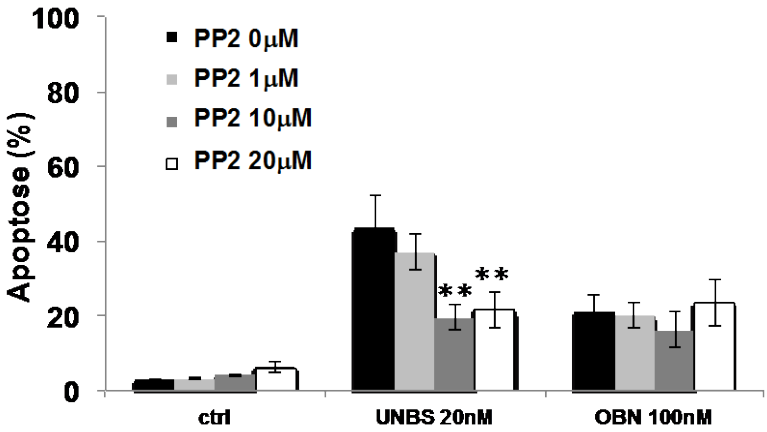
JURKAT



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

B

U937



JURKAT

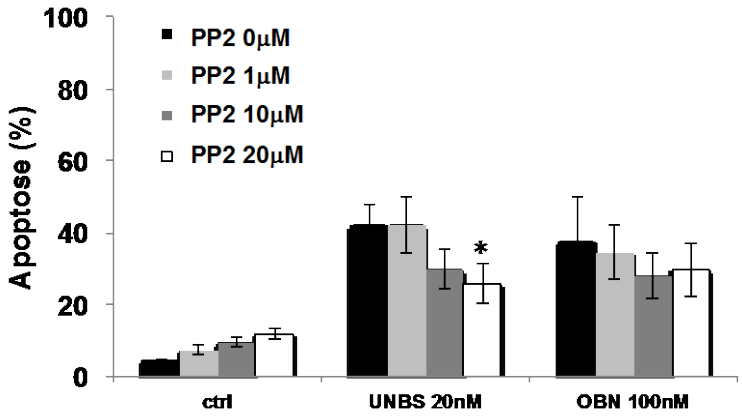


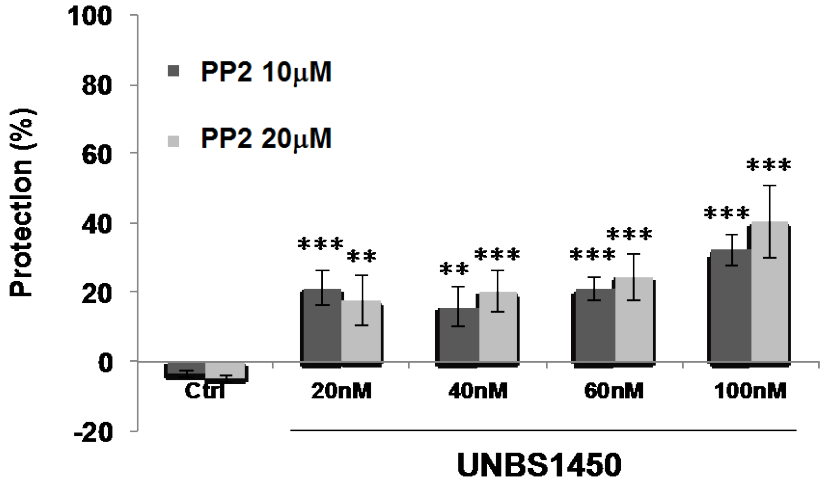
Figure 35 : Implication de Src dans l'induction de l'apoptose par les glycosides cardiaques

*Les cellules U937 et Jurkat sont prétraitées pendant une heure avec un inhibiteur de Src (PP2) à différentes concentrations 1, 10 ou 20 µM, puis avec 20 nM d'UNBS1450, ou 100 nM d'ouabaïne pendant 24 h. L'apoptose est analysée par deux méthodes, (A) par observation de la morphologie nucléaire, (B) en déterminant le potentiel mitochondrial. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de 3 expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak, comparé aux contrôles respectifs.*

Nous avons ensuite déterminé si l'activation de Src est directement consécutive et représente une cible unique suite à un traitement à l'UNBS1450. L'apoptose a été étudiées dans les cellules U937 traitées avec l'UNBS1450 (20 à 100 nM), correspondant à la même gamme utilisée pour le co-traitement avec la MBC), avec ou sans pré-traitement avec PP2. Le pré-traitement avec l'inhibiteur de Src induit une réversion partielle de la mort cellulaire par apoptose induite par l'UNBS1450 (pour toutes les concentrations testées). La MBC qui inhibe l'activation de Src suite à la modulation de la pompe NKA, induit quant à elle, une réversion de la diminution de l'expression de Mcl-1 à de plus, fortes concentrations (20 nM, 40 nM et 60 nM) dans la lignée U937. Les différences d'effet entre MBC et PP2 selon la concentration d'UNBS1450 utilisée suggèrent que l'UNBS1450 interagit avec la pompe NKA et que cette interaction induit l'activation de Src mais également d'autres kinases (Figure 36).

Dans cette partie nous avons apporté des preuves quant à l'implication des voies ioniques et non-ioniques dans l'apoptose induite par l'UNBS1450 et l'ouabaïne. Nos observations suggèrent que l'UNBS1450 semble agir sur l'interaction de la pompe NKA avec d'autres protéines telles que Src. Nos résultats impliquent que la mort cellulaire induite par l'UNBS1450 est indépendante du calcium mais qu'elle est liée à la voie non-ionique. L'ouabaïne semble utiliser un autre mécanisme, indépendant de Src et du calcium pour induire l'apoptose.

A



B

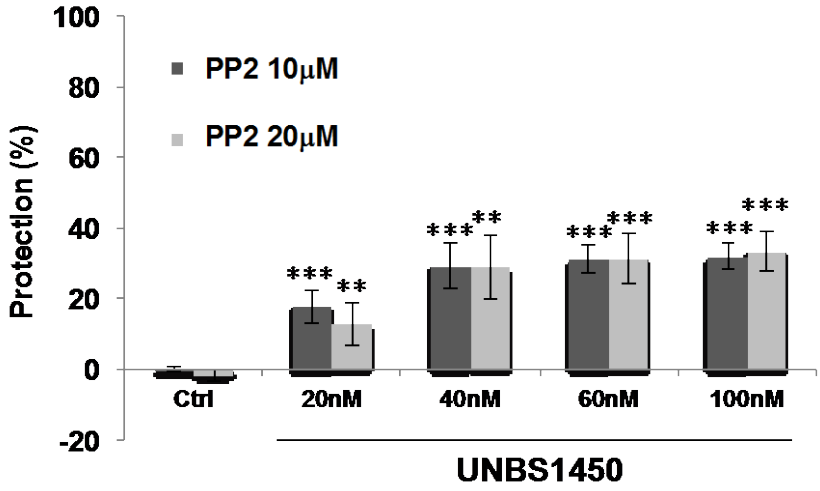


Figure 36 : Protection induite par un inhibiteur de Src contre l'apoptose induite par l'UNBS1450

*300 000 cellules (U937) sont mises en culture et prétraitées pendant une heure avec un inhibiteur de Src (PP2) à différentes concentrations (10 ou 20 µM), puis traitées avec différentes concentration l'UNBS1450 (20 nM à 100 nM). La protection (différence d'apoptose entre les échantillons PP2 seuls et PP2 + UNBS1450) contre l'induction de l'apoptose est analysée par deux méthodes : (A) par l'étude de la morphologie nucléaire, (B) et du potentiel mitochondrial. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de 3 expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001. ANOVA 2 – Sidak, comparé aux contrôles respectifs.*

3. Analyse de l'effet de l'UNBS1450 sur c-Myc

3.1. L'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc

L'effet de l'UNBS1450 sur la transcription de c-Myc mise en évidence par l'étude par puces à ADN a été confirmée par la diminution de l'expression de cette protéine induite après 4 h de traitement des cellules U937 avec 20 nM d'UNBS1450. Afin de déterminer si cette régulation intervient au niveau transcriptionnel, nous avons également étudié l'effet de ce glycoside cardiaque sur l'expression de l'ARNm de c-Myc. La diminution de l'ARNm c-Myc est cohérente avec celle de sa protéine (Figure 37). L'ensemble de ces résultats montre que l'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc en régulant sa transcription.

3.2. Analyse du temps de traitement nécessaire avec l'UNBS1450 pour induire ses effets modulatoires

De précédentes études menées par Juncker *et al.* (127) ont démontré que l'UNBS1450 induit l'apoptose à partir de 15 nM dans la lignée U937 et de façon plus importante à partir de 20 nM. Dans un premier temps, la durée d'exposition minimale à l'UNBS1450 (20 nM) capable d'induire l'apoptose des cellules U937 a été déterminée après un traitement à l'UNBS1450 pendant 1, 2, 4, 6, 8, 12 et 24 h, au terme duquel les cellules sont recultivées dans du milieu sans UNBS1450 jusqu'à atteindre une durée globale de 24 h dans tous les cas de figure. Ensuite nous avons déterminé les effets de l'UNBS1450 sur l'apoptose. La mort cellulaire a été évaluée par analyse de la morphologie nucléaire par microscopie de fluorescence. Les résultats ont montré que plus de 8 h d'exposition des cellules U937 à l'UNBS1450 (20 nM) sont nécessaires pour induire un effet significatif sur la viabilité cellulaire (Figure 38A). Cette observation a été confirmée par l'analyse par MTR (Figure 38B). L'analyse du clivage des procaspases par Western Blot a confirmé l'induction d'apoptose par un traitement avec l'UNBS1450. En effet, une activation des procaspases-3 et -9 a été mise en évidence à partir de 8h. Ce résultat est comparable à ceux obtenus par l'analyse de la morphologie nucléaire (Figure 38C).

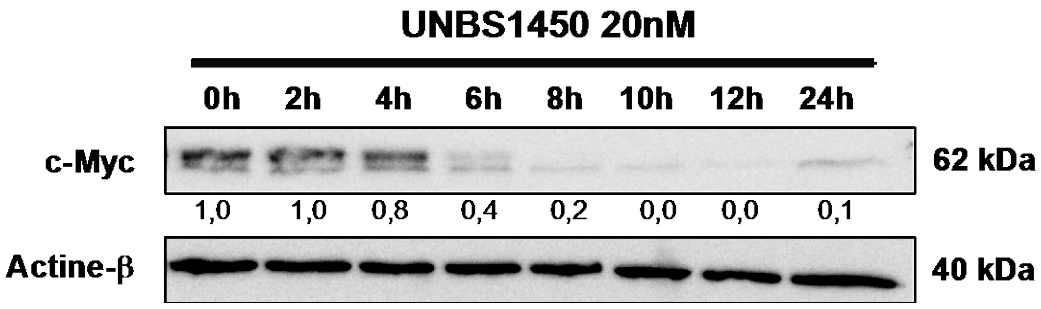
Les résultats précédents montrent que pour entrer en apoptose, les cellules U937 doivent être exposées plus de 8 h à l'UNBS1450, avec un effet maximal sur le clivage des pro-caspases observé entre 10 h et 12 h de traitement. Nos résultats de puce à ADN montrent que l'UNBS1450 induit une diminution de la transcription de l'ARNm de c-Myc, cohérente avec celle observée dans d'autres lignées cellulaires (179). Par conséquent, de manière à

déterminer le temps minimal requis pour induire la diminution de l'expression de c-Myc et Mcl-1, une étude a été menée après traitement de cellules U937 avec l'UNBS1450 pour des temps donnés et remises en incubation dans du milieu sans UNBS1450 pour atteindre une durée globale d'observation de 24 h. Cette étude a permis de mettre en évidence que l'expression des protéines c-Myc et Mcl-1 diminuent à partir de 10 h respectivement 12 h de traitement avec 20 nM d'UNBS1450 (Figure 39). Ces résultats coïncident avec ceux observés lors des tests d'apoptose, notamment avec le clivage des pro-caspases.

Cette partie axée sur des études préliminaires a permis de montrer que c-Myc est une protéine précocement diminuée au niveau transcriptionnel par l'UNBS1450.

De plus, nous avons montré qu'un traitement de plus, de 8 h avec l'UNBS1450 est nécessaire pour que les cellules présentent une modulation significative de c-Myc, de Mcl-1 et de l'apoptose.

A



B

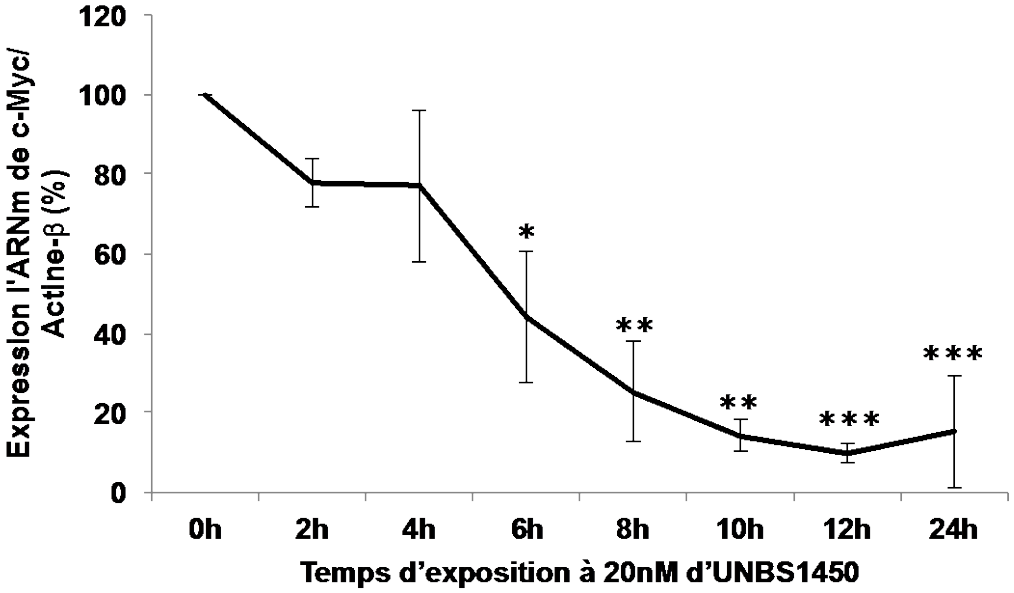
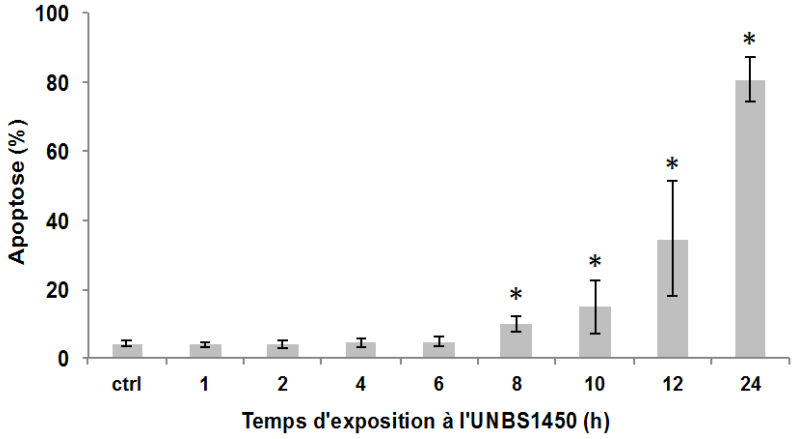


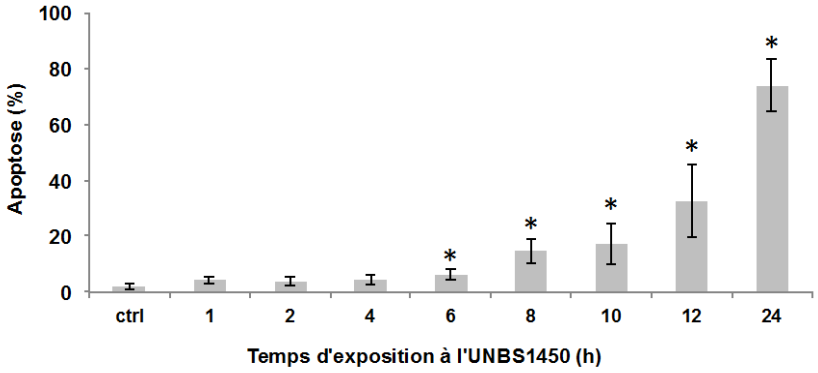
Figure 37 : L'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc

(A) L'expression de la protéine c-Myc est étudiée par Western Blot après traitement des cellules U937 avec 20 nM d'UNBS1450 pour les durées indiquées. (B) L*'expression de l'ARNm de c-Myc est analysée par PCR en temps réel après traitement des cellules U937 durant les temps indiqués. Les résultats représentent la moyenne (+/- SE) de 3 expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 1 – Sidak, comparé au contrôle.*

A



B



(La légende de la figure se trouve sur la page suivante)

C

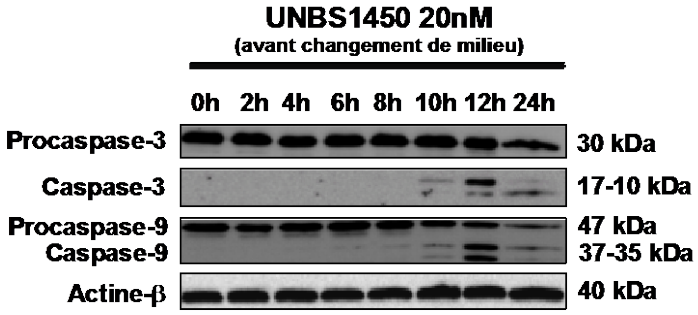


Figure 38 : Détermination du temps d'exposition à l'UNBS1450 nécessaire pour provoquer l'apoptose

*Les cellules U937 en phase exponentielle de croissance ont été exposées pendant différentes durées (0 à 12 h) à 20 nM d'UNBS1450, suivi d'un renouvellement du milieu. Après 24 h, le niveau d'apoptose induit a été estimé par (A) analyse de la morphologie nucléaire, (B) de la variation du potentiel mitochondrial à l'aide du MitoTrackerRed (MTR) et par analyse (C) du clivage des procaspases -3 et -9 Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en moyenne (+/- SE) de pourcentage de cellules apoptotiques. Les expériences ont été répétées 3 fois. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 2 – Sidak comparé au contrôle respectif.*

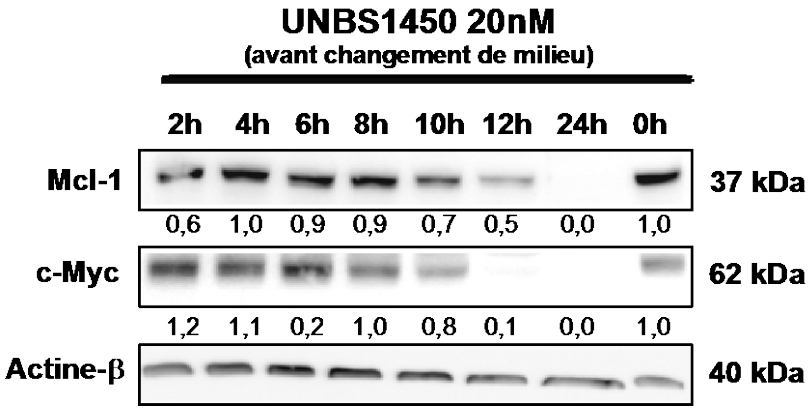


Figure 39 : Expression de Mcl-1 et c-Myc après un renouvellement de milieu

Les cellules U937 ont été traitées avec 20 nM d'UNBS1450, pour les durées indiquées, puis le composé est retiré par une re-suspension des cellules dans du milieu sans UNBS1450. L'expression des protéines a été analysée par Western Blot. Le panel présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

4. Effets des glycosides cardiaques sur les cancers du sein

4.1. L'UNBS1450 induit l'apoptose dans les lignées du cancers du sein

Nous avons montré que l'UNBS1450 peut avoir des effets sur des cibles cellulaires présentes dans les cancers du sein. De manière à déterminer si l'UNBS1450 peut être appliqué dans le cas de traitement du cancer du sein, une étude de l'effet de ce glycoside cardiaque sur la prolifération des cellules MDA-MB-231, MCF-7 et VCREMS a été menée par la méthode du XTT. Les résultats obtenus montrent que les effets cytostatiques et cytotoxiques de l'UNBS1450 interviennent à des concentrations, de l'ordre du nanomolaire, comprises entre 20 et 100 nM après 24 h, 48 h ou 72 h de traitement et que les trois lignées MCF-7, MDA-MD-231 et VCREMS présentent des sensibilités variables au traitement (Figure 40).

4.2. L'UNBS1450 induit une augmentation de la phase G2/M

La distribution des cellules en fonction de leur quantité d'ADN et leur répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S, G2/M) ont été déterminées par cytométrie de flux suite au marquage de ces cellules avec l'iodure de propidium, un agent intercalant (Figure 41). Les résultats montrent, dans les deux lignées MCF-7 et MDA-MB-231, une augmentation significative du nombre de cellules en phase G2/M après 24h de traitement avec l'UNBS1450 pour des concentrations supérieures à 20 nM pour la lignée MCF-7 et 10 nM pour la lignées MDA-MB-231. Cette tendance se poursuit à 48 h et 72 h dans les deux lignées. Pour des concentrations plus élevées, nous observons une diminution statistiquement significative de la proportion de cellules en phase G0/G1. La phase S, quant à elle, n'est pas modifiée.

Les expériences précédentes ont permis de mettre en évidence que l'UNBS1450 induit une accumulation des cellules en phase G2/M, mais n'ont pas permis de distinguer la phase G2 de la mitose. Afin de faire la distinction entre ces deux phases, les cellules ont été marquées avec un anticorps ciblant spécifiquement des sites de phosphorylation présents lors de la phase de mitose (mpm-2) (210) couplé à un marquage par l'iodure de propidium (Figure 42). Un traitement au diallyltétrasulfide (DAS4), connu pour induire une accumulation en phase de mitose (72), sert de référence pour ce marquage puisqu'il permet de mettre en évidence l'apparition d'un spot correspondant aux cellules en mitose. Lors des traitements des cellules MCF-7 (Figure 42A) et MDA-MB-231 (Figure 42B) avec l'UNBS1450 à différentes concentrations et temps d'exposition, nous n'avons pas vu d'apparition de ce spot. Ces

résultats suggèrent que les cellules traitées à l'UNBS1450 n'entrent pas en mitose et restent bloquées en phase G2. L'étude des marqueurs cellulaires ne montre pas d'effet de ce glycoside cardiaque sur c-Myc et PCNA (Figure 42C); cependant nous observons une diminution de la cycline D1, une protéine exprimée spécifiquement par les cellules en phase G1. Cette diminution peut être corrélée à la baisse du nombre de cellules en phase G1. Et inversement une tendance montrant l'augmentation de la cycline B1 est visible et cohérente avec l'augmentation du nombre de cellules en phase G2.

Dans cette dernière partie, nous avons mis en évidence le potentiel anti-cancéreux de l'UNBS1450 sur deux lignées de cancer du sein. Nous avons montré l'induction de l'apoptose induite à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, ainsi qu'un blocage en phase G2.

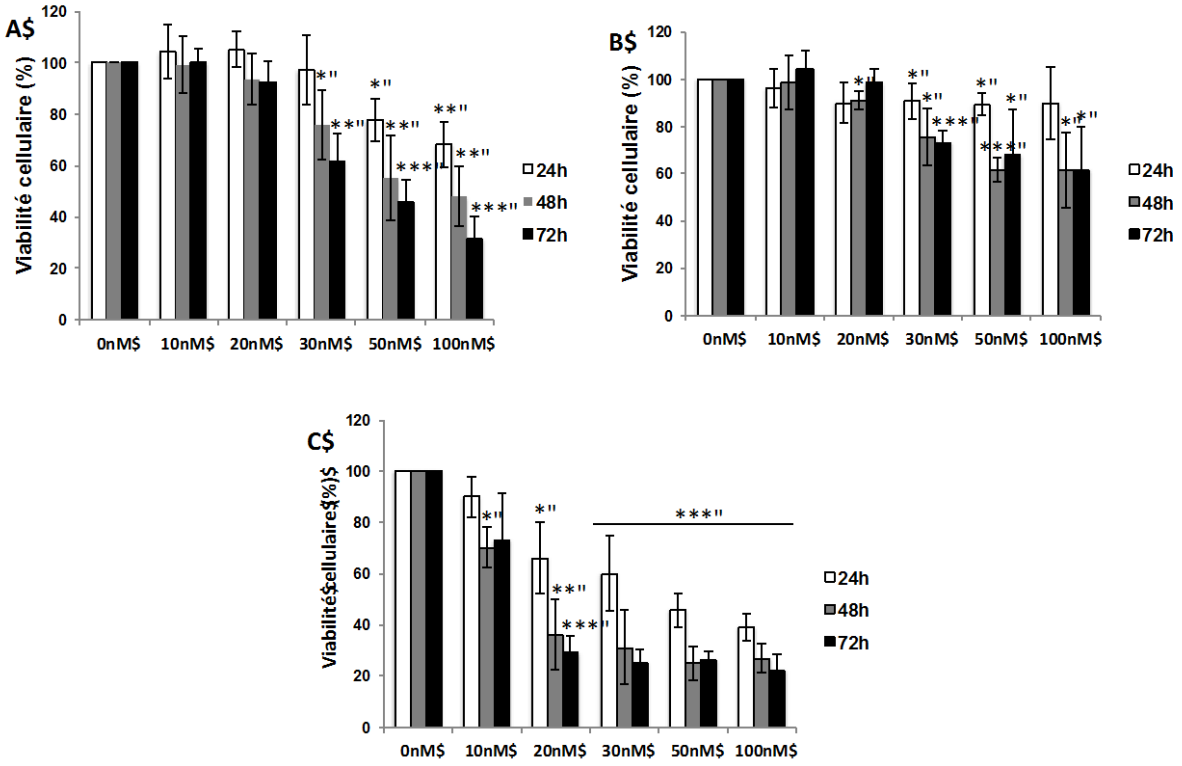


Figure 40 : Viabilité des cellules de cancer du sein traitées à l'UNBS1450

*Les cellules MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) et VCREMS (C), ont été traitées en phase exponentielle (soit 24h après ensemencement) avec différentes concentrations d'UNBS1450 pendant 24 h, 48 h ou 72 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test colorimétrique au XTT au cours de 3 expériences indépendantes. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 1 – Sidak comparé aux contrôles respectifs.*

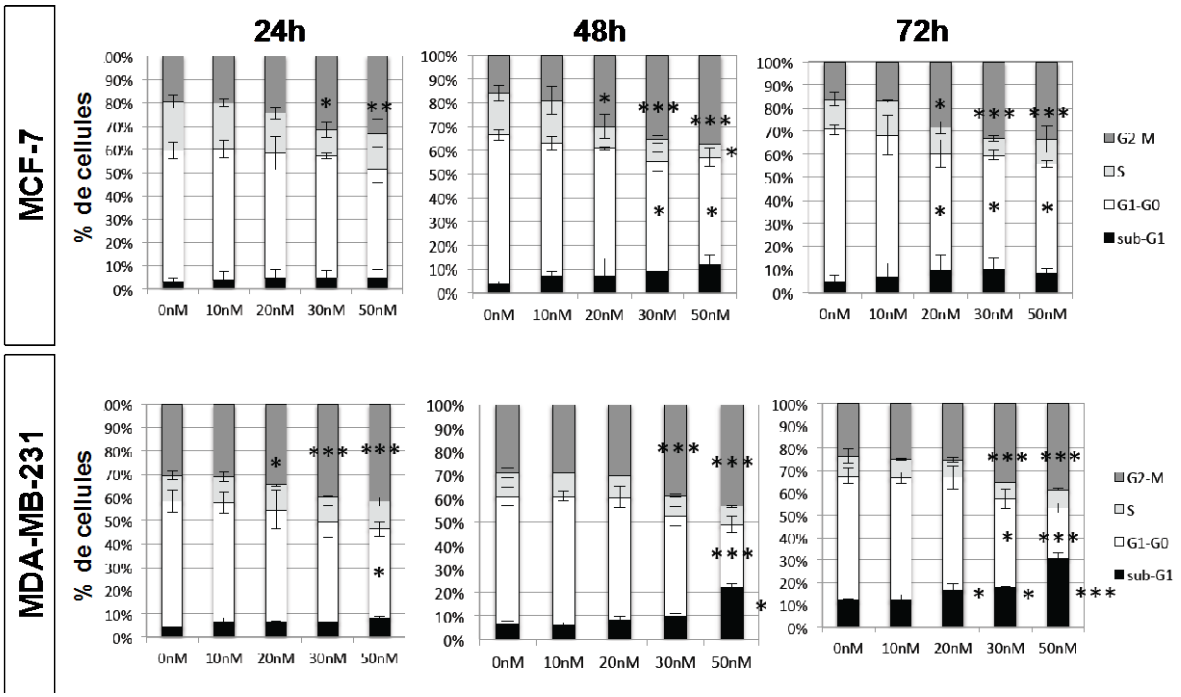
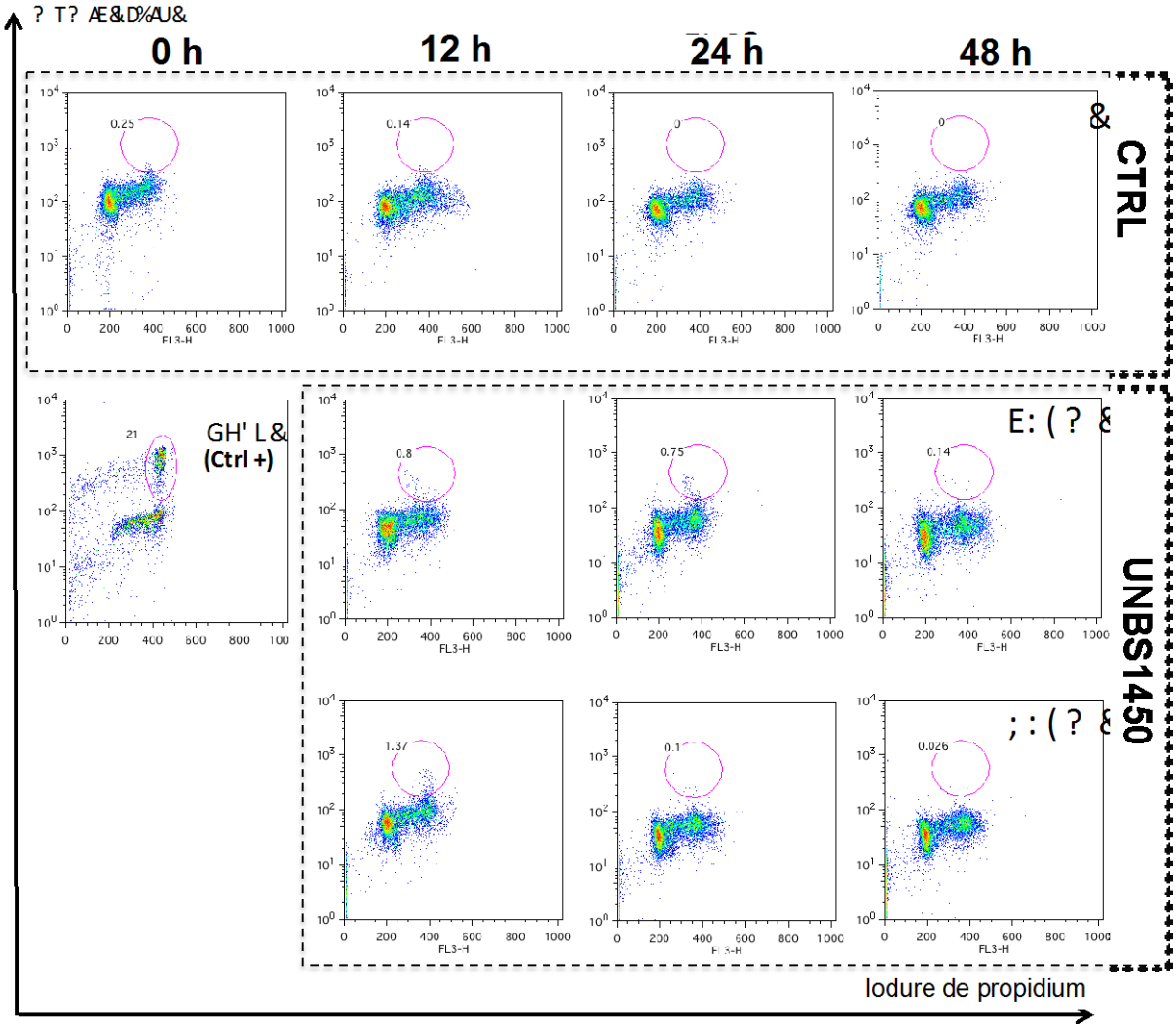


Figure 41 : Augmentation de la phase G2/M lors de traitement avec l'UNBS1450

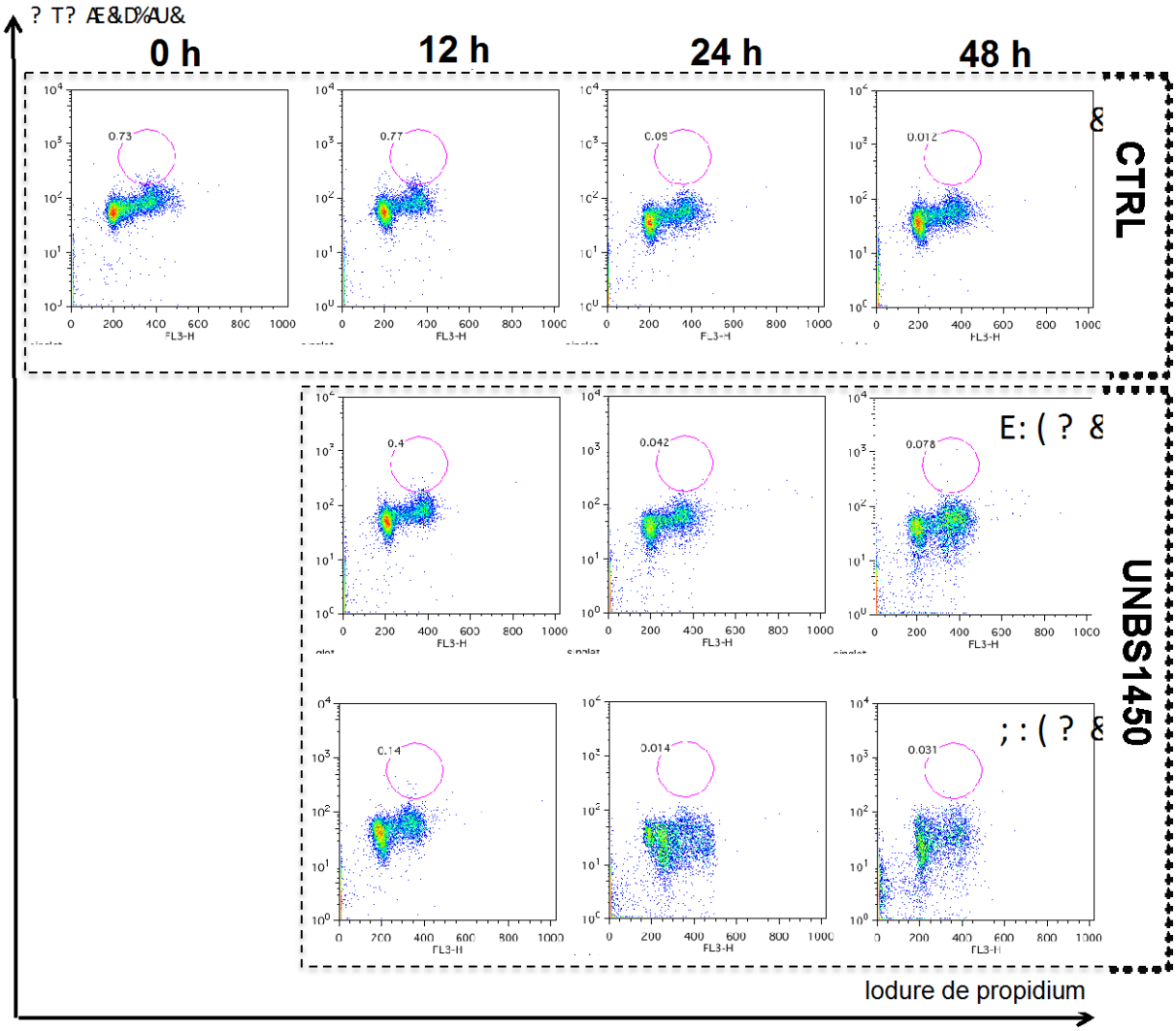
*Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été traitées avec différentes concentrations d'UNBS1450 pendant 24 h, 48 h et 72 h. Le cycle cellulaire analysé par cytométrie après marquage des cellules, traitées ou non, avec l'iodure de propidium, un agent intercalant permet la quantification du pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle. Les résultats représentent la moyenne +/- ES (erreur standard) de 3 expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; **** : p < 0,0001 par ANOVA 1 – Sidak, comparé aux contrôles respectifs.*

A



(La Légende de la figure se trouve sur la page suivante)

B



(La Légende de la figure se trouve sur la page suivante)

C

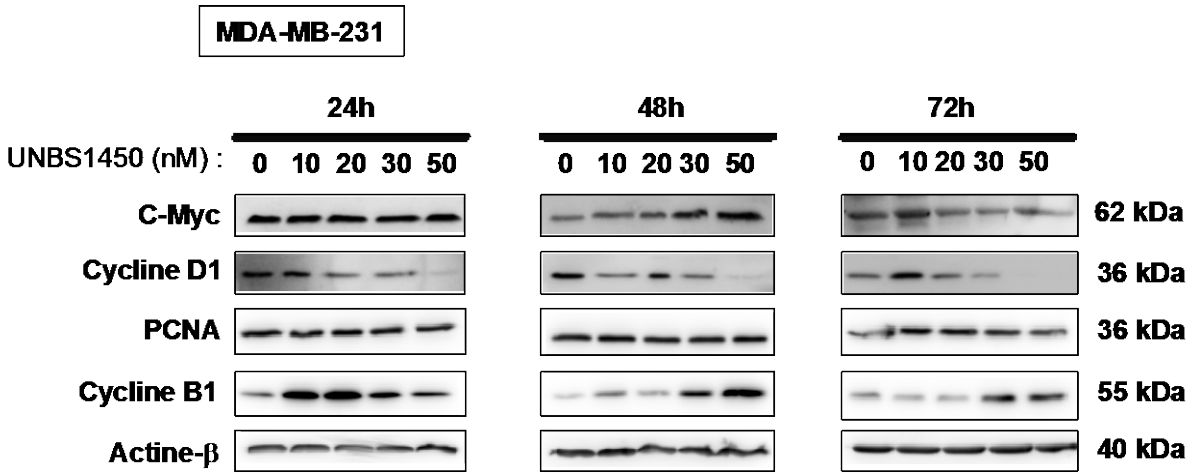


Figure 42 : Augmentation du nombre de cellules en G2 lors de traitement à l'UNBS1450.

Les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) ont été traitées avec différentes concentrations d'UNBS1450 pendant 12 h, 24 h, 48 h et 72 h. Les culots cellulaires ont été fixés dans une solution de CytoWash/CytoPerm, et marqués avec un anticorps monoclonal (MPM-2), dirigé contre des phosphorylations des séquences protéiques LTPLK et FTPLQ fortement présentes au cours de la mitose (211), couplé à un marquage à l'iodure de propidium permettant une analyse du cycle cellulaire. Les cellules ainsi co-marquées ont été analysées par cytométrie de flux. Des cellules U937 traitées avec 10μM de diallylpolysulfide (DAS4) (A) (72) sont utilisées comme contrôle positif du blocage des cellules en mitose. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. (C) Analyse de différents marqueurs du cycle cellulaire par western blot après traitement des cellules MDA-MB-231 à l'UNBS1450. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

DISCUSSION

1. Mcl-1 est une cible des glycosides cardiaques

1.1. Mcl-1 est une cible précoce et ubiquitaire des glycosides cardiaques

Mcl-1 est une protéine très finement régulée, de son expression à la protéine elle-même. Dans notre étude, une diminution de l'expression de Mcl-1 a été mise en évidence après traitement à l'UNBS1450 à 20 nM, à partir de 6 h pour la lignée U937 et 12 h pour la lignée Jurkat (Figure 14). Nos résultats concernant les cellules U937 sont en accord avec ceux présentés par Juncker *et al.* (127), montrant un effet cytotoxique de l'UNBS1450 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire pour les lignées U937 et Jurkat, ainsi qu'une diminution précoce de Mcl-1 dans la lignée U937. Cependant, dans cette précédente étude, ces effets précoces sur Mcl-1 n'avaient pas été démontrés dans la lignée Jurkat. D'après la littérature, l'ouabaïne (186) tout comme la digitoxine (185), permettent, quant à elles, de diminuer l'expression de Mcl-1 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans des lignées du cancer du poumon. Ces premiers résultats montrent que l'effet l'UNBS1450 cible de façon précoce et préférentielle Mcl-1 et suggèrent que cette propriété soit commune à tous les glycosides cardiaques. Partant de cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'UNBS1450 sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, hétérogènes par leur origine et par leur expression basale des trois protéines anti-apoptotiques testées (Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL) (Figure 15). Pour des traitements de ces lignées cellulaires à des concentrations correspondantes à leur IC50 (Tableau 9), la protéine Mcl-1 est affectée alors que Bcl-2 ne l'est pas ou peu. La modulation de Bcl-xL est, quant à elle, liée au contexte cellulaire. Cet effet sur l'expression de la protéine Mcl-1, nous amène à évaluer si un tel effet est induit par d'autres cardénolides, et plus généralement par les glycosides cardiaques. A ce jour, peu de publications mettent en évidence l'effet des glycosides cardiaques sur la modulation des protéines de la famille Bcl-2. Dans le cas de Mcl-1, l'ouabaïne et la digitoxine diminuent son expression dans les cancers du poumon (185, 186), tandis que les bufadienolides, la bufaline, la bufotaline et la gamabufotaline diminuent son expression dans les cancers du sein et les adénocarcinomes (142, 188). Ces résultats suggèrent que Mcl-1 est une protéine jouant un rôle central dans les effets induits par les GCs. L'étude de l'apoptose et de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 lors de traitements avec trois autres cardénolides (ouabaïne, digoxine et digitoxine) et deux bufadiénolides (cinobufagine et proscillaridine A) a mis en évidence que dans tous les cas, ces composés induisent l'apoptose à des concentrations de

l'ordre du nanomolaire et qu'ils diminuent fortement l'expression de Mcl-1, de Bcl-xL (mais de façon moindre pour les bufadiénolides), et malgré une forte induction de l'apoptose, Bcl-2 n'est pas ou peu diminuée (Figure 17).

Ces premiers résultats nous permettent de montrer que Mcl-1 est une cible ubiquitaire des glycosides cardiaques dans la majorité des lignées cellulaires cancéreuses à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. L'UNBS1450 et la proscillaridine A apparaissent comme les composés les plus actifs.

1.2. L'UNBS1450 diminue l'expression de la protéine Mcl-1 *via* un mécanisme impliquant une diminution de la stabilité protéique et le protéasome

Dans notre étude, l'UNBS1450 et l'ouabaïne ont été utilisés comme substances représentatives des GCs afin de déterminer les mécanismes par lesquels les glycosides cardiaques peuvent réguler l'induction de l'apoptose ainsi que la dégradation de Mcl-1.

L'étude de l'expression de l'ARNm de Mcl-1 après traitement n'a pas montré d'effet significatif de l'UNBS1450 sur la transcription du gène *Mcl-1*. Ces résultats ont été confirmés par des analyses par puce à ADN dans la lignée U937 (Figure 19), qui ont montré que l'UNBS1450 n'a pas d'effet sur l'ARNm des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, et plus généralement que ce composé n'a pas d'effet majeur sur le transcriptome. Des études par PCR ont permis de confirmer que l'UNBS1450 n'a pas d'effets sur l'ARNm de la protéine Mcl-1 (Figure 20).

En s'appuyant sur la littérature, nous pouvons noter que Mcl-1 est souvent, dans le cas des glycosides cardiaques, dégradée par un système dépendant du protéasome. Cette dégradation peut être initiée par la présence de dérivés réactifs de l'oxygène, dans le cas d'un traitement à l'ouabaïne (186), ou dépendant de l'activation de la GSK-3β pour le traitement avec la digitoxine (185). Cependant, le protéasome n'est pas toujours impliqué. En effet, nos résultats sont contraires aux observations faites avec certains bufadiénolides, qui montrent que l'inhibition de la voie STAT3 peut être aussi responsable de la diminution de Mcl-1 (142).

Pour la suite de nos études, nous nous sommes focalisés sur la régulation de la protéine Mcl-1. Les précédentes observations tendent à montrer que l'UNBS1450 régule Mcl-1 au

niveau de la protéine. Les expériences réalisées en présence de l'inhibiteur de la synthèse protéique (CHX) suggèrent que la stabilité de Mcl-1 est affectée par l'UNBS1450. En effet, la comparaison de la stabilité de la protéine Mcl-1 lors d'un traitement au CHX avec ou sans co-traitement avec l'UNBS1450 montre une différence significative de stabilité (Figure 21). Cette observation doit cependant être validée et le mécanisme par lequel cette protéine est dégradée doit être déterminé. Par conséquent, l'expression de Mcl-1 a été étudiée après un co-traitement avec l'UNBS1450 et un inhibiteur du protéasome (MG132). Les résultats ont montré que l'inhibition du protéasome prévient la diminution de la protéine Mcl-1 induite par le traitement avec l'UNBS1450. Ces résultats conduisent à conclure que l'UNBS1450 induit une dégradation de la protéine Mcl-1 *via* le protéasome (Figure 22).

Les protéines de la famille Bcl-2 étudiées peuvent être des substrats des caspases (93, 212, 213). Afin de vérifier l'implication des caspases dans la dégradation précoce de Mcl-1, nous avons utilisé un inhibiteur ubiquitaire de caspases en co-traitement avec l'UNBS1450. Nos observations montrent que ni Mcl-1, ni Bcl-xL ne sont clivées par les caspases, lorsque nous inhibons l'activité des caspases. Les caspases ne sont pas impliquées dans la dégradation précoce de Mcl-1 et Bcl-xL. Comme attendu, une réversion complète de l'apoptose est observée puisque l'UNBS1450 induit une mort de type apoptotique dans les cellules U937. Ces données sont cohérentes avec les résultats observés précédemment dans notre laboratoire sur les lignées hématopoïétiques où nous avions montré l'induction de l'apoptose dans cette lignée (127).

La dégradation de Mcl-1 par le protéasome peut être initiée par différents facteurs. La séquestration de Mcl-1 peut se faire par la protéine NOXA, la protéine BH3 la plus impliquée dans la dégradation de Mcl-1 et exprimée en cas de stress (214) . Des phosphorylations de Mcl-1 peuvent également conduire à sa dégradation (88). Ces événements conduisent à une ubiquitination de Mcl-1 par les ligases Trim7, SCFβ-TrCP, E3 SCF^{FBW7} ou Mule, ou encore en cas de mitose prolongée par APC/C^{Cdc20} (25, 88).

Nous avons étudié l'implication et l'expression de NOXA lors de traitements avec l'UNBS1450 (Figure 23). Sur la base d'une analyse cinétique, nous avons montré que NOXA est induite à partir de 12 h de traitement alors que l'expression de l'ARNm est induite à partir de 10 h. Cependant, dans notre cas, son expression ne débute qu'après la dégradation précoce de Mcl-1. Ces résultats signifient que le rôle de NOXA n'est pas responsable de la dégradation précoce de Mcl-1, mais pourrait amplifier les phénomènes apoptotiques. Selon la

littérature, la protéine Mcl-1 pourrait être dégradée suite à l'activation de phosphorylations, permettant à Mcl-1 d'être ubiquitinée puis dégradée par le protéasome.

Dans cette partie de notre étude, nous avons démontré que l'UNBS1450 induit une dégradation précoce de Mcl-1, au niveau de la protéine et non pas de sa transcription. Ce mécanisme implique le protéasome, mais n'est lié ni à l'activation des caspases, ni à l'expression de NOXA.

1.3. La diminution de Mcl-1 régule les effets induits par l'UNBS1450 sur l'apoptose

L'UNBS1450 ainsi que les cinq autres glycosides cardiaques étudiés induisent une dégradation précoce de Mcl-1. De manière à déterminer si Mcl-1 joue un rôle décisif dans l'induction de l'apoptose par cette famille de composés, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle en modifiant l'expression de Mcl-1, par transfection de deux plasmides permettant de surexprimer Mcl-1: l'un exprimant Mcl-1 de type sauvage, et l'autre muté au niveau des sites d'ubiquitinations de Mcl-1 empêchant ainsi l'ubiquitination de la protéine et sa dégradation par le protéasome.

Comme les cellules U937 ne sont pas un bon système pour la transfection et que la lignée Jurkat ne maintient pas la surexpression de Mcl-1 (Figure 25), cette expérience a été réalisée sur la lignée SH-SY5Y, qui exprime Mcl-1 de façon similaire aux lignées U937 et Jurkat (Figure 15) et qui réagit de la même façon au traitement à l'UNBS1450 (Etudes réalisées dans notre laboratoire).

Ces expériences montrent qu'une surexpression de Mcl-1 WT n'est pas nécessaire pour prévenir la mort cellulaire dans la lignée SH-SY5Y. Ces observations ont été démontrées pour l'ouabaïne qui est capable de diminuer Mcl-1 même quand cette protéine est surexprimée (186). Ces résultats valident le fait que Mcl-1 est une cible préférentielle des glycosides cardiaques, notamment des cardénolides, car sa dégradation se fait de façon indépendante de son expression basale.

Cependant, lorsque les cellules sont transfectées avec la protéine Mcl-1 mutée sur ses zones d'ubiquitination, la dégradation de Mcl-1 par la protéasome ne peut se produire, ce qui

entraine une protection des cellules contre l'induction de l'apoptose comme le montre l'analyse de la morphologie nucléaire et l'observation de la réduction du clivage des pro-caspases-3 et -7 dans la lignée SH-SY5Y (Figure 26). Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature, montrant que l'inhibition de la dégradation de Mcl-1 par le protéasome, en utilisant le bortezomide, protège les cellules contre la mort par apoptose induite par le Taxol (215). Même si Mcl-1 est sensible au traitement, cette protéine joue donc un rôle majeur dans l'initiation de l'apoptose.

Ces résultats confirment l'importance de Mcl-1 dans l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450, notamment dans les formes résistantes des cancers, comme déjà démontré dans la littérature (216). La protection de Mcl-1 contre sa dégradation par le protéasome a été confirmée par l'utilisation de MG132 pour inhiber la dégradation de Mcl-1 lors d'un traitement avec l'UNBS1450 dans la lignée SH-SY5Y. Nous observons que la présence de Mcl-1, suite au traitement au MG132, permet de protéger les cellules SH-SY5Y de la mort cellulaire comme observé précédemment après expression du plasmide Mcl-1 KR (Figure 27).

Nous avons montré que Mcl-1 joue un rôle central dans l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450 puisqu'une inhibition de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome protège les cellules SH-SY5Y de la mort par apoptose induite par l'UNBS1450.

1.4. Les glycosides cardiaques sensibilisent les cellules à l'induction de l'apoptose par TRAIL

Les glycosides cardiaques apparaissent comme une alternative intéressante pour sensibiliser les cancers résistants aux traitements conventionnels. Tel TRAIL, connu comme étant un inducteur physiologique de l'apoptose extrinsèque. En effet, il a été démontré qu'un traitement à l'ouabaïne permettait de diminuer l'expression de Mcl-1 et qu'un co-traitement associant l'ouabaïne et TRAIL engendre une induction accrue de l'apoptose. L'ouabaïne permet effectivement de sensibiliser les cellules au traitement par TRAIL dans les lignées cellulaires cancéreuses du poumon (186), tout comme la digitoxine dans des lignées de glioblastome (203) et les bufadienolides dans les cancers du sein *via* l'inhibition de STAT3/Mcl-1 (142) et dans les adénocarcinomes *via* Bid et STAT1 (188).

Les études préliminaires de co-traitement avec TRAIL et l'UNBS1450 ou l'ouabaïne menées au cours de notre étude ont montré une sensibilisation au traitement avec TRAIL lorsque l'UNBS1450 et l'ouabaïne sont utilisés à des concentrations non apoptotiques, respectivement de 10 nM et 50 nM tels que nous l'observons dans la littérature (Figure 28). Il reste cependant à déterminer dans notre cas si la dégradation de Mcl-1 joue un rôle déterminant dans l'effet synergique observé, comme pour d'autres GCs.

2. Implication des voies ioniques et non-ioniques

Les GCs ont la particularité de se fixer à la pompe NKA pour induire l'activation de deux voies principales. La première est la voie ionique, induisant indirectement une modification du calcium intracellulaire. La seconde, appelée la voie non-ionique, est, quant à elle, liée au signalosome *via* l'activation ou la modulation de différentes kinases telle que Src (217).

2.1. Evidence de l'absence d'implication de la voie ionique dans les effets induits par l'UNBS1450

De manière à déterminer laquelle de ces deux voies est impliquée dans les effets induits par l'UNBS1450, notre étude a tout d'abord consisté à déterminer l'implication du calcium intracellulaire lors d'un traitement avec l'UNBS1450. Les résultats n'ont pas mis en évidence la mobilisation du calcium par les cellules traitées à l'UNBS1450. La chélation du calcium intra- ou extracellulaire par l'utilisation de chélateurs de calcium (204) n'a pas influencé les effets induits par l'UNBS1450 ou par l'ouabaïne (Figure 30) tant au niveau de l'induction de l'apoptose qu'au niveau de la dégradation de Mcl-1. Ces résultats suggèrent que l'induction de l'apoptose par les GCs est liée à l'induction de la voie non-ionique. D'après la littérature, les effets anticancéreux des GCs sont souvent associés à la voie non-ionique *via* l'implication de kinases (3). Nous avons donc ensuite vérifié l'implication de la voie non-ionique et notamment l'importance de l'activation des kinases du signalosome suite à la fixation de glycosides cardiaques sur la pompe NKA.

2.2. Implication de la voie ionique dans les effets induits par l'UNBS1450

Il est connu que l'activation de la pompe NKA peut, soit activer la voie ionique et les flux de calcium, soit activer les kinases du signalosome. Dans le but de démontrer l'implication de

kinases en aval de l'activation de la pompe NKA dans la régulation de la voie non-ionique, nous avons exploré les effets des inhibiteurs de principales kinases qui peuvent intervenir dans le signalosome activé par la fixation des GCs sur la pompe NKA (208). Les travaux réalisés ont mis en évidence que l'inhibition de l'activité de la plupart de ces kinases diminue faiblement l'apoptose induite par l'UNBS1450, sans jamais conduire à une réversion complète (Figure 31). Ces résultats nous ont menés à chercher un mécanisme en amont de cette activation des kinases. La réversion partielle de l'apoptose suggère que l'inhibition d'une seule kinase ne peut pas être suffisante pour bloquer les effets de l'UNBS1450, et par conséquent que les effets de ce composé s'appuient sur l'activation simultanée de plusieurs kinases. Afin de prouver cette hypothèse, il serait important de vérifier si l'activité de ces kinases peut être modulée par l'UNBS1450 et si l'apoptose induite par cette molécule peut être modulée par la combinaison de plusieurs inhibiteurs de kinases. Dans le cas de l'ouabaïne, le co-traitement par des inhibiteurs de kinases reste sans effet, suggérant ainsi que les mécanismes impliqués lors du traitement à l'ouabaïne sont dépendants d'autres kinases ou encore d'autre paramètres qui restent à être étudiés.

Il est possible que ces kinases soient potentiellement impliquées en aval d'un premier évènement. Nous proposons donc d'étudier des événements se produisant en amont, dont probablement l'activation d'une autre famille de kinases.

La chélation du calcium lors d'un traitement avec l'UNBS1450 ne bloque pas les effets de ce composé sur l'apoptose et sur la dégradation de Mcl-1. L'inhibition des kinases, quant à elle, diminue faiblement l'induction de l'apoptose mais n'affecte pas la modulation de Mcl-1 induite par l'UNBS1450. Ces résultats n'excluent cependant pas l'implication d'autres mécanismes liés à la voie non-ionique.

2.3. La modulation du cholestérol est impliquée dans le mécanisme d'action de l'UNBS1450

La voie Src peut-être activée lorsque la pompe NKA fixe un GC (208). Lorsque la pompe NKA, qui séquestre Src au niveau des radeaux lipidiques se lie à son ligand, la kinase Src est libérée. Cette kinase pourra alors activer à son tour le signalosome y compris plusieurs kinases (*i.e.* Ras/ERK1/2) (208).

D'après la littérature, un changement de la teneur de cholestérol membraire peut altérer l'activité modulatoire de la pompe NKA sur Src, et par conséquent inhiber l'activation de Src par les GCs. Dans nos conditions expérimentales, un co-traitement avec l'UNBS1450 et le MBC, un modulateur du cholestérol membranaire (208) a conduit à une prévention très forte de l'induction de l'apoptose et de la diminution de Mcl-1 normalement observées lors d'un traitement à l'UNBS1450. Cependant, ce même chélateur reste sans effet sur l'apoptose et la dégradation de Mcl-1 induites par l'ouabaïne (Figure 32). Cette différence de modulation des effets du MBC induits par l'UNBS1450 et l'ouabaïne suggère que le mécanisme d'action de l'UNBS1450 dépend du niveau de cholestérol. Cependant, cette implication du cholestérol n'est valable que pour des concentrations d'UNBS1450 inférieures à 100 nM (Figure 33). En effet, pour des concentrations supérieures, le MBC n'est plus capable de réverser les effets pro-apoptotiques de l'UNBS1450 et suggère que dans ces conditions, l'UNBS1450 utilise d'autres voies de signalisation pour induire la mort cellulaire par apoptose.

Ces résultats ont été confortés en utilisant deux autres modulateurs du cholestérol (Figure 34). D'une part, la filipine III, un composé se fixant sur les molécules de cholestérol membranaires et inhibant la perméabilité membranaire et l'endocytose n'induit aucune modification significative des effets de l'UNBS1450 ou de l'ouabaïne. Contrairement au MBC, la filipine III ne permet pas la déplétion du cholestérol membranaire, mais empêche seulement les processus d'endocytose par sa fixation sur les molécules de cholestérol, sans détruire les radeaux lipidiques comme observé dans le cas de traitement avec le MBC.

L'utilisation d'un second modulateur de cholestérol, le U18666A en co-traitement avec l'UNBS1450 ou l'ouabaïne augmente le niveau d'apoptose induite par ces deux GCs par effet synergique. Comme le U18666A est connu pour inhiber le trafic du cholestérol et ainsi augmenter sa concentration lysosomale, il semblerait que cette augmentation du cholestérol lysosomal soit impliquée dans l'amplification des effets pro-apoptotiques de ces deux GCs. Comme cette augmentation est plus significative dans le cas de l'ouabaïne, il serait intéressant

d'étudier les effets de l'ouabaïne sur le lysosome, de manière à déterminer comment cet organite est touché par un traitement avec ce cardénolide. L'effet synergique moins marqué observé dans le cas de l'UNBS1450 suggère que ce glycoside cardiaque implique préférentiellement le cholestérol membranaire (radeaux lipidiques) que le cholestérol lysosomial dans son mécanisme d'action pro-apoptotique. Dans la littérature, il a été montré que l'ouabaïne pouvait induire l'internalisation de la pompe NKA et sa dégradation par le lysosome, montrant qu'il est connu que l'ouabaïne peut avoir des effets sur cet organite. De plus, il faut noter que ces effets sont insensibles à l'utilisation d'inhibiteurs de Src (218).

2.4. Evidences de l'implication de Src dans les effets induits par l'UNBS1450

D'après la littérature, l'ouabaïne permet l'activation de Src et ERK, notamment pour ses effets prolifératifs à faible concentration (219), aussi que d'autres kinases (220).

Afin de déterminer si Src est impliqué, en amont dans l'activation du signalosome, dans le mécanisme d'action de l'UNBS1450 et/ou de l'ouabaïne, nous avons utilisé un inhibiteur de Src (PP2) en co-traitement avec ces deux cardénolides. Un tel co-traitement avec l'inhibiteur de Src (PP2) induit une réversion partielle de l'induction de l'apoptose par l'UNBS1450, mais n'affecte pas celle induite par l'ouabaïne dans les lignées Jurkat et U937. Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés après l'utilisation du dépléteur de cholestérol membranaire (MBC) sauf pour la concentration de 100 nM (Figure 35). En effet, PP2 induit une modulation constante (environ 50%) de l'effet pro-apoptotique de l'UNBS1450, pour des concentrations croissantes d'UNBS1450 et cet effet est maintenu pour des concentrations élevées de ce GC dans les lignées U937 et Jurkat étudiées (Figure 36). Ces résultats suggèrent que l'UNBS1450 peut induire l'apoptose en utilisant plusieurs voies notamment la voie impliquant Src, car son inhibition par PP2 diminue l'apoptose induite par l'UNBS1450.

Ces observations seront confirmées par l'analyse de l'expression et de l'activation de la kinase Src, ainsi que des kinases situées en aval de Src lors de traitement avec l'UNBS1450 et de co-traitements avec le MBC.

Contrairement à l'UNBS1450, l'ouabaïne semble induire ses effets par l'intermédiaire du lysosome, et ainsi, le fait que l'inhibiteur de Src n'ait pas d'effet sur ses effets pro-apoptotique, semble être cohérent avec la littérature, qui montre que l'internalisation et la

destruction de la pompe NKA par le lysosome, induit par l'ouabaïne, est indépendante de Src (218).

L'ensemble de ces résultats suggère que le mécanisme d'action pro-apoptotique de l'UNBS1450 implique Src et potentiellement son interaction avec la pompe NKA. Pour de faibles concentrations d'UNBS1450 (inférieures à 100 nM), le cholestérol membranaire est également impliqué. *A contrario*, le mécanisme d'action de l'ouabaïne implique le cholestérol lysosomal mais pas Src.

3. Analyse de c-Myc et études préliminaires

3.1. Régulation de c-Myc

c-Myc est connue pour être une cible des GCs dans la lignée PC3 (179). Dans le cas des cellules U937 traitées à l'UNBS1450, les résultats de puce à ADN (Figure 19), de PCR en temps réel (Figure 37) ont mis en évidence une diminution de c-Myc au niveau de son ARNm. L'analyse par Western blot conforte ces résultats au niveau protéique puisque l'UNBS1450 induit une diminution précoce de l'expression de la protéine c-Myc à partir de 4 h de traitement.

L'ensemble de ces résultats montre que l'UNBS1450 régule l'expression de la protéine c-Myc au niveau de son ARNm. Cette analyse est cohérente avec la littérature qui montre que l'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc (123), de plus, il a été démontré que l'oléandrine, ainsi que la digitoxine diminuaient aussi l'ARNm de c-Myc (140). L'ensemble des observations démontre que c-Myc est une cible des glycosides cardiaques, et pourrait être la protéine responsable de leur effet cytostatique.

3.2. Analyse du temps de traitement nécessaire avec l'UNBS1450 pour induire ses effets modulateurs

Dans cette étude nous avons voulu tester le temps minimum de traitement continu nécessaire pour induire des effets irréversibles tels que l'apoptose (Figure 38) et la modulation de c-Myc et Mcl-1 (Figure 39). Nous avons observé que les effets de l'UNBS450 sur la dégradation de Mcl-1 commencent à être irréversibles après 8 h de traitement, et de façon plus importante après 12 h. Les effets sur c-Myc sont complètement irréversibles après 10 h, ainsi

que l'induction de l'apoptose, comme nous avons confirmé par l'étude de la morphologie nucléaire, de l'induction des caspases, par MTR,

4. L'UNBS1450 a un effet cytostatique en bloquant les cellules du sein en phase G2/M

Les patientes traitées avec de la digitoxine pour des problèmes cardiaques développaient plus fréquemment des tumeurs bénignes que malignes contrairement à ce qui est observé chez des patientes sans traitement à la digitoxine. Nous avons voulu explorer le potentiel de l'UNBS1450 dans le cas de traitement du cancer du sein (125).

L'étude des effets de l'UNBS1450 dans les lignées cancéreuses mammaires étudiées montre une diminution du métabolisme de ces cellules à des concentrations de l'ordre du nanomolaire après 24 h. Ces cellules apparaissent cependant plus résistantes au traitement que les lignées leucémiques et neuroblastiques précédemment étudiées (Tableau 9). Parmi les modèles de cancer du sein étudiés, la lignée VCREMS semble particulièrement sensible au traitement à l'UNBS1450 (Figure 40). L'étude du cycle cellulaire sur les lignées MCF-7 et MDB-MB-231 traitées à l'UNBS1450 montre une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M. Ces résultats sont confirmés par l'immunomarquage avec MPM-2, un anticorps permettant de cibler les phosphorylations présentes au cours de la mitose, qui couplé à une analyse du cycle cellulaire permet d'estimer la proportion de cellules en phase M (Figure 42). Cette observation est en adéquation avec la littérature qui a montré que certains glycosides cardiaques ont un effet sur les phases du cycle cellulaire notamment sur la phase G2/M (221). Il semblerait que les glycosides cardiaques exercent leurs effets en modulant la phase G2/M des cellules traitées. Ces effets de modulation ont été validés par la modification d'expression de plusieurs protéines-clé impliquées dans le cycle cellulaire telles que la cycline B1 ou D1. Il a été démontré que les GCs, notamment l'UNBS1450, peuvent perturber la formation du cytosquelette et la cytocinèse, induisant un blocage en fin de mitose, et pouvant expliquer le blocage observé dans notre cas en phase M (171). Dans de futures expériences il serait intéressant d'analyser l'organisation de l'actine après traitement avec l'UNBS1450, par microscopie à fluorescence. Afin de déterminer si l'effet sur l'actine induit par les glycosides cardiaques a un rôle direct sur leur capacité à diminuer la prolifération des cellules cancéreuses.

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

Conclusions

Notre étude a montré que la modulation de Mcl-1 par les GCs est ubiquitaire et intervient dans les cellules cancéreuses de différentes origines. Nous avons démontré que l'UNBS1450 induit une dégradation de Mcl-1 au niveau de la protéine, impliquant le protéasome, et que ni NOXA, ni les caspases ne sont responsables de sa dégradation précoce. De plus, notre analyse a montré l'importance de Mcl-1 dans les effets pro-apoptotiques induits par l'UNBS1450, et que la présence de cette protéine pouvait protéger les cellules de l'induction de l'apoptose.

Les effets des GCs sur les cellules pouvent intervenir sur la voie ionique ou non-ionique. Nous avons donc étudié ces deux voies. Nos observations ont permis de conclure que les effets de l'UNBS1450 et de l'ouabaïne sont indépendants du calcium et impliquent la voie non-ionique, comme le suggèrent les observations suivantes :

- le co-traitement de l'UNBS1450 avec différents inhibiteurs de kinases induit une faible inhibition de l'apoptose.
- la modulation du cholestérol membranaire permet de prévenir les effets induits par l'UNBS1450 (induction de l'apoptose et diminution de Mcl-1). La modulation du cholestérol lysosomal semble également moduler les effets pro-apoptotiques de l'ouabaïne.
- l'inhibition de la kinase Src protège les cellules de l'apoptose induite par l'UNBS1450.

Il reste à déterminer si l'activation de Src joue un rôle dans la modulation de Mcl-1 et si le signalosome est impliqué dans les effets pro-apoptotiques de ces GCs.

La Figure 43 représente un modèle hypothétique de l'action de l'UNBS1450.

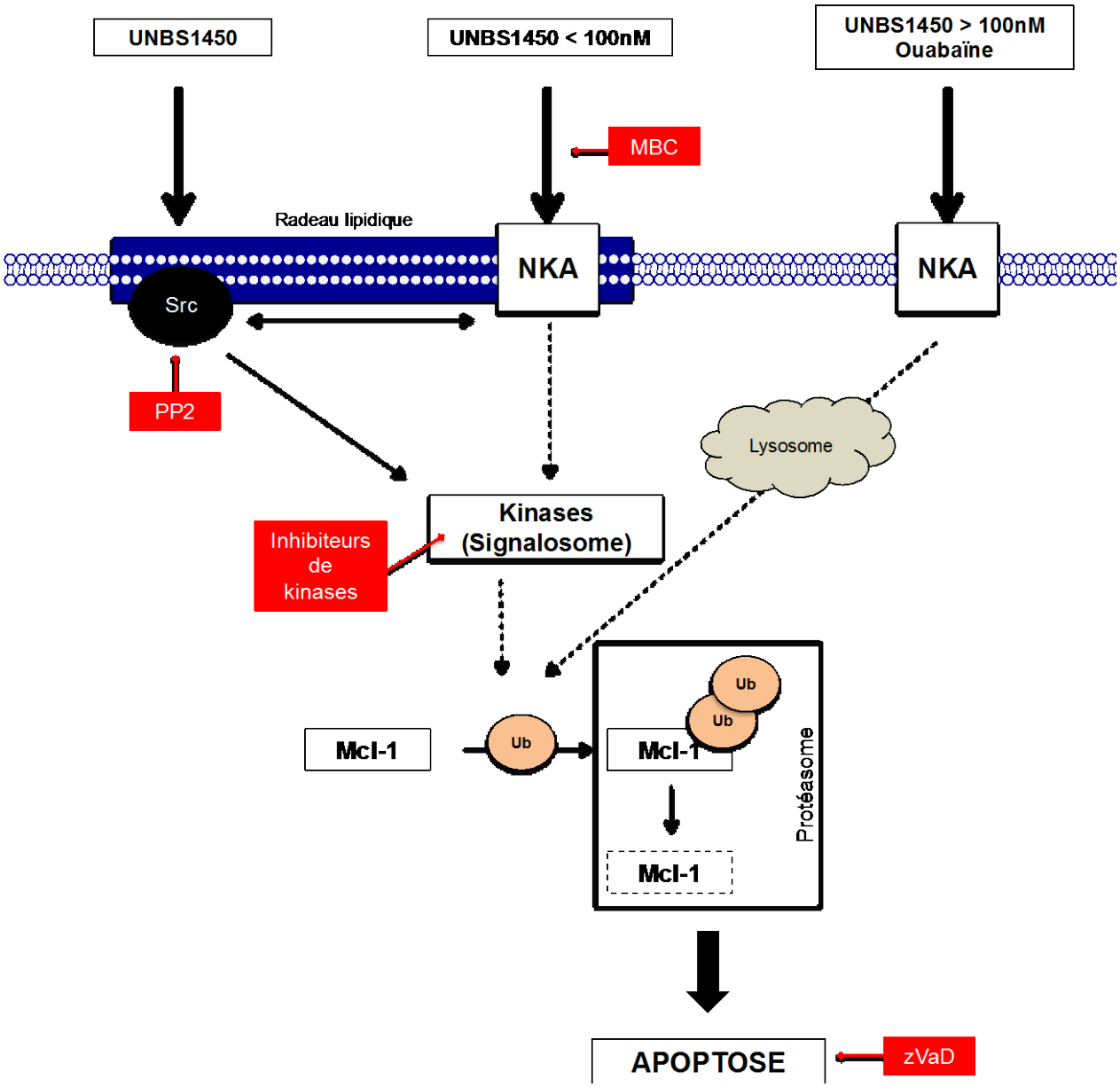


Figure 43 : Modèle hypothétique de l'action de l'UNBS1450 sur l'apoptose

Cette figure représente un modèle hypothétique des mécanismes d'action de l'UNBS1450 par l'intermédiaire de différentes voies. La première voie implique Src, et peut-être inhibée par PP2. La seconde voie, observée pour des concentrations d'UNBS1450 inférieures à 100 nM, implique plus particulièrement l'interaction entre la pompe NKA et Src, ainsi que d'autres kinases ou co-récepteurs. Cette voie est totalement inhibée par l'utilisation de dépléteurs de cholestérol (MBC). La dernière voie concerne l'ouabaïne, ainsi que potentiellement les fortes concentrations d'UNBS1450, qui exercent leurs effets certainement plus en aval. L'ensemble de ces voies hypothétiques d'action résulte en la dégradation de Mcl-1 par le protéasome, et l'induction de la mort des cellules par apoptose.

Dans une autre partie de notre étude nous avons montré que dans la lignée U937, l'UNBS1450 diminue l'expression de c-Myc notamment au niveau de son ARNm ce qui conduit à une diminution du niveau d'expression de la protéine. Des investigations futures pourraient s'appuyer sur cette étude pour déterminer d'une part le rôle de c-Myc dans les effets cytostatiques de l'UNBS1450 et d'autre part par quel mécanisme cette protéine peut-être si précocement modulée (avant Mcl-1).

L'UNBS1450 nécessite plus de 8 h pour induire l'apoptose de façon irréversible. Des traitements de 12 h et 10 h sont nécessaires pour induire la dégradation de Mcl-1 et de c-Myc. Ces résultats suggèrent que ce composé nécessite un temps spécifique afin d'exercer ses effets. Cette information est importante pour l'amélioration de l'efficacité d'autres protocoles de traitement *in vitro*.

Dans la dernière partie, nous avons évalué les effets de l'UNBS1450 sur les cellules du cancer du sein et nous avons démontré que l'UNBS1450 permet de diminuer l'activité métabolique ainsi que l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire conduisant à un blocage des cellules en phase G2 pour des concentrations d'UNBS1450 de l'ordre du nanomolaire. L'expression de c-Myc est faiblement diminuée par ce traitement ce qui suggère l'implication d'autres facteurs dans le blocage des cellules en phase G2.

Perspectives

De nombreuses perspectives découlent de ce projet de thèse.

D'abord, l'étude des mécanismes de régulation de Mcl-1 au niveau de la protéine pourra être réalisée par l'analyse de l'état de phosphorylation de Mcl-1 par Western blot et de l'ubiquitination de cette protéine par immunoprécipitation suite à des traitements avec l'UNBS1450 ou d'autres GCs. L'analyse des quatre majeures ubiquitine ligases impliquées dans l'ubiquitination de Mcl-1 pourra également faire l'objet d'une étude détaillée.

Mcl-1 est l'une des protéines Bcl-2 les plus touchées par l'altération du métabolisme. Comme les GCs, incluant l'UNBS1450, modulent Mcl-1 et induisent des effets sur la mort

cellulaire et ont des effets cytostatiques, la modulation de Mcl-1 pourrait devenir un indicateur intéressant d'autres activités anti-cancéreuses et anti-métaboliques des GCs, peu caractérisées jusqu'alors.

L'expression de Mcl-1 ne semble cependant pas être le facteur unique pour déterminer l'effet du traitement à l'UNBS1450 sur les expressions basales de Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1 ainsi que sur le panel de cellules étudiées. L'élucidation des mécanismes modulateurs impliqués en amont, ainsi que l'importance de l'équilibre entre les protéines de la famille Bcl-2 (y compris les protéines pro-apoptotique Bax et BAK), restent à être déterminée.

L'hypothèse de l'importance de la Na^+/K^+-ATPase comme centre d'un signalosome complexe doit encore être précisée. L'hétérogénéité structurelle des GCs sélectionnés permettra de déterminer les relations structures/fonctions ainsi que les voies de régulation complexes activées spécifiquement en fonction des structures chimiques des GCs de manière à expliquer les différences observées entre l'UNBS1450 et l'ouabaïne, notamment au niveau l'activation de Src. Ces résultats permettront d'établir un lien entre de l'activation du signalosome par les GCs et la dégradation de Mcl-1. De plus il serait intéressant de tester *in vivo* si à des concentrations non apoptotiques, les GCs peuvent amplifier les effets anti-cancéreux de traitements connus, comme observé *in vitro* avec TRAIL. Ou encore si la présence de GCs peuvent amplifier les effets anti-cancéreux d'inhibiteurs spécifiques de Bcl-2 *in vitro* premièrement, puis *in vivo*, ensuite. Cependant, choisir un seul modèle *in vivo* ne sera pas suffisant car selon les espèces l'expression des isoformes des sous-unité alpha de la pompe NKA est variable. En effet les rongeurs expriment les isoformes 1 et 2, et les macaques et chiens les isoformes 1 et 3 (222).

Comme nous avons démontré un effet des GCs sur c-Myc et sur Mcl-1 dans les lignées hématopoïétiques, il serait intéressant de déterminer également les régulateurs de c-Myc impliqués et si ces derniers sont impliqués dans la régulation de Mcl-1 par les GCs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230. Epub 2011/03/08. eng.

2. Pakakasama S, Kajanachumpol S, Kanjanapongkul S, Sirachainan N, Meekaewkunchorn A, Ningsanond V, et al. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. International journal of laboratory hematology. 2008 Aug;30(4):286-91. PubMed PMID: 18665825.

3. Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Orta ML, Maldonado-Navas D, Garcia-Dominguez I, Lopez-Lazaro M. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. BioMed research international. 2014;2014:794930. PubMed PMID: 24895612. Pubmed Central PMCID: 4033509.

4. Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. Haematologica. 1997 Jan-Feb;82(1):64-6. PubMed PMID: 9107085.

5. Berois N, Osinaga E. Glycobiology of neuroblastoma: impact on tumor behavior, prognosis, and therapeutic strategies. Frontiers in oncology. 2014;4:114. PubMed PMID: 24904828. Pubmed Central PMCID: 4033258.

6. Klepin HD, Rao AV, Pardee TS. Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Older Adults. J Clin Oncol. 2014 Jul 28. PubMed PMID: 25071138.

7. Zhang S, Kipps TJ. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Annual review of pathology. 2014;9:103-18. PubMed PMID: 23987584. Pubmed Central PMCID: 4144790.

8. Jaffe ES, Zarate-Osorno A, Kingma DW, Raffeld M, Medeiros LJ. The interrelationship between Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas. Ann Oncol. 1994;5 Suppl 1:7-11. PubMed PMID: 8172822.

9. Lad DP, Malhotra P, Varma S. Chronic lymphocytic leukemia: inception to cure: are we there? Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion. 2013 Mar;29(1):1-10. PubMed PMID: 24426325. Pubmed Central PMCID: 3572254.

10. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European L. Chronic myeloid leukaemia. Lancet. 2007 Jul 28;370(9584):342-50. PubMed PMID: 17662883.

11. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc. 2002 Jul-Aug;22(4):911-34. PubMed PMID: 12110723.

12. Feng B, Guo YW, Huang CG, Li L, Chen RH, Jiao BH. 2'-epi-2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of Cerbera manghas L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Chem Biol Interact. 2010 Jan 5;183(1):142-53. PubMed PMID: 19874809. Epub 2009/10/31. eng.

13. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. Nat Rev Cancer. 2003 Mar;3(3):203-16. PubMed PMID: 12612655.

14. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. Virchows Arch. 2014 Jul;465(1):1-14. PubMed PMID: 24878755.

15. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World journal of clinical oncology. 2014 Aug 10;5(3):412-24. PubMed PMID: 25114856. Pubmed Central PMCID: 4127612.

16. Belmar J, Fesik SW. Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer. Pharmacology & therapeutics. 2014 Aug 27. PubMed PMID: 25172548.

17. Leidy J, Khan A, Kandil D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. Arch Pathol Lab Med. 2014 Jan;138(1):37-43. PubMed PMID: 24377810.

18. Colozza M, de Azambuja E, Cardoso F, Bernard C, Piccart MJ. Breast cancer: achievements in adjuvant systemic therapies in the pre-genomic era. Oncologist. 2006 Feb;11(2):111-25. PubMed PMID: 16476832.

19. Bese NS. Radiochemotherapy in the treatment of breast cancer. Clinical oncology. 2009 Sep;21(7):532-5. PubMed PMID: 19464156.

20. Wardell SE, Nelson ER, McDonnell DP. From empirical to mechanism-based discovery of clinically useful Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). Steroids. 2014 Jul 30. PubMed PMID: 25084324.

21. Lamond NW, Younis T. Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2-positive breast cancer: clinical and economic considerations. International journal of women's health. 2014;6:509-21. PubMed PMID: 24876795. Pubmed Central PMCID: 4037302.

22. Adamson CL, Wood AG, Chen J, Barton S, Reutens DC, Pantelis C, et al. Thickness profile generation for the corpus callosum using Laplace's equation. Hum Brain Mapp. 2011 Dec;32(12):2131-40. PubMed PMID: 21305661. Epub 2011/02/10. eng.

23. Mostafa AA, Morris DG. Immunotherapy for Lung Cancer: Has it Finally Arrived? Frontiers in oncology. 2014;4:288. PubMed PMID: 25374843. Pubmed Central PMCID: 4206190.

24. Yano T, Hatogai K, Morimoto H, Yoda Y, Kaneko K. Photodynamic therapy for esophageal cancer. Annals of translational medicine. 2014 Mar;2(3):29. PubMed PMID: 25333005. Pubmed Central PMCID: 4200616.

25. Ediriwickrema A, Zhou J, Deng Y, Saltzman WM. Multi-layered nanoparticles for combination gene and drug delivery to tumors. Biomaterials. 2014 Aug 8. PubMed PMID: 25112935.

26. Brown JR, Porter DL, O'Brien SM. Novel treatments for chronic lymphocytic leukemia and moving forward. American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting. 2014:e317-25. PubMed PMID: 24857119.

27. Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. Trends Pharmacol Sci. 2003 Mar;24(3):139-45. PubMed PMID: 12628359. Epub 2003/03/12. eng.

28. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. Oncogene. 1997 Feb 13;14(6):629-40. PubMed PMID: 9038370. Epub 1997/02/13. eng.

29. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Nov;9(11):910-6. PubMed PMID: 18813291. Epub 2008/09/25. eng.

30. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. Oncogene. 2001 Apr 5;20(15):1803-15. PubMed PMID: 11313928. Epub 2001/04/21. eng.

31. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. J Cell Mol Med. 2003 Jul-Sep;7(3):249-57. PubMed PMID: 14594549. Epub 2003/11/05. eng.

32. Fullard JF, Kale A, Baker NE. Clearance of apoptotic corpses. Apoptosis. 2009 Aug;14(8):1029-37. PubMed PMID: 19291407. Epub 2009/03/18. eng.

33. Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. Biochem Soc Trans. 2000 Feb;28(2):56-61. PubMed PMID: 10816099. Epub 2000/05/18. eng.

34. Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. Faseb J. 1998 Apr;12(6):479-86. PubMed PMID: 9535220. Epub 1998/04/16. eng.

35. Segal-Bendirdjian E, Dudognon C, Mathieu J, Hillion J, Besancon F. [Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]. Bull Cancer. 2005 Jan;92(1):23-35. PubMed PMID: 15689323. Les multiples voies de signalisation de la mort cellulaire: avancees recentes et exploitation therapeutique.

36. Lepore N, Lafontaine DL. [<< Catch me if you can >>: how the structural and functional integrity of eukaryotic RNA molecules is monitored by surveillance mechanisms]. Med Sci (Paris). 2010 Mar;26(3):259-66. PubMed PMID: 20346275. Epub 2010/03/30. << Attrape-moi si tu peux >> : surveillance de l'integrite structurale et fonctionnelle des ARN cellulaires eucaryotes. fre.

37. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):741-52. PubMed PMID: 17717517. Epub 2007/08/25. eng.

38. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. EMBO Rep. 2002 Oct;3(10):944-50. PubMed PMID: 12370207. Pubmed Central PMCID: 1307613. Epub 2002/10/09. eng.

39. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. Science. 2011 Nov 25;334(6059):1081-6. PubMed PMID: 22116877. Epub 2011/11/26. eng.

40. Zhu S, Jin J, Wang Y, Ouyang Z, Xi C, Li J, et al. The endoplasmic reticulum stress response is involved in apoptosis induced by aloe-emodin in HK-2 cells. Food Chem Toxicol. 2012 Mar;50(3-4):1149-58. PubMed PMID: 22210228. Epub 2012/01/03. eng.

41. Treglia AS, Turco S, Ulianich L, Ausiello P, Lofrumento DD, Nicolardi G, et al. Cell fate following ER stress: just a matter of "quo ante" recovery or death? Histol Histopathol. 2012 Jan;27(1):1-12. PubMed PMID: 22127591. Epub 2011/12/01. eng.

42. Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. Physiol Rev. 2011 Oct;91(4):1219-43. PubMed PMID: 22013210. Epub 2011/10/21. eng.

43. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. Int J Cell Biol. 2010;2010:214074. PubMed PMID: 20182529. Pubmed Central PMCID: 2825543. Epub 2010/02/26. eng.

44. Kornmann B. [ERMES, a multifunctional complex connecting endoplasmic reticulum and mitochondria]. Med Sci (Paris). 2010 Feb;26(2):145-6. PubMed PMID: 20188044. Le complexe ERMES : une connexion haut debit entre le reticulum endoplasmique et les mitochondries.

45. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. Antioxid Redox Signal. 2008 Mar;10(3):621-33. PubMed PMID: 18092941. Epub 2007/12/21. eng.

46. Elmore DE, Dougherty DA. Molecular dynamics simulations of wild-type and mutant forms of the Mycobacterium tuberculosis MscL channel. Biophys J. 2001 Sep;81(3):1345-59. PubMed PMID: 11509350. Pubmed Central PMCID: 1301615. Epub 2001/08/18. eng.

47. Rogers TB, Inesi G, Wade R, Lederer WJ. Use of thapsigargin to study Ca2+ homeostasis in cardiac cells. Bioscience reports. 1995 Oct;15(5):341-9. PubMed PMID: 8825036.

48. Huang Y, Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Li J. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways. Mol Cell Biochem. 2014 Sep;394(1-2):1-12. PubMed PMID: 24961950.

49. Cerella C, Diederich M, Ghibelli L. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. Int J Cell Biol. 2010;2010:546163. PubMed PMID: 20300548. Pubmed Central PMCID: 2838366. Epub 2010/03/20. eng.

50. Burdea GC, Jain A, Rabin B, Pellosie R, Golomb M. Long-term hand tele-rehabilitation on the PlayStation 3: benefits and challenges. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2011;2011:1835-8. PubMed PMID: 22254686. Epub 2012/01/19. eng.

51. Williams JJ, Palmer TM. Cavin-1: caveolae-dependent signalling and cardiovascular disease. Biochem Soc Trans. 2014 Apr;42(2):284-8. PubMed PMID: 24646232.

52. Anderson RG. The caveolae membrane system. Annual review of biochemistry. 1998;67:199-225. PubMed PMID: 9759488.

53. Lajoie P, Nabi IR. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. International review of cell and molecular biology. 2010;282:135-63. PubMed PMID: 20630468.

54. George KS, Wu S. Lipid raft: A floating island of death or survival. Toxicol Appl Pharmacol. 2012 Mar 15;259(3):311-9. PubMed PMID: 22289360. Pubmed Central PMCID: 3299927. Epub 2012/02/01. eng.

55. Hueber AO. CD95: more than just a death factor? Nat Cell Biol. 2000 Feb;2(2):E23-5. PubMed PMID: 10655597. Epub 2000/02/03. eng.

56. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol. 1998;16:395-419. PubMed PMID: 9597135. Epub 1998/05/23. eng.

57. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol. 2003 Jan;39(11):615-47. PubMed PMID: 12493639. Epub 2002/12/21. eng.

58. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. Nature. 1996 May 23;381(6580):335-41. PubMed PMID: 8692274. Epub 1996/05/23. eng.

59. Hunter JJ, Parslow TG. A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. J Biol Chem. 1996 Apr 12;271(15):8521-4. PubMed PMID: 8621473. Epub 1996/04/12. eng.

60. Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. Cell Death Differ. 2006 Aug;13(8):1339-50. PubMed PMID: 16763614. Epub 2006/06/10. eng.

61. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan;9(1):47-59. PubMed PMID: 18097445. Epub 2007/12/22. eng.

62. Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. J Cell Sci. 2009 Aug 15;122(Pt 16):2801-8. PubMed PMID: 19795525. Pubmed Central PMCID: 2736138. Epub 2009/10/02. eng.

63. Raghav PK, Verma YK, Gangenahalli GU. Molecular dynamics simulations of the Bcl-2 protein to predict the structure of its unordered flexible loop domain. J Mol Model. 2012 May;18(5):1885-906. PubMed PMID: 21866316. Epub 2011/08/26. eng.

64. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 13;98(6):3012-7. PubMed PMID: 11248023. Pubmed Central PMCID: 30598. Epub 2001/03/15. eng.

65. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):6961-5. PubMed PMID: 1871110. Pubmed Central PMCID: 52213. Epub 1991/08/15. eng.

66. Willimott S, Wagner SD. Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. Biochem Soc Trans. 2010 Dec;38(6):1571-5. PubMed PMID: 21118128. Epub 2010/12/02. eng.

67. Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. J Biol Chem. 1997 May 2;272(18):11671-3. PubMed PMID: 9115213. Epub 1997/05/02. eng.

68. Li ZL, Ueki K, Kumagai K, Araki R, Otsuki Y. Regulation of bcl-2 transcription by estrogen receptor-alpha and c-Jun in human endometrium. Med Mol Morphol. 2013 May 11. PubMed PMID: 23665993. Epub 2013/05/15. Eng.

69. Rahman MA, Amin AR, Wang D, Koenig L, Nannapaneni S, Chen Z, et al. RRM2 Regulates Bcl-2 in Head and Neck and Lung Cancers: A Potential Target for Cancer Therapy. Clin Cancer Res. 2013 Jun 18. PubMed PMID: 23719266. Epub 2013/05/31. Eng.

70. Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. Blood. 2008 Apr 1;111(7):3322-30. PubMed PMID: 18362212. Pubmed Central PMCID: 2275002. Epub 2008/03/26. eng.

71. Rahmani A, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2012;5(9):965-71. PubMed PMID: 23119114. Pubmed Central PMCID: 3484492. Epub 2012/11/03. eng.

72. Kelkel M, Cerella C, Mack F, Schneider T, Jacob C, Schumacher M, et al. ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis. Carcinogenesis. 2012 Nov;33(11):2162-71. PubMed PMID: 22822094. Epub 2012/07/24. eng.

73. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Stehlik C, Tse W, Callery PS, Wang L, et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. Mol Biol Cell. 2013 Mar;24(6):858-69. PubMed PMID: 23363601. Pubmed Central PMCID: 3596255. Epub 2013/02/01. eng.

74. Xu HD, Wu D, Gu JH, Ge JB, Wu JC, Han R, et al. The pro-survival role of autophagy depends on Bcl-2 under nutrition stress conditions. PLoS One. 2013;8(5):e63232. PubMed PMID: 23658815. Pubmed Central PMCID: 3643928. Epub 2013/05/10. eng.

75. Zhou L, Wang HF, Ren HG, Chen D, Gao F, Hu QS, et al. Bcl-2-dependent upregulation of autophagy by sequestosome 1/p62 in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2013 May;34(5):651-6. PubMed PMID: 23564079. Pubmed Central PMCID: 3647217. Epub 2013/04/09. eng.

76. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. Blood. 2005 Jul 15;106(2):408-18. PubMed PMID: 15797997. Epub 2005/03/31. eng.

77. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res. 2009 Feb 15;15(4):1126-32. PubMed PMID: 19228717. Pubmed Central PMCID: 3182268. Epub 2009/02/21. eng.

78. Ryu Y, Hall CP, Reynolds CP, Kang MH. Caspase-dependent Mcl-1 cleavage and effect of Mcl-1 phosphorylation in ABT-737-induced apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cell lines. Exp Biol Med (Maywood). 2014 Jun 20. PubMed PMID: 24951472.

79. Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. Am J Pathol. 1997 Mar;150(3):805-14. PubMed PMID: 9060818. Pubmed Central PMCID: 1857882. Epub 1997/03/01. eng.

80. Marriott HM, Bingle CD, Read RC, Braley KE, Kroemer G, Hellewell PG, et al. Dynamic changes in Mcl-1 expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance. J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):359-68. PubMed PMID: 15650769. Pubmed Central PMCID: 544034. Epub 2005/01/15. eng.

81. Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. Cell Mol Life Sci. 2009 Apr;66(8):1326-36. PubMed PMID: 19099185. Epub 2008/12/23. eng.

82. Andersen JL, Kornbluth S. Mcl-1 rescues a glitch in the matrix. Nat Cell Biol. 2012 Jun;14(6):563-5. PubMed PMID: 22643875. Epub 2012/05/31. eng.

83. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. FEBS Lett. 2010 Jul 16;584(14):2981-9. PubMed PMID: 20540941. Epub 2010/06/15. eng.

84. Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. Oncogene. 2008 Dec;27 Suppl 1:S84-92. PubMed PMID: 19641509. Epub 2009/07/31. eng.

85. Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen KH, Karras J, et al. Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. Blood. 2003 Jul 1;102(1):344-52. PubMed PMID: 12637318. Epub 2003/03/15. eng.

86. Subramaniam D, Natarajan G, Ramalingam S, Ramachandran I, May R, Queimado L, et al. Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008 Apr;294(4):G1025-32. PubMed PMID: 18292181. Epub 2008/02/23. eng.

87. Steele R, Mott JL, Ray RB. MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. Genes Cancer. 2010 Apr 1;1(4):381-7. PubMed PMID: 20657750. Pubmed Central PMCID: 2908325. Epub 2010/07/27. Eng.

88. Mojsa B, Lassot I, Desagher S. Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. Cells. 2014;3(2):418-37. PubMed PMID: 24814761. Pubmed Central PMCID: 4092850.

89. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Froelich CJ, Yin XM, Rabinowich H. Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. J Biol Chem. 2004 May 21;279(21):22020-9. PubMed PMID: 15014070. Epub 2004/03/12. eng.

90. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. Mol Cell. 2011 Apr 8;42(1):23-35. PubMed PMID: 21353614. Epub 2011/03/01. eng.

91. Germain M, Slack RS. MCL-1 regulates the balance between autophagy and apoptosis. Autophagy. 2011 May 1;7(5). PubMed PMID: 21412051. Epub 2011/03/18. Eng.

92. Munoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. Cell Death Dis. 2012;3:e248. PubMed PMID: 22237205. Pubmed Central PMCID: 3270265.

93. Cameron AC, Dawson J, Quinn TJ, Walters MR, McInnes GT, Morrison D, et al. Long-term outcome following attendance at a transient ischemic attack clinic. Int J Stroke. 2011 Aug;6(4):306-11. PubMed PMID: 21609417. Epub 2011/05/26. eng.

94. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. Cell. 2010 Aug 20;142(4):625-36. PubMed PMID: 20705336. Pubmed Central PMCID: 2924962. Epub 2010/08/14. eng.

95. Grad JM, Zeng XR, Boise LH. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. Curr Opin Oncol. 2000 Nov;12(6):543-9. PubMed PMID: 11085453. Epub 2000/11/21. eng.

96. Jazirehi AR, Gan XH, De Vos S, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. Mol Cancer Ther. 2003 Nov;2(11):1183-93. PubMed PMID: 14617792. Epub 2003/11/18. eng.

97. Lotan R, Rotem A, Gonen H, Finberg JP, Kemeny S, Steller H, et al. Regulation of the proapoptotic ARTS protein by ubiquitin-mediated degradation. J Biol Chem. 2005 Jul 8;280(27):25802-10. PubMed PMID: 15837787. Epub 2005/04/20. eng.

98. Neutzner A, Li S, Xu S, Karbowski M. The ubiquitin/proteasome system-dependent control of mitochondrial steps in apoptosis. Semin Cell Dev Biol. 2012 Jul;23(5):499-508. PubMed PMID: 22516642. Epub 2012/04/21. eng.

99. Tian H, Zhang B, Di J, Jiang G, Chen F, Li H, et al. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKbeta and Bcl-2/Bcl-xL. Cancer Lett. 2012 Dec 1;325(1):26-34. PubMed PMID: 22743616. Epub 2012/06/30. eng.

100. Upreti M, Galitovskaya EN, Chu R, Tackett AJ, Terrano DT, Granell S, et al. Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. J Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35517-25. PubMed PMID: 18974096. Pubmed Central PMCID: 2602892. Epub 2008/11/01. eng.

101. Arbel N, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. J Biol Chem. 2012 Jun 29;287(27):23152-61. PubMed PMID: 22589539. Pubmed Central PMCID: 3391160. Epub 2012/05/17. eng.

102. Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. Mol Cell Biol. 2000 Mar;20(5):1886-96. PubMed PMID: 10669763. Pubmed Central PMCID: 85374. Epub 2000/02/12. eng.

103. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ. 2011 Apr;18(4):571-80. PubMed PMID: 21311563. Pubmed Central PMCID: 3131912. Epub 2011/02/12. eng.

104. Tian S, Lin J, Jun Zhou J, Wang X, Li Y, Ren X, et al. Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. Autophagy. 2010 Nov;6(8):1032-41. PubMed PMID: 20818185. Epub 2010/09/08. eng.

105. Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. Febs J. 2011 Feb;278(3):403-13. PubMed PMID: 21182587. Epub 2010/12/25. eng.

106. Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou JC. Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. Cell Death Differ. 2008 May;15(5):929-37. PubMed PMID: 18259190. Epub 2008/02/09. eng.

107. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. Cancer Cell. 2002 Sep;2(3):183-92. PubMed PMID: 12242151. Epub 2002/09/21. eng.

108. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. Science. 2007 Feb 9;315(5813):856-9. PubMed PMID: 17289999. Epub 2007/02/10. eng.

109. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. Biochim Biophys Acta. 2011 Apr;1813(4):521-31. PubMed PMID: 21195116. Epub 2011/01/05. eng.

110. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. Pharmacol Rev. 2009 Mar;61(1):9-38. PubMed PMID: 19325075. Pubmed Central PMCID: 2763610. Epub 2009/03/28. eng.

111. Radzyukevich TL, Neumann JC, Rindler TN, Oshiro N, Goldhamer DJ, Lingrel JB, et al. Tissue-specific role of the Na,K-ATPase alpha2 isozyme in skeletal muscle. J Biol Chem. 2013 Jan 11;288(2):1226-37. PubMed PMID: 23192345. Pubmed Central PMCID: 3543005. Epub 2012/11/30. eng.

112. Lingrel J, Moseley A, Dostanic I, Cougnon M, He S, James P, et al. Functional roles of the alpha isoforms of the Na,K-ATPase. Ann N Y Acad Sci. 2003 Apr;986:354-9. PubMed PMID: 12763850. Epub 2003/05/24. eng.

113. Doganli C, Beck HC, Ribera AB, Oxvig C, Lykke-Hartmann K. alpha3Na+/K+-ATPase deficiency causes brain ventricle dilation and abrupt embryonic motility in zebrafish. J Biol Chem. 2013 Mar 29;288(13):8862-74. PubMed PMID: 23400780. Pubmed Central PMCID: 3610961. Epub 2013/02/13. eng.

114. Jimenez T, McDermott JP, Sanchez G, Blanco G. Na,K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 11;108(2):644-9. PubMed PMID: 21187400. Pubmed Central PMCID: 3021039. Epub 2010/12/29. eng.

115. Carranza ML, Feraille E, Favre H. Protein kinase C-dependent phosphorylation of Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit in rat kidney cortical tubules. Am J Physiol. 1996 Jul;271(1 Pt 1):C136-43. PubMed PMID: 8760039. Epub 1996/07/01. eng.

116. Feraille E, Carranza ML, Gonin S, Beguin P, Pedemonte C, Rousselot M, et al. Insulin-induced stimulation of Na+,K(+)-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. Mol Biol Cell. 1999 Sep;10(9):2847-59. PubMed PMID: 10473631. Pubmed Central PMCID: 25522. Epub 1999/09/03. eng.

117. Deng WB, Tian Z, Liang XH, Wang BC, Yang F, Yang ZM. Progesterone regulation of Na/K-ATPase beta1 subunit expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. Theriogenology. 2013 May;79(8):1196-203. PubMed PMID: 23534996. Epub 2013/03/29. eng.

118. Tokhtaeva E, Clifford RJ, Kaplan JH, Sachs G, Vagin O. Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase alpha-beta heterodimers. J Biol Chem. 2012 Jul 27;287(31):26115-25. PubMed PMID: 22696220. Pubmed Central PMCID: 3406695. Epub 2012/06/15. eng.

119. Franzin CM, Gong XM, Teriete P, Marassi FM. Structures of the FXYD regulatory proteins in lipid micelles and membranes. J Bioenerg Biomembr. 2007 Dec;39(5-6):379-83. PubMed PMID: 18000745. Pubmed Central PMCID: 2917602. Epub 2007/11/15. eng.

120. Delprat B, Bibert S, Geering K. [FXYD proteins: novel regulators of Na,K-ATPase]. Med Sci (Paris). 2006 Jun-Jul;22(6-7):633-8. PubMed PMID: 16828040. Epub 2006/07/11. Les proteines FXYD: nouveaux regulateurs de la Na,K-ATPase. fre.

121. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. Am J Physiol Renal Physiol. 2006 Feb;290(2):F241-50. PubMed PMID: 16403837. Epub 2006/01/13. eng.

122. Huang X, Saint-Jeannet JP. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. Dev Biol. 2004 Nov 1;275(1):1-11. PubMed PMID: 15464568.

123. Gnoula C, Megalizzi V, De Neve N, Sauvage S, Ribaucour F, Guissou P, et al. Balanitin-6 and -7: diosgenyl saponins isolated from Balanites aegyptiaca Del. display significant anti-tumor activity in vitro and in vivo. Int J Oncol. 2008 Jan;32(1):5-15. PubMed PMID: 18097538. Epub 2007/12/22. eng.

124. Bissessor N, Wong AW, Hourigan LA, Jayasinghe RS, Scalia GS, Burstow DJ, et al. Percutaneous patent foramen ovale closure: outcomes with the Premere and Amplatzer devices. Cardiovasc Revasc Med. 2011 May-Jun;12(3):164-9. PubMed PMID: 21640934. Epub 2011/06/07. eng.

125. Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. Nat Rev Drug Discov. 2008 Nov;7(11):926-35. PubMed PMID: 18948999. Epub 2008/10/25. eng.

126. Sawadogo WR, Schumacher M, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. Biochem Pharmacol. 2012 Nov 15;84(10):1225-40. PubMed PMID: 22846603. Epub 2012/08/01. eng.

127. Juncker T, Cerella C, Teiten MH, Morceau F, Schumacher M, Ghelfi J, et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. Biochem Pharmacol. 2011 Jan 1;81(1):13-23. PubMed PMID: 20849830. Epub 2010/09/21. eng.

128. Gaascht F, Teiten MH, Cerella C, Dicato M, Bagrel D, Diederich M. Plumbagin modulates leukemia cell redox status. Molecules. 2014;19(7):10011-32. PubMed PMID: 25014531.

129. Rahman MA, Kim NH, Yang H, Huh SO. Angelicin induces apoptosis through intrinsic caspase-dependent pathway in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Mol Cell Biochem. 2012 Oct;369(1-2):95-104. PubMed PMID: 22766766.

130. Aaij R, Abellan Beteta C, Adeva B, Adinolfi M, Adrover C, Affolder A, et al. Differential branching fraction and angular analysis of the decay B0 --> K*0 mu+ mu. Phys Rev Lett. 2012 May 4;108(18):181806. PubMed PMID: 22681061. Epub 2012/06/12. eng.

131. Peng CY, Yang HW, Chu YH, Chang YC, Hsieh MJ, Chou MY, et al. Caffeic Acid phenethyl ester inhibits oral cancer cell metastasis by regulating matrix metalloproteinase-2 and the mitogen-activated protein kinase pathway. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:732578. PubMed PMID: 23320037. Pubmed Central PMCID: 3535744. Epub 2013/01/16. eng.

132. Jacquemin G, Granci V, Gallouet AS, Lalaoui N, Morle A, Iessi E, et al. Quercetin-mediated Mcl-1 and survivin downregulation restores TRAIL-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma B cells. Haematologica. 2012 Jan;97(1):38-46. PubMed PMID: 21933852. Pubmed Central PMCID: 3248929.

133. Spagnuolo C, Cerella C, Russo M, Chateauvieux S, Diederich M, Russo GL. Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. Br J Cancer. 2011 Jul 12;105(2):221-30. PubMed PMID: 21750559. Pubmed Central PMCID: 3142809.

134. Guzey M, Kitada S, Reed JC. Apoptosis induction by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in prostate cancer. Mol Cancer Ther. 2002 Jul;1(9):667-77. PubMed PMID: 12479363.

135. Kim JA, Kim Y, Kwon BM, Han DC. The natural compound cantharidin induces cancer cell death through inhibition of heat shock protein 70 (HSP70) and Bcl-2-associated athanogene domain 3 (BAG3) expression by blocking heat shock factor 1 (HSF1) binding to promoters. J Biol Chem. 2013 Oct 4;288(40):28713-26. PubMed PMID: 23983126. Pubmed Central PMCID: 3789968.

136. Cerella C, Radogna F, Dicato M, Diederich M. Natural compounds as regulators of the cancer cell metabolism. Int J Cell Biol. 2013;2013:639401. PubMed PMID: 23762063. Pubmed Central PMCID: 3670510.

137. Beevers CS, Chen L, Liu L, Luo Y, Webster NJ, Huang S. Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. Cancer Res. 2009 Feb 1;69(3):1000-8. PubMed PMID: 19176385.

138. Cerella C, Teiten MH, Radogna F, Dicato M, Diederich M. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. Biotechnol Adv. 2014 Nov 1;32(6):1111-22. PubMed PMID: 24681093.

139. Quinn BA, Dash R, Azab B, Sarkar S, Das SK, Kumar S, et al. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. Expert opinion on investigational drugs. 2011 Oct;20(10):1397-411. PubMed PMID: 21851287. Pubmed Central PMCID: 3205956.

140. Chen X, Du Y, Nan J, Zhang X, Qin X, Wang Y, et al. Brevilin A, a Novel Natural Product, Inhibits Janus Kinase Activity and Blocks STAT3 Signaling in Cancer Cells. PLoS One. 2013;8(5):e63697. PubMed PMID: 23704931. Pubmed Central PMCID: 3660600. Epub 2013/05/25. eng.

141. Muto A, Hori M, Sasaki Y, Saitoh A, Yasuda I, Maekawa T, et al. Emodin has a cytotoxic activity against human multiple myeloma as a Janus-activated kinase 2 inhibitor. Mol Cancer Ther. 2007 Mar;6(3):987-94. PubMed PMID: 17363492.

142. Ban D, Funk M, Gulich R, Egger D, Sabo TM, Walter KF, et al. Kinetics of conformational sampling in ubiquitin. Angew Chem Int Ed Engl. 2011 Nov 25;50(48):11437-40. PubMed PMID: 22113802. Epub 2011/11/25. eng.

143. Aaij R, Abellan Beteta C, Adeva B, Adinolfi M, Adrover C, Affolder A, et al. Evidence for CP violation in time-integrated D0-->h(-)h(+) decay rates. Phys Rev Lett. 2012 Mar 16;108(11):111602. PubMed PMID: 22540460. Epub 2012/05/01. eng.

144. Abanades S, van der Aart J, Barletta JA, Marzano C, Searle GE, Salinas CA, et al. Prediction of repeat-dose occupancy from single-dose data: characterisation of the relationship between plasma pharmacokinetics and brain target occupancy. J Cereb Blood Flow Metab. 2011 Mar;31(3):944-52. PubMed PMID: 20940733. Pubmed Central PMCID: 3063628. Epub 2010/10/14. eng.

145. Polier G, Giaisi M, Kohler R, Muller WW, Lutz C, Buss EC, et al. Targeting CDK9 by wogonin and related natural flavones potentiates the anti-cancer efficacy of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263. Int J Cancer. 2014 Jun 4. PubMed PMID: 24895203.

146. Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. Methods Mol Biol. 2012;882:569-604. PubMed PMID: 22665256. Epub 2012/06/06. eng.

147. Zhai D, Jin C, Shiau CW, Kitada S, Satterthwait AC, Reed JC. Gambogic acid is an antagonist of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. Mol Cancer Ther. 2008 Jun;7(6):1639-46. PubMed PMID: 18566235. Pubmed Central PMCID: 2614397.

148. Meng Y, Tang W, Dai Y, Wu X, Liu M, Ji Q, et al. Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. Mol Cancer Ther. 2008 Jul;7(7):2192-202. PubMed PMID: 18645028. Pubmed Central PMCID: 2515935.

149. Etxebarria A, Landeta O, Antonsson B, Basanez G. Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: mechanistic insights from in vitro reconstituted systems. Biochem Pharmacol. 2008 Dec 1;76(11):1563-76. PubMed PMID: 18762177.

150. Abeloos L, Maris C, Salmon I, Baleriaux D, Sadeghi N, Lefranc F. Chondroma of the dural convexity: a case report and literature review. Neuropathology. 2012 Jun;32(3):306-10. PubMed PMID: 22017366. Epub 2011/10/25. eng.

151. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):768-80. PubMed PMID: 14570043. Epub 2003/10/23. eng.

152. Schumacher M, Kelkel M, Dicato M, Diederich M. Gold from the sea: Marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. Biotechnol Adv. 2011 Mar 1. PubMed PMID: 21371549. Epub 2011/03/05. Eng.

153. Munin A, Edwards-Levy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics. 2011;3(4):793-829. PubMed PMID: 24309309. Pubmed Central PMCID: 3857059.

154. Singh S, Khar A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. Anticancer Agents Med Chem. 2006 May;6(3):259-70. PubMed PMID: 16712454. Epub 2006/05/23. eng.

155. Masuda M, Suzui M, Lim JT, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate inhibits activation of HER-2/neu and downstream signaling pathways in human head and neck and breast carcinoma cells. Clin Cancer Res. 2003 Aug 15;9(9):3486-91. PubMed PMID: 12960141. Epub 2003/09/10. eng.

156. Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, et al. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. Cancer Res. 2005 Sep 1;65(17):8049-56. PubMed PMID: 16140980. Epub 2005/09/06. eng.

157. Wang TT, Wang SK, Huang GL, Sun GJ. Luteolin induced-growth inhibition and apoptosis of human esophageal squamous carcinoma cell line Eca109 cells in vitro. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(11):5455-61. PubMed PMID: 23317200. Epub 2013/01/16. eng.

158. Ong CS, Zhou J, Ong CN, Shen HM. Luteolin induces G1 arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells via the Akt-GSK-3beta-Cyclin D1 pathway. Cancer Lett. 2010 Dec 8;298(2):167-75. PubMed PMID: 20655656. Epub 2010/07/27. eng.

159. Lim do Y, Jeong Y, Tyner AL, Park JH. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Jan;292(1):G66-75. PubMed PMID: 16901994. Epub 2006/08/12. eng.

160. Zhang X, Gu L, Li J, Shah N, He J, Yang L, et al. Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells. Cancer Res. 2010 Dec 1;70(23):9895-904. PubMed PMID: 20935220. Pubmed Central PMCID: 2999659. Epub 2010/10/12. eng.

161. Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, Shankar S. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(/WAF1/CIP1). Cell Cycle. 2007 Dec 1;6(23):2953-61. PubMed PMID: 18156803. Epub 2007/12/25. eng.

162. Lu X, Song L, Metelitsa LS, Bittman R. Synthesis and evaluation of an alpha-C-galactosylceramide analogue that induces Th1-biased responses in human natural killer T cells. Chembiochem. 2006 Nov;7(11):1750-6. PubMed PMID: 17009272. Epub 2006/09/30. eng.

163. Lee JH, Cheong J, Park YM, Choi YH. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by beta-lapachone in human prostate carcinoma cells. Pharmacol Res. 2005 Jun;51(6):553-60. PubMed PMID: 15829436. Epub 2005/04/15. eng.

164. Sheth S, Jajoo S, Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Rybak LP, et al. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway.

PLoS One. 2012;7(12):e51655. PubMed PMID: 23272133. Pubmed Central PMCID: 3521661. Epub 2012/12/29. eng.

165. Luo H, Li B, Li Z, Cutler SJ, Rankin GO, Chen YC. Chaetoglobosin K inhibits tumor angiogenesis through downregulation of vascular epithelial growth factor-binding hypoxia-inducible factor 1alpha. Anticancer Drugs. 2013 Aug;24(7):715-24. PubMed PMID: 23695013. Epub 2013/05/23. eng.

166. Huang L, Zhang Z, Zhang S, Ren J, Zhang R, Zeng H, et al. Inhibitory action of Celastrol on hypoxia-mediated angiogenesis and metastasis via the HIF-1alpha pathway. Int J Mol Med. 2011 Mar;27(3):407-15. PubMed PMID: 21249310. Epub 2011/01/21. eng.

167. Takai N, Kira N, Ishii T, Yoshida T, Nishida M, Nishida Y, et al. Bufalin, a traditional oriental medicine, induces apoptosis in human cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(1):399-402. PubMed PMID: 22502710. Epub 2012/04/17. eng.

168. Moreira L, Araujo I, Costa T, Correia-Branco A, Faria A, Martel F, et al. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. Exp Cell Res. 2013 Jul 15;319(12):1784-95. PubMed PMID: 23664836. Epub 2013/05/15. eng.

169. Orlikova B, Diederich M. Power from the garden: plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. Curr Med Chem. 2012;19(14):2061-87. PubMed PMID: 22414100. Epub 2012/03/15. eng.

170. Mekhora C, Muangnoi C, Chingsuwanrote P, Dawilai S, Svasti S, Chasri K, et al. Eryngium foetidum suppresses inflammatory mediators produced by macrophages. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(2):653-64. PubMed PMID: 22524841. Epub 2012/04/25. eng.

171. Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F, et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. J Pathol. 2007 Jun;212(2):170-9. PubMed PMID: 17471453. Epub 2007/05/02. eng.

172. Zhang L, Zhang Z, Guo H, Wang Y. Na+/K+-ATPase-mediated signal transduction and Na+/K+-ATPase regulation. Fundam Clin Pharmacol. 2008 Dec;22(6):615-21. PubMed PMID: 19049666. Epub 2008/12/04. eng.

173. Lefranc F, Mijatovic T, Kondo Y, Sauvage S, Roland I, Debeir O, et al. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. Neurosurgery. 2008 Jan;62(1):211-21; discussion 21-2. PubMed PMID: 18300910. Epub 2008/02/28. eng.

174. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Aug;293(2):C509-36. PubMed PMID: 17494630. Epub 2007/05/15. eng.

175. Van Quaquebeke E, Simon G, Andre A, Dewelle J, El Yazidi M, Bruyneel F, et al. Identification of a novel cardenolide (2"-oxovoruscharin) from Calotropis procera and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. J Med Chem. 2005 Feb 10;48(3):849-56. PubMed PMID: 15689169.

176. Mijatovic T, Mathieu V, Gaussin JF, De Neve N, Ribaucour F, Van Quaquebeke E, et al. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. Neoplasia. 2006 May;8(5):402-12. PubMed PMID: 16790089. Pubmed Central PMCID: 1592454.

177. Ingrassia L, Lefranc F, Kiss R, Mijatovic T. Naphthalimides and azonafides as promising anti-cancer agents. Curr Med Chem. 2009;16(10):1192-213. PubMed PMID: 19355879. Epub 2009/04/10. eng.

178. Apaire-Marchais V, Kempf M, Lefrancois C, Marot A, Licznar P, Cottin J, et al. Evaluation of an immunomagnetic separation method to capture Candida yeasts cells in blood. BMC Microbiol. 2008;8:157. PubMed PMID: 18808691. Pubmed Central PMCID: 2556679. Epub 2008/09/24. eng.

179. Mijatovic T, De Neve N, Gailly P, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, et al. Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity. Mol Cancer Ther. 2008 May;7(5):1285-96. PubMed PMID: 18483316. Epub 2008/05/17. eng.

180. Juncker T, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. UNBS1450 from Calotropis procera as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. Biochem Pharmacol. 2009 Jul 1;78(1):1-10. PubMed PMID: 19447218. Epub 2009/05/19. eng.

181. Liu J, Kesiry R, Periyasamy SM, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. Kidney Int. 2004 Jul;66(1):227-41. PubMed PMID: 15200429.

182. Mijatovic T, Op De Beeck A, Van Quaquebeke E, Dewelle J, Darro F, de Launoit Y, et al. The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. Mol Cancer Ther. 2006 Feb;5(2):391-9. PubMed PMID: 16505114.

183. Mijatovic T, Jungwirth U, Heffeter P, Hoda MA, Dornetshuber R, Kiss R, et al. The Na+/K+-ATPase is the Achilles heel of multi-drug-resistant cancer cells. Cancer Lett. 2009 Sep 8;282(1):30-4. PubMed PMID: 19339106.

184. Mijatovic T, De Neve N, Gailly P, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, et al. Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity. Mol Cancer Ther. 2008 May;7(5):1285-96. PubMed PMID: 18483316.

185. Pongrakhananon V, Stueckle TA, Wang HY, O'Doherty GA, Dinu CZ, Chanvorachote P, et al. Monosaccharide digitoxin derivative sensitize human non-small cell lung cancer cells to anoikis through Mcl-1 proteasomal degradation. Biochem Pharmacol. 2014 Mar 1;88(1):23-35. PubMed PMID: 24231508. Pubmed Central PMCID: 3970117.

186. Chanvorachote P, Pongrakhananon V. Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. Am J Physiol Cell Physiol. 2013 Feb 1;304(3):C263-72. PubMed PMID: 23174563.

187. Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. Biochim Biophys Acta. 2007 Jul;1768(7):1691-702. PubMed PMID: 17524349.

188. Waiwut P, Inujima A, Inoue H, Saiki I, Sakurai H. Bufotalin sensitizes death receptor-induced apoptosis via Bid- and STAT1-dependent pathways. Int J Oncol. 2012 Jan;40(1):203-8. PubMed PMID: 21887462.

189. Ihenetu K, Qazzaz HM, Crespo F, Fernandez-Botran R, Valdes R, Jr. Digoxin-like immunoreactive factors induce apoptosis in human acute T-cell lymphoblastic leukemia. Clin Chem. 2007 Jul;53(7):1315-22. PubMed PMID: 17495020. Epub 2007/05/15. eng.

190. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int J Cancer. 1976 May 15;17(5):565-77. PubMed PMID: 178611.

191. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int J Cancer. 1977 May 15;19(5):621-6. PubMed PMID: 68013.

192. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood. 1975 Mar;45(3):321-34. PubMed PMID: 163658.

193. Kaighn ME, Lechner JF, Narayan KS, Jones LW. Prostate carcinoma: tissue culture cell lines. National Cancer Institute monograph. 1978 Dec(49):17-21. PubMed PMID: 571045.

194. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). Int J Cancer. 1978 Mar 15;21(3):274-81. PubMed PMID: 631930.

195. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. Cancer Res. 1978 Nov;38(11 Pt 1):3751-7. PubMed PMID: 29704.

196. Sugimoto T, Tatsumi E, Kemshead JT, Helson L, Green AA, Minowada J. Determination of cell surface membrane antigens common to both human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies. Journal of the National Cancer Institute. 1984 Jul;73(1):51-7. PubMed PMID: 6610792.

197. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. Journal of the National Cancer Institute. 1974 Sep;53(3):661-74. PubMed PMID: 4412247.

198. Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 1973 Nov;51(5):1409-16. PubMed PMID: 4357757.

199. Whelan RD, Waring CJ, Wolf CR, Hayes JD, Hosking LK, Hill BT. Over-expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro. Int J Cancer. 1992 Sep 9;52(2):241-6. PubMed PMID: 1355756.

200. Faiao-Flores F, Suarez JA, Maria-Engler SS, Soto-Cerrato V, Perez-Tomas R, Maria DA. The curcumin analog DM-1 induces apoptotic cell death in melanoma. Tumour Biol. 2013 Jan 29. PubMed PMID: 23359272. Epub 2013/01/30. Eng.

201. Piret JP, Minet E, Cosse JP, Ninane N, Debacq C, Raes M, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. J Biol Chem. 2005 Mar 11;280(10):9336-44. PubMed PMID: 15611089.

202. Masuoka HC, Mott J, Bronk SF, Werneburg NW, Akazawa Y, Kaufmann SH, et al. Mcl-1 degradation during hepatocyte lipoapoptosis. J Biol Chem. 2009 Oct 30;284(44):30039-48. PubMed PMID: 19734538. Pubmed Central PMCID: 2781558.

203. Lee DH, Lee CS, Kim DW, Ae JE, Lee TH. Digitoxin sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by upregulation of death receptor 5 and downregulation of survivin. Anticancer Drugs. 2014 Jan;25(1):44-52. PubMed PMID: 24045365.

204. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. Oncogene. 2008 Jan 10;27(3):285-99. PubMed PMID: 17700538.

205. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome biology. 2004;5(10):R80. PubMed PMID: 15461798. Pubmed Central PMCID: 545600.

206. Alvira CM, Guignabert C, Kim YM, Chen C, Wang L, Duong TT, et al. Inhibition of transforming growth factor beta worsens elastin degradation in a murine model of Kawasaki disease. Am J Pathol. 2011 Mar;178(3):1210-20. PubMed PMID: 21356372. Pubmed Central PMCID: 3070551. Epub 2011/03/02. eng.

207. Cerella C, Mearelli C, Coppola S, D'Alessio M, De Nicola M, Diederich M, et al. Sequential phases of Ca2+ alterations in pre-apoptotic cells. Apoptosis. 2007 Dec;12(12):2207-19. PubMed PMID: 17899381.

208. Gable ME, Abdallah SL, Najjar SM, Liu L, Askari A. Digitalis-induced cell signaling by the sodium pump: on the relation of Src to Na(+)/K(+)-ATPase. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Apr 18;446(4):1151-4. PubMed PMID: 24667596.

209. Buschiazzo J, Ialy-Radio C, Auer J, Wolf JP, Serres C, Lefevre B, et al. Cholesterol depletion disorganizes oocyte membrane rafts altering mouse fertilization. PLoS One. 2013;8(4):e62919. PubMed PMID: 23638166. Pubmed Central PMCID: 3636221.

210. Russell P, Hennessy BT, Li J, Carey MS, Bast RC, Freeman T, et al. Cyclin G1 regulates the outcome of taxane-induced mitotic checkpoint arrest. Oncogene. 2012 May 10;31(19):2450-60. PubMed PMID: 22056875. Pubmed Central PMCID: 3351588. Epub 2011/11/08. eng.

211. Westendorf JM, Rao PN, Gerace L. Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 18;91(2):714-8. PubMed PMID: 8290587. Pubmed Central PMCID: 43019. Epub 1994/01/18. eng.

212. Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, et al. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jan 20;95(2):554-9. PubMed PMID: 9435230. Pubmed Central PMCID: 18458.

213. Grandgirard D, Studer E, Monney L, Belser T, Fellay I, Borner C, et al. Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. Embo J. 1998 Aug 10;17(5):1268-78. PubMed PMID: 9482724. Pubmed Central PMCID: 1170475.

214. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. J Exp Med. 2004 Jan 5;199(1):113-24. PubMed PMID: 14699081. Pubmed Central PMCID: 1887730.

215. Rapino F, Naumann I, Fulda S. Bortezomib antagonizes microtubule-interfering drug-induced apoptosis by inhibiting G2/M transition and MCL-1 degradation. Cell Death Dis. 2013;4:e925. PubMed PMID: 24263099. Pubmed Central PMCID: 3847318.

216. Michels J, Obrist F, Vitale I, Lissa D, Garcia P, Behnam-Motlagh P, et al. MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. Biochem Pharmacol. 2014 Aug 12. PubMed PMID: 25107702.

217. Slingerland M, Cerella C, Guchelaar HJ, Diederich M, Gelderblom H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. Investigational new drugs. 2013 Aug;31(4):1087-94. PubMed PMID: 23748872.

218. Cherniavsky-Lev M, Golani O, Karlish SJ, Garty H. Ouabain-induced internalization and lysosomal degradation of the Na+/K+-ATPase. J Biol Chem. 2014 Jan 10;289(2):1049-59. PubMed PMID: 24275648. Pubmed Central PMCID: 3887173.

219. Todahl J, Walters E. Universal screening for intimate partner violence: a systematic review. J Marital Fam Ther. 2011 Jul;37(3):355-69. PubMed PMID: 21745237. Epub 2011/07/13. eng.

220. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na+/K+-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem. 2002 May 24;277(21):18694-702. PubMed PMID: 11907028.

221. Xie CM, Liu XY, Yu S, Cheng CH. Cardiac glycosides block cancer growth through HIF-1alpha- and NF-kappaB-mediated Plk1. Carcinogenesis. 2013 Aug;34(8):1870-80. PubMed PMID: 23615397.

222. Despa S, Lingrel JB, Bers DM. Na(+)/K)+)-ATPase alpha2-isoform preferentially modulates Ca2(+) transients and sarcoplasmic reticulum Ca2(+) release in cardiac myocytes. Cardiovasc Res. 2012 Sep 1;95(4):480-6. PubMed PMID: 22739122. Pubmed Central PMCID: 3422081.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Early down-regulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450

Florian Muller[1]*, Claudia Cerella[1]*, Anthoula Gaigneaux[1], Flavia Radogna[1], Elodie Viry[1], Sébastien Chateauvieux[1,2], Mario Dicato[1] and Marc Diederich[2,*]

[1]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg.
[2]College of Pharmacy, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

*** equal contribution**

Running title: Mcl-1 regulates cardiac glycoside-induced apoptosis

Key words: Cardiac glycosides; UNBS1450; Mcl-1; Apoptosis; Cancer

*** To whom correspondence should be addressed**: Marc Diederich. Tel: +82-2-880-8919; E-mail address: marcdiederich@snu.ac.kr; Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 20 Room 303, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 151-742, Korea.

Abbreviations: ; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bak: Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak); Bcl-2: B-cell lymphoma 2; Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large; BH: Bcl-2 Homologue; BSA: bovine serum albumin; CG: Cardiac glycoside CHX: cycloheximide; DMSO: dimethyl sulfoxide; Mcl-1: Myeloid Cell Leukemia 1; TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand; PBS: phosphate buffer saline; FCS: fetal calf serum; nuclear factor-κB (NF-κB); USP9X: ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked.

Abstract

Prescribed to treat cardiovascular alterations, cardiac glycosides (CGs) display potent anti-cancer activities. Despite their well-established target, the sodium/potassium (Na^+/K^+)-ATPase, downstream mechanisms remain poorly elucidated. UNBS1450 is a hemi-synthetic cardenolide derived from 2″-oxovorusharin extracted from the plant *Calotropis procera*, which is effective against various cancer cell types with an excellent differential toxicity. By comparing adherent and non-adherent cancer cell types, we validated Mcl-1 as a general and early target of UNBS1450. A panel of CGs including cardenolides ouabain, digitoxin and digoxin as well as bufadienolides cinobufagin and proscillaridin A allowed us to generalize our findings. Our results show that Mcl-1, but not Bcl-xL nor Bcl-2, is rapidly down-regulated prior to induction of apoptosis. From a mechanistic point of view, we exclude an effect on transcription and demonstrate involvement of a pathway affecting protein stability and requiring the proteasome in the early CG-induced Mcl-1 down-regulation, without the involvement of caspases or the BH3-only protein NOXA. Strategies aiming at preventing UNBS1450-induced Mcl-1 down-regulation by overexpression of a mutated, non-ubiquitinable form of the protein or the use of the proteasome inhibitor MG132 inhibited the compound's ability to induce apoptosis. Altogether our results point at Mcl-1 as a ubiquitous factor, down-regulated by CGs, whose modulation is essential to achieve cell death.

Introduction

Cardiac glycosides (CGs) possess well-established pharmacological properties, which were more recently reconsidered for novel clinical uses. Originally prescribed to treat cardiovascular alterations, CGs also display interesting anti-cancer activities. Epidemiological studies correlated a reduced incidence of specific cancer types with the regular intake of selected CGs [1,2]. Preclinical *in vitro* and *in vivo* research demonstrated the ability of CGs to impact cell proliferation and survival of a variety of cancer cell models [3] at low nanomolar concentrations. Of interest, CGs also affect cancer cell models typically resistant to canonical cytocidal agents [4-6]. Furthermore, combinational treatments triggered synergistic effects [7-9].

Besides apoptosis, CGs were also able to induce autophagic cell death, anoikis or immunogenic cell death [10-12]. This heterogeneity reflects the extraordinary cytocidal potential of these compounds and reveals cross-talks existing among different cell death modalities as described for other natural compound anti-cancer agents [13].

CGs possess a steroid core structure and are sub-divided in two families depending on the chemical group on the D-ring at position 17: cardenolides (UNBS1450, ouabain, digitoxin and digoxin) contain a butyrolactone group whereas bufadienolides (cinobufagin and proscillaridin A) exhibit an α-pyrone group. A sugar moiety on the A-ring of the steroid nucleus at position 3 determines pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Sugar moiety and lactone are in cis-conformation [14].

Despite the known primary cellular target of CGs, the alpha subunit of the sodium/potassium-ATPase (Na^+/K^+-ATPase) [3,14], it was not yet possible to define a common mechanism of action. In fact, various cell death pathways are modulated by these compounds, depending on the cellular context. The dual activity played by Na^+/K^+-ATPases as homeostatic regulator and part of a complex signalosome [3,4] could explain these pleiotropic effects. The essential intracellular sensors/transducers of their anti-cancer action yet remain to be characterized.

The altered expression levels of anti-apoptotic members of the Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) protein family is a common feature in cancer [15]. Most cancer cell models overexpress one or more of the three major proteins: Bcl-2, Bcl-xL (B cell lymphoma-extra-large) and Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia-1). Discovered as crucial modulators of apoptosis, anti-apoptotic Bcl-2 proteins emerged more recently as important modulators of other essential cancer processes, including cell cycle,

autophagy or cell metabolism [16]. This aspect underlines the importance to target these proteins to further improve exisiting anti-cancer therapies. Mcl-1 became one of the most investigated members of the Bcl-2 family but the poor availability of specific Bcl-2 family inhibitors specifically targeting this protein hindered improved treatment protocols especially of Mcl-1 over-expressing and chemoresistant cancer types [17,18].

Despite many studies studying biological effects of CGs, only a limited number investigated their effect on Bcl-2 proteins. In a previous study, we characterized the cytostatic and pro-apoptogenic activity of the hemi-synthetic cardenolide UNBS1450 on human hematopoietic cancer cells [19]. This compound is derived from 2″-oxovorusharin extracted from the plant *Calotropis procera* and is very effective against many cancer models while presenting excellent differential toxicity towards healthy cell types [20,21].

We prevously described an early down-regulation of Mcl-1 without affecting Bcl-2 levels in line with results obtained with ouabain [22], digitoxin [23] or selected bufadienolides [9,24]. Moreover Mcl-1 down-regulation is a prerequisite for the induction of cell death mechanisms or the sensitization by other treatments like TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) [9,22-24].

Taken together, these findings suggest Mcl-1 as a common intracellular target modulated by CGs. In this study, we challenged this hypothesis by studying the modulatory effects of a panel of CGs, including both cardenolides (UNBS1450, ouabain, digitoxin and digoxin) and bufadienolides (cinobufagin and proscillaridin A) on Mcl-1 with a panel of human adherent and non-adherent cancer cell models of different origins. We show that all compounds share the common ability of modulating Mcl-1 but not Bcl-xL and Bcl-2. Taking UNBS1450 as model compound, we found that decreased Mcl-1 levels are essential for cell death induction. A microarray analysis confirmed the poor effects of UNBS1450 on transcription in general. Mcl-1 down-regulation clearly occurred at the level of protein expression and required proteasome degradation but not caspases nor the BH3-only protein NOXA.

Altogether, our results indicate Mcl-1 as an ubiquitous key factor, independent of the cellular context, whose degradation is an essential early step in cell death induction modulated by CGs.

Results

Mcl-1 is an early and ubiquitous target of cardiac glycosides.

We analyzed the impact of the hemi-synthetic cardenolide UNBS1450 on the expression levels of the three major anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in U937 and Jurkat cells (Figure 1A,B). Mcl-1 was the earliest down-regulated protein, followed by Bcl-xL; Bcl-2 was not affected. Caspase activation took place at late treatment times in both instances. To confirm Mcl-1 as a general target of UNBS1450, we tested this compound on other human cancer cell lines (lung, prostate, breast, blood and nerve tissue) (Figure 1C). The compound was active at low nanomolar concentrations already after 24h of treatment (Table I). UNBS1450, used in each cell line at the corresponding IC50 concentration, systematically triggered Mcl-1 down-regulation. Bcl-xL modulation depended on the cellular context. Bcl-2 levels were not at all or barely changed, whenever the cells expressed this protein (Figure 1D).

Next, to generalize this property of CGs, we investigated the effects of three other cardenolides (ouabain, digoxin and digoxin) and two bufadienolides (cinobufagin and proscillaridin A) on Bcl-2 family protein expression and cell death induction. All CGs induced apoptosis in a dose-dependent manner between 10-200 nM (Figure 2A,B). We observed strongly decreased Mcl-1 expression at low apoptosis-inducing concentrations: treatment with 50 nM was generally sufficient to abrogate Mcl-1 protein expression, with proscillaridin A being even active at lower concentrations (10 nM). BCL-xL downregulation was incomplete and generally required concentrations > 75-100 nM, depending on the compound. The differential modulation of Mcl-1 *vs.* Bcl-xL was more evident with bufadienolides compared to cardenolides. We confirmed a reduced impact of Bcl-2 protein.

Altogether, these results document a general ability of CGs to decrease Mcl-1 expression, even before apoptosis is detectable.

The anti-cancer effects of UNBS1450 are independent of transcriptional modulation.

As the time required to modulate cell death and Mcl-1 protein expression is compatible with an alteration of gene expression mechanisms, it was our first hypothesis that CGs affect transcriptional activity. We assessed the effect of UNBS1450 after 3, 6, and 9 h of treatment prior to the accumulation of apoptotic

markers by a transcriptomic approach. Up- and down-regulated genes are detailed in Figure 3A. Gene lists were not overlapping, meaning that no gene was differently expressed at a significant level at several time points. These results show that UNBS1450 had only a small, if any transcriptional impact at early time points. After 9 h of treatment the effect was stronger, with 744 genes significantly affected genes. Detailed results of significantly regulated genes are included in Supplementary Table S1.

We performed a functional analysis of gene lists to summarize results in biologically meaningful categories (GO biological processes). As expected from the small gene lists, only few categories were significant at 3 and 6 h (Figure 3B and C; Supplementary Table S2). After 9 h of treatment, a number of GO categories was associated with regulated genes, as shown in Figure 3D. Noteworthy, several categories were related to inflammation and cytokines. These results were in line with our previous observations showing the ability of UNBS1450 to impact important anti-inflammatory mediators such as Nuclear Factor-κB (NF-κB) [19]. Besides, transcription, RNA processing and differentiation corresponded to affected categories. Altogether we then exluded early transcriptional regulatory steps as key regulators of the molecular effects triggered by UNBS1450. We rather focussed on the effects of CGs on protein expression and turnover that we considered as more likely targets.

UNBS1450 down-regulates Mcl-1 protein levels

Even though microarray analyses did not suggest transcriptional modulation as an early implicated mechanism, we first explored the impact of CGs on Mcl-1 mRNA expression levels by RT-PCR to further acertain our results. Treatment of Jurkat cells with UNBS1450 did not trigger any modulation of Mcl-1 mRNA (Figure 4A). In U937 cells treated with UNBS1450 or ouabain (Figure 4B), Mcl-1 mRNA levels underwent a transient decrease prior to reaching initial levels even though Mcl-1 protein levels decreased. Altogether, these results excluded modulation of Mcl-1 mRNA levels as the cause for the observed early Mcl-1 protein decrease and prompted us to rather investigate changes at the protein level. We treated U937 cells with UNBS1450 and after 6 h we added the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). Single treatments with CHX or UNBS1450 decreased Mcl-1 protein levels similarly. The effect was amplified by a co-treatment with both compounds (Figure

4C). Proteasome inhibitor MG132 (5 μM) added to U937 cells treated for 6 h with UNBS1450 abrogated the decrease of Mcl-1 protein levels (Figure 4D and E), thus indicating implication of the proteasome in the observed effect.

Bcl-2 proteins are well-known targets of caspases [25-27]. In our instance, Mcl-1 down-regulation occurred after 6 h of treatment whereas caspase activation and apoptosis happened after 10-12 h of treatment (Figure 1A, B). This different timing excludes caspases as early Mcl-1 modulators. To further confirm this hypothesis, we tested the effect of the pan-caspase inhibitor zVAD on UNBS1450-treated cells. We performed this analysis after 12 h of treatment, when caspase-3 cleavage and apoptotic cells were clearly detectable (Figure 4F). As expected, zVAD prevented caspase-3 cleavage and the accumulation of cells with apoptotic nuclear morphology. In contrast, it did not prevent Mcl-1 down-regulation. Interestingly, Bcl-xL modulation also took place.

NOXA is a well-known binding partner of Mcl-1 and mediates Mcl-1 sequestration and degradation *via* the proteasome [28]. We excluded any implication for this BH-3-only protein in the early modulation steps of Mcl-1 by UNBS1450 as NOXA mRNA and protein only up-regulated between 10 h to 12 h of treatment (Figure 4G). These results do not exclude a possible role of NOXA in late amplification loops of the apoptotic signaling.

Altogether, our results show that UNBS1450 modulated Mcl-1 expression at a post-transcriptional level, *via* a mechanism affecting its protein levels.

Inhibition of Mcl-1 protein degradation protects cells against UNBS1450-induced apoptosis

Next, we investigated whether Mcl-1 down-regulation was critical for apoptosis induced by UNBS1450. To address that question, as a first strategy, we induced ectopic Mcl-1 over-expression by using a plasmid bearing the human Mcl-1 gene (WT Mcl-1) [9]. We used the neuroblastoma SH-SY5Y cell model, that expressed consistent levels of Mcl-1 and underwent similar modulations as U937 and Jurkat cells following treatment with UNBS1450 (Figure 1 C,D). U937 and Jurkat cells models were not suitable as U937 were only poorly transfectable in our hands and Jurkat were not able to maintain WT Mcl-1 over-expression over the time of the experiment (data not shown). Transfected SH-SY5Y cells showed consistent over-expression of Mcl-1; after treatment with UNBS1450, however, we assisted to a

complete down-regulation of Mcl-1 protein. Therefore, any attempt of modulating apoptosis with this approach was inconclusive (Figure 5A,B). As an alternative strategy, SH-SY5Y cells with a construct over-expressing human Mcl-1 protein with mutated ubiquitination sites (KR Mcl-1) [29]. Interestingly, under these conditions, Mcl-1 over-expression was maintained even after UNBS1450 treatment and the cells over-expressing KR Mcl-1 were more resistant to UNBS1450-induced apoptosis induction compared to mock-transfected cells: we observed a reduced number of cells with fragmented apoptotic nuclei (21.8 +/- 4.4 % vs. 42.0 +/- 6.0 % of apoptosis; Figure 5C) as well as the prevention of caspase-3 and-7 cleavage (Figure 5D). Transfection of U937 and Jurkat cells with KR Mcl-1 plasmid was accompanied by a lower, but consistent up-regulation of Mcl-1, maintained over the time (Suppl. Figure 1). The treatment with UNBS1450, however, again almost completely abrogated Mcl-1 upregulation. This result may be a consequence of a reduced ability of these cells to be transfected. Besides, we cannot exclude the existence of additional proteasome-independent mechanisms that modulate Mcl-1 in these hematological cells[30]. Therefore, in U937 and Jurkat, it was not possible to reliably prevent Mcl-1 downregulation to elucidate the role of this modulation in UNBS1450-induced apoptosis.

Next we addressed the question whether proteasome inhibition also protected cells against UNBS1450-induced apoptosis. Again, U937 and Jurkat cells were too susceptible to long time exposure to proteasome inhibitors and could not be used for this test. Alternatively, SH-SY5Y cells were treated for 6 h with UNBS1450 before adding 5 μM of MG132. As expected, this compound prevented Mcl-1 down-regulation in SH-SY5Y cells and at the same time, it strongly prevented apoptosis (Figure 5E-G).

Altogether these results show that Mcl-1 modulation is relevant for the cytotoxic potential of UNBS1450. Moreover, our results provide evidence that this modulation is essential for the anti-cancer action of CGs in general.

Discussion

Mcl-1 modulation ubiquitously occurs in different cancer cell models, independently of origin and characteristics, following treatment with CGs. We selected the hemi-synthetic cardenolide UNBS1450 for mechanistic studies because of its favorable differential toxicity [19]. This compound has initially been selected for its reduced affinity for the α-2 Na^+/K^+ ATPase subunit, the most important isoform expressed in cardiomyocytes [31], with the aim to prevent cardiac side effects [20]. Finally, it is active at lower nanomolar concentrations than the other cardenolides, especially against drug resistant cancer subtypes [4-6].

In a previous study, we documented the early down-regulation of Mcl-1 induced by UNBS1450 in the hematopoietic cancer cells [19]. Here, we demonstrate that cardenolides (ouabain, digitoxin, digoxin) or bufadienolides (cinobufagin and proscillaridin A) similarly modulate Mcl-1. Interestingly, Bcl-2 is not or only modestly affected by the treatment whereas Bcl-xL modulation is not a common hallmark, but rather depending on the cellular context. Proscillaridin A in particular appears to be more differentially active against Mcl-1 *vs.* Bcl-xL at lower concentrations underlining the interest of this compound for further investigations. In the future, differential molecular effects could be assessed by analysis of structure-activity relationships to suggest differential signaling patterns.

Remarkably, if there is a consistent number of papers exploring the link between the anti-cancer effects of CGs and the signaling events triggered downstream of the Na^+/K^+-ATPase, only a very few ones focused so far on the modulation of Bcl-2 family proteins, especially Mcl-1: the cardenolides ouabain and digitoxin were shown to down-regulate Mcl-1 in lung cancer cell lines [22,23] whereas bufadienolides, including bufalin, bufotalin and gamabufotalin, decreased its expression in breast or adenocarcinoma cell models [9,24]. Altogether, Mcl-1 seems an underestimated factor while investigating the anti-cancer action of CGs.

Our studies with UNBS1450 underline the relevance of Mcl-1 down-regulation to achieve apoptosis. Strategies that prevent Mcl-1 decrease, by including overexpression of a non-ubiquitinable form of Mcl-1 and inhibition of the proteasome, protected the neuroblastoma SH-SY5Y cells from UNBS1450-induced apoptosis. Vice versa, overexpression of Bcl-2 does not impact the cytocidal effect of

UNBS1450 in the same cells (Suppl. Figure 2), further underlining the differential role played by these two proteins in UNBS1450-induced apoptosis.

In our hands, over-expression of WT Mcl-1 is insufficient to revert the impact of CGs on cell death. The difference in basal Mcl-1 protein levels we observed in WT Mcl-1 vs. KR Mcl-1 SH-SY5Y over-expressing cells is most likely a direct consequence of the difference in Mcl-1 protein turnover, strongly impeded in the presence of KR-Mcl-1: after 6h of incubation with 5 μM MG132 (a window of time selected to avoid cytotoxic effects of MG132 in SH-SY5Y) we observe a consistent increase in Mcl-1 levels in SH-SY5Y cells over-expressing WT Mcl-1 (4-fold with compared to basal Mcl-1 levels), therefore excluding differences in the efficiency of WT vs. KR Mcl-1 plasmids used (data not shown). Our results are also in line with previous reports with chemically unrelated compounds where over-expression of Mcl-1 was reduced by the treatment even in cells presenting elevated expression levels [30,32,33]. Mcl-1 is controlled at many levels of its expression allowing efficient and rapid down-regulation and our results demonstrate the efficiency of UNBS1450 to efficiently abrogate both constitutively and ectopically overexpressed WT Mcl-1.

One tempting hypothesis for the rapid and complete down-regulation of Mcl-1 could be inhibition of its transcription or even at the level of the transcriptome. Using UNBS1450, we clearly show here that neither the transcriptome, in general, nor Mcl-1 mRNA expression are impacted by the treatment at time points compatible with the decreased protein levels. Many upstream signaling pathways converge towards the control of Mcl-1 gene transcription and its mRNA stability. Modulations involving these early steps of Mcl-1 expression were recently documented for the polyphenol quercetin [34].

We clearly favored the idea of UNBS1450 regulating a rapid down-regulation of Mcl-1 protein, without involving caspases and NOXA, both well-known modulators of Mcl-1 [18,27]. NOXA cannot be implicated in the early phase of Mcl-1 down-regulation as its up-regulation after 12 hours rather suggests a role in downstream amplification loops of apoptosis.

We rather suspect Mcl-1 protein degradation requiring the proteasome. Here several factors may deserve future investigations such as ubiquitin E3 ligases (as SCF^{Fbw7} and Huwe1), promoting ubiquitination, or Usp9x (ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked) that is leading to Mcl-1 de-ubiquitination. These post-translational steps generally occur after phosphorylation of Mcl-1 and/or interaction

with NOXA, most likely not a major regulator here [35]. In addition, Mcl-1 is the one of the Bcl-2 family proteins mostly affected by metabolic alterations [36-38]. As CGs, including UNBS1450, were shown to induce autophagy and cytostatic effects [3,39], Mcl-1 modulation might become an interesting indicator of other anti-cancer (anti-metabolic?) activities of CGs, so far still to be characterized and potentially contributing to their heterogeneous biological effects. Regarding this aspect, further studies will be necessary in the future to verify the potential co-existence of ubiquitin-independent mechanisms, translational arrest or mechanisms that could contribute to Mcl-1 protein instability. The exploration of these additional areas of investigations will be very relevant in the next future. It is well known that Mcl-1 protein has a much shorter half-life than Bcl-2 and Bcl-xL proteins [40]. This fact has recently led to consider Mcl-1 as an indicator of cell metabolism alterations through the impact of the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway and subsequent translational inhibition [41]. This scenario might be also compatible with a general impact of CGs on global protein synthesis [42-44].

Mcl-1 expression, however, does not seem to be the unique factor determining the susceptibility towards CG treatment as the comparison between basal levels of the major anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Figure 1C) and susceptibility to UNBS1450 in the panel of cancer cell lines examined (Table I) is suggesting. The elucidation of the upstream modulatory mechanisms implicated, the balance with other Bcl-2 family proteins (including the pro-apoptotic Bcl-2-associated X protein (Bax) and Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak)), as well as the potential difference generated by the cellular context remain the next challenges. The known primary target of CGs is the Na^+/K^+-ATPase. The effect on Mcl-1 expression is most likely the consequence of downstream signaling events [2,3]. Alternatively, we cannot exclude the hypothesis of a direct interaction between Mcl-1 and CGs even though, at the present level of our investigations, the timing of the observed modulation rather hints at upstream events to be involved. Our preliminary data indicate that cholesterol depletion by β-methyl-cyclodextrin efficiently prevents both Mcl-1 down-regulation as well as apoptosis induced by UNBS1450 (Cerella et al., manuscript in preparation). In line with our signaling hypothesis is the observation that pan-Src inhibitor also prevents UNBS1450-induced Mcl-1 down-regulation. Previous findings with other CGs [45] generalize this observation and clearly suggest a potential ON-target effect *via*

inhibition of Na^+/K^+-ATPase and Src proteins [39]. The hypothesis of the Na^+/K^+-ATPase as the center of a complex signalosome remains to be further investigated but emerging evidence point at signaling cascades that are initiated downstream. The structural heterogeneity of selected CGs will then allow decoding the intricate regulatory pathways activated and explaining the selective activation of downstream kinase cascades.

In conclusion, we define here the down-regulation of anti-apoptotic protein Mcl-1 as a common hallmark and essential target of CGs. Our study opens avenues for the investigation of key signaling events and the potential role of Mcl-1 as an indicator of anti-cancer activities of these compounds beyond apoptosis.

Materials and Methods

Cell culture

Histiocytic lymphoma U937, chronic myelogenous leukemia K562, T-cell leukemia Jurkat, Burkitt lymphoma Raji, prostate cancer PC-3 and DU145, lung adenocarcinoma A549 cell lines were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany). Neuroblastoma SH-SY5Y, SK-N-AS and BE2-M17, and breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in RPMI 1640 or DMEM medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10 % (v/v) fetal calf serum (FCS; Lonza, Verviers, Belgium) and 1 % (v/v) antibiotic-antimycotic (BioWhittaker, Verviers, Belgium) at 37 °C and 5 % of CO2. Experiments were performed in culture medium containing 10% of FCS with cells in exponential growth phase. Cells were routinely controlled to exclude mycoplasma contamination. Non-adherent cells were seeded in fresh complete medium at concentrations of 300,000 cells/ml. After 1 h of recovery in the incubator, they were treated at the indicated concentrations. Adherent cells were seeded 36 h before treatment at concentrations of 5,000 cells/ well in 96-well plates for viability and proteasome activity assays or 300,000 cells/well in 6-well plates for all the other assays.

Compounds and treatment

All compounds were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium) unless otherwise stated. UNBS1450 was a kind gift from Unibioscreen (Brussels, Belgium), prepared and stored as previously described [19]. Ouabain, digoxin, digitoxin, cinobufagin and proscillaridin A were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. Cycloheximide (CHX) was diluted in sterile water at 1 mg/ml and stored at -20°C. Cells were pre-treated for 6h with UNBS1450 (20 nM) before adding 10 μg/ml CHX. MG132 was diluted in DMSO at a stock concentration of 5 mM. For the proteasome activity assay, U937 and SH-SY5Y cells were incubated at indicated concentrations for 2 h before the measurement (see section below). For protein stability assays, U937 cells were incubated for 6h at 20 nM UNBS1450 before adding 5μM MG132. Samples were collected for further analysis at the indicated times. For the analysis of apoptosis parameters, SH-SY5Y cells were treated with 25 nM UNBS1450 for 10 h

before adding 5 μM MG132 and samples were collected after 6 h. The pan-caspase inhibitor I z-VAD (OMe)-FMK (zVAD; Calbiochem, Leuven, Belgium) was diluted in DMSO at a concentration of 50 mM and added 1 h before treatment with UNBS1450 at the final concentration of 50 μM.

Cell viability assay

Cell viability was measured by using Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega, Leiden, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The luminescence signal, proportional to the amount of ATP, was quantified by using an Orion Microplate Luminometer (Berthold, Pforzheim, Germany). Data were normalized to the control and reported as percentage of viable cells. IC50 values were estimated by treating cells with a suitable range of concentrations (from 0 to 100 nM).

Proteasome activity assay

Proteasome activity was evaluated using Proteasome-Glo™ (Chymotrypsin-like / Caspase-like / Trypsin-like) cell-based assays (Promega, Leiden, Netherlands) [46]. Cells were treated with the indicated concentrations of MG132 and the luminescence signal was quantified by using an Orion Microplate Luminometer. Cell viability was measured in parallel to exclude any bias. Data were normalized to the control and the specific proteasome activities indicated in percent.

Analysis of apoptosis

Apoptosis was quantified by analysis of the nuclear morphology by fluorescence microscopy (Leica-DM IRB microscope, Lecuit, Luxembourg, Luxembourg), after staining cells with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) The percentage of apoptotic cells was quantified as previously described by counting at least three random fields of 100 cells [47,48]. For adherent cell models, trypsinization was performed before staining and analysis.

Transfections

pCMV-HA-Mcl-1 plasmid encoding wild-type human Mcl-1 (WT-Mcl-1) was kindly donated by Pr. Carine Michiels (University of Namur, Belgium) [9]; pcDNA3 vector

bearing the sequence of the human gene Mcl-1 with mutated ubiquitination sites was kindly provided by Pr. Gregory J. Gores (Division of Gastroenterology and Hepatology, College of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota) [29]. Corresponding empty control plasmids were used in parallel. Cells were transfected with Jet Prime kit (Polyplus, Ilkirch, France) according to the manufacturer's instruction. After 24 h, medium was replaced and cells were treated with the indicated compounds at the corresponding IC50 concentrations (20 nM for U937 and Jurkat cells; 25 nM for SH-SH5Y cells).

RNA extraction and Real-Time PCR analysis

Cells were re-suspended in TRIzol (Invitrogen, Fisher Scientific, Tournai, Belgium), prior to RNA extraction, and stored at -80°C. Two μg RNA were used for reverse transcription (RT) using the SuperScriptTM III first strand synthesis system and random hexamer primers (SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen, Fisher Scientific, Tournai, Belgium). Real-time PCR analysis was performed using the SYBR® Green PCR Master Mix (Power SYBR Green PCR Master mix 1X, Applied Biosystems, Halle, Belgium) according to the manufacturer's protocol (7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Lennik, Belgium). Quantification was performed in triplicate, and expression levels of Mcl-1 mRNA (sense: 5'-CCAAGGCATGCTTCGGAAA-3', antisense: 5'-TCACAATCCTGCCCCAGTTT-3') were normalized using internal standards: β-actin (sense: 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'; antisense: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'). Relative gene expression levels correspond to fold induction (RQ) compared with untreated cells.

Extraction of cellular proteins and Western blot analysis

Cells were washed with cold phosphate buffer saline (PBS); then, pellets were lysed using M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, Erembodegem, Belgium) completed with a protease inhibitor cocktail (Roche, Luxembourg), 1 μM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 5mM sodium fluoride) and incubated 15 min at +4 °C in a shaking platform; then centrifuged 15 min at 15,000 at + 4 °C for clarification. Twenty μg of proteins were mixed with 2x Laemmli buffer and boiled. Samples were loaded onto a sodium dodecyl polyacrylamide gel (SDS-page; stacking:

4%; resolving: 10%). After migration, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands), followed by blocking in PBS 0.1% Tween containing 5% milk or BSA (bovine serum albumin). Membranes were incubated with the following primary antibodies: anti-Mcl-1 (1/1000, ON +4 °C, 5% BSA-PBS-T, Cell Signalling Biotechnology, Leiden, Netherlands, cod. 4572), anti-Bcl-xL (1/1000, ON +4 °C, 5% milk-PBS-T, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium; cod. 610212), anti-Bcl-2 (1/2000, ON +4 °C, 5% milk-PBS-T, Calbiochem; cod. OP60), anti-Caspase-3 (1/1000, ON +4 °C, 5% milk-PBS-T, Santa Cruz Biotechnology, Boechout, Belgium; sc-56053), anti-β-actin (1/10000 1 h RT 5% milk-PBS-T, Sigma-Aldrich; cod. A5441). After incubation, membranes were washed with PBS-T, and incubated with the appropriate secondary antibodies anti-mouse-HRP or anti-rabbit-HRP for 1h at RT (Santa Cruz Biotechnology or BD Biosciences). After washing, the membranes were revealed using ECL Plus Western Blotting Detection System Kit (GE Healthcare, Roosendaal Netherlands). Chemiluminescence was detected with LasMini (GE Healthcare, Roosendaal The Netherlands). The bands were quantified using ImageJ. Sample loading was controlled using β-actin.

Microarray analysis

Treatments with 20 nM UNBS1450 were started in the exponential growth phase, 24 hours after passage with 2 x 10^6 cells. Recovery of cells was performed after 0 (no treatment), 3, 6 and 9 h, a separate control sample was performed for each time point. Total RNA was extracted from a batch of 2 x 10^6 to 5 x 10^6 cells by TRIzol (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) and cleanup was performed by the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Quantification of RNA was assessed by Nanodrop (Isogen Life science, Sint-Pieters-Leeuw, Belgium). An RNA integrity value > 9 was considered acceptable (Agilent Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies Belgium, Diegem). Microarray experiments using Agilent 4112F Whole Human Genome Oligo microarrays (Agilent Technologies) were done according to the manufacturer's protocol with 200 ng of total RNA for the preparation of cDNA probes and Cy5- and Cy3-labeled cRNA probes (Low RNA Input Linear Amplification Kit, PLUS, Two-Color). The hybridized and washed probes on each glass slide were scanned by an Axon 4100A microarray scanner (Sunnyvale, CA,

USA). Axon GenePix Pro software version 6.1 was used for feature extraction. Gene expression data were analyzed using the BioConductor [49] package "LIMMA" (version 3.6.1) [50] in the R statistical programming environment (version 2.12.0) [51]. Spots with SNR lower than 1 or flagged as absent were down-weighted in subsequent analysis. Spots flagged as bad in every array were removed from the analysis. Pre-processing included background subtraction "normexp" with an offset of 50 [52], "loess" within-array normalization and "Aquantile" between-array normalization. Entrez Gene IDs were assigned to the corresponding Agilent probe ID, using the Bioconductor annotation package "hgug4112a.db" version 2.4.5 [53]. Spots without Entrez Gene ID annotation were further removed. Significant spots were selected on the basis of a fold change of at least 1.3 and p-value cut-off of 0.05 after multiple hypothesis correction [54]. In case of multiple spots for the same gene, only the most significant (highest F-statistic), was selected for further analysis.

Geneset analyses

GO analysis using whole microarray results was performed using the geneset analysis algorithm ROAST [55], part of LIMMA package (version 3.18.13 [50]) in R/Bioconductor framework (version 3.0.3, [51]), using 9999 rotations weighting genes using their average experimental expression level, as suggested in Wu et al. [55]. We used MsigBD "c5 biological process version 4.0 [56] as source, restricting the analysis to the 574 genesets of 15 genes up to 500 genes. P-value < 0.005 was considered significant. ROAST results were visualized in Cytoscape version 2.8.2 [57], using Enrichment Map plug-in version 1.2 [58]. We used Jaccard Overlap Combined Index and a threshold of 0.375 to link gene sets.

Microarray data accessibility

The gene expression profiles reported in this paper have been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus database. The accession number is pending.

Statistical analysis

Data are presented as mean of at least three independent experiments ± standard deviation. Significance was estimated by using one-way or two-way ANOVA tests, as further detailed in figure legends. Post-hoc analyses where performed using Prism 6

software, GraphPad Software (La Jolla California, USA). P-values < 0.05 were considered as significant.

Acknowledgments

This manuscript is dedicated to the memory of Marian Aldred. FM is supported by the "Marian Aldred Award". The authors are very thankful to ThinkPinkLux and Europadonna Luxembourg for their generous support. CC is supported by a "Waxweiler grant for cancer prevention research" from the Action LIONS "Vaincre le Cancer". AG, FR, EV and SC are supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). Research at LBMCC is financially supported by the Fondation de Recherche Cancer et Sang, the Recherches Scientifiques Luxembourg association, the Een Haerz fir kriibskrank Kanner association, the Action LIONS Vaincre le Cancer association, the European Union (ITN "RedCat" 215009, Interreg IVa project "Corena") and the Télévie Luxembourg. MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant [grant number 2012-0001184].

References

1 Haux J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses*. 1999; **53**: 543-548.

2 Slingerland M, Cerella C, Guchelaar HJ, Diederich M & Gelderblom H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. *Invest New Drugs*. 2013; **31**: 1087-1094.

3 Cerella C, Dicato M & Diederich M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion*. 2013; **13**: 225-234.

4 Lefranc F & Kiss R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia*. 2008; **10**: 198-206.

5 Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F *et al.* The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol*. 2007; **212**: 170-179.

6 Mathieu V, Pirker C, Martin de Lassalle E, Vernier M, Mijatovic T, DeNeve N *et al.* The sodium pump alpha1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *J Cell Mol Med*. 2009; **13**: 3960-3972.

7 Lawrence TS. Ouabain sensitizes tumor cells but not normal cells to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1988; **15**: 953-958.

8 Verheye-Dua F & Bohm L. Na+, K+-ATPase inhibitor, ouabain accentuates irradiation damage in human tumour cell lines. *Radiat Oncol Investig*. 1998; **6**: 109-119.

9 Dong Y, Yin S, Li J, Jiang C, Ye M & Hu H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. *Apoptosis*. 2011; **16**: 394-403.

10 Mijatovic T, Mathieu V, Gaussin JF, De Neve N, Ribaucour F, Van Quaquebeke E *et al.* Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia*. 2006; **8**: 402-412.

11 Newman RA, Kondo Y, Yokoyama T, Dixon S, Cartwright C, Chan D *et al.* Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr Cancer Ther*. 2007; **6**: 354-364.

12 Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y, Shen S *et al.* Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med*. 2012; **4**: 143ra199.

13 Cerella C, Teiten MH, Radogna F, Dicato M & Diederich M. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. *Biotechnol Adv*. 2014; **32**: 1111-1122.

14 Prassas I & Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; **7**: 926-935.

15 Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S & Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2013; **13**: 455-465.

16 Hardwick JM & Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; **5**.

17 Murphy AC, Weyhenmeyer B, Noonan J, Kilbride SM, Schimansky S, Loh KP *et al.* Modulation of Mcl-1 sensitizes glioblastoma to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2014; **19**: 629-642.

18 Nakajima W, Hicks MA, Tanaka N, Krystal GW & Harada H. Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2014; **5**: e1052.
19 Juncker T, Cerella C, Teiten MH, Morceau F, Schumacher M, Ghelfi J *et al.* UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2011; **81**: 13-23.
20 Mijatovic T, Lefranc F, Van Quaquebeke E, Van Vynckt F, Darro F & Kiss R. UNBS1450: A new hemi-synthetic cardenolide with promising anti-cancer activity. *Drug Dev. Res.* 2007; **68**: 164-173.
21 Juncker T, Schumacher M, Dicato M & Diederich M. UNBS1450 from Calotropis procera as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochem Pharmacol*. 2009; **78**: 1-10.
22 Chanvorachote P & Pongrakhananon V. Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013; **304**: C263-272.
23 Pongrakhananon V, Stueckle TA, Wang HY, O'Doherty GA, Dinu CZ, Chanvorachote P *et al.* Monosaccharide digitoxin derivative sensitize human non-small cell lung cancer cells to anoikis through Mcl-1 proteasomal degradation. *Biochem Pharmacol*. 2014; **88**: 23-35.
24 Waiwut P, Inujima A, Inoue H, Saiki I & Sakurai H. Bufotalin sensitizes death receptor-induced apoptosis via Bid- and STAT1-dependent pathways. *Int J Oncol*. 2012; **40**: 203-208.
25 Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A *et al.* Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**: 554-559.
26 Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lim DS, de Souza-Pinto NC, Hansford R *et al.* Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 21155-21161.
27 Herrant M, Jacquel A, Marchetti S, Belhacene N, Colosetti P, Luciano F *et al.* Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene*. 2004; **23**: 7863-7873.
28 Pang X, Zhang J, Lopez H, Wang Y, Li W, O'Neill KL *et al.* The Carboxyl-terminal Tail of Noxa Protein Regulates the Stability of Noxa and Mcl-1. *J Biol Chem*. 2014; **289**: 17802-17811.
29 Masuoka HC, Mott J, Bronk SF, Werneburg NW, Akazawa Y, Kaufmann SH *et al.* Mcl-1 degradation during hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*. 2009; **284**: 30039-30048.
30 Rapino F, Naumann I & Fulda S. Bortezomib antagonizes microtubule-interfering drug-induced apoptosis by inhibiting G2/M transition and MCL-1 degradation. *Cell Death Dis*. 2013; **4**: e925.
31 Swift F, Tovsrud N, Sjaastad I, Sejersted OM, Niggli E & Egger M. Functional coupling of alpha(2)-isoform Na(+)/K(+)-ATPase and Ca(2+) extrusion through the Na(+)/Ca(2+)-exchanger in cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2010; **48**: 54-60.
32 Teiten MH, Mack F, Debbab A, Aly AH, Dicato M, Proksch P *et al.* Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus Stemphylium globuliferum, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF-kappaB activity. *Bioorg Med Chem*. 2013; **21**: 3850-3858.

33 Gaascht F, Teiten MH, Cerella C, Dicato M, Bagrel D & Diederich M. Plumbagin modulates leukemia cell redox status. *Molecules*. 2014; **19**: 10011-10032.
34 Spagnuolo C, Cerella C, Russo M, Chateauvieux S, Diederich M & Russo GL. Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. *Br J Cancer*. 2011; **105**: 221-230.
35 Yan J, Zhong N, Liu G, Chen K, Liu X, Su L *et al.* Usp9x- and Noxa-mediated Mcl-1 downregulation contributes to pemetrexed-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cells. *Cell Death Dis*. 2014; **5**: e1316.
36 Pradelli LA, Beneteau M, Chauvin C, Jacquin MA, Marchetti S, Munoz-Pinedo C *et al.* Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene*. 2010; **29**: 1641-1652.
37 Cerella C, Gaigneaux A, Dicato M & Diederich M. Antagonistic role of natural compounds in mTOR-mediated metabolic reprogramming. *Cancer Lett*. 2014.
38 Cerella C, Dicato M & Diederich M. Modulatory roles of glycolytic enzymes in cell death. *Biochem Pharmacol*. 2014.
39 Riganti C, Campia I, Kopecka J, Gazzano E, Doublier S, Aldieri E *et al.* Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. *Curr Med Chem*. 2011; **18**: 872-885.
40 Rooswinkel RW, van de Kooij B, de Vries E, Paauwe M, Braster R, Verheij M *et al.* Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood*. 2014; **123**: 2806-2815.
41 Meynet O, Zunino B, Happo L, Pradelli LA, Chiche J, Jacquin MA *et al.* Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. *Blood*. 2013; **122**: 2402-2411.
42 Perne A, Muellner MK, Steinrueck M, Craig-Mueller N, Mayerhofer J, Schwarzinger I *et al.* Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. *PLoS One*. 2009; **4**: e8292.
43 Wang Y, Qiu Q, Shen JJ, Li DD, Jiang XJ, Si SY *et al.* Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; **44**: 1813-1824.
44 Zhang DM, Liu JS, Deng LJ, Chen MF, Yiu A, Cao HH *et al.* Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Carcinogenesis*. 2013; **34**: 1331-1342.
45 Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S *et al.* Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na+/K+-ATPase. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 17250-17259.
46 Schumacher M, Cerella C, Eifes S, Chateauvieux S, Morceau F, Jaspars M *et al.* Heteronemin, a spongean sesterterpene, inhibits TNF alpha-induced NF-kappa B activation through proteasome inhibition and induces apoptotic cell death. *Biochem Pharmacol*. 2010; **79**: 610-622.
47 Cerella C, Sobolewski C, Chateauvieux S, Henry E, Schnekenburger M, Ghelfi J *et al.* COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2011; **82**: 1277-1290.

48 Cerella C, Cordisco S, Albertini MC, Accorsi A, Diederich M & Ghibelli L. Magnetic fields promote a pro-survival non-capacitative Ca2+ entry via phospholipase C signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; **43**: 393-400.
49 Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004; **5**: R80.
50 Smyth G. in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* (eds Gentleman, Carey, Dudoit, Irizarry & Huber) 397-420 (Springer, 2005).
51 A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014).
52 Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, Holloway A *et al.* A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 2007; **23**: 2700-2707.
53 hgug4112a.db: Agilent "Human Genome, Whole" annotation data (chip hgug4112a).
54 Benjamini Y & Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B*. 1995; **57**: 289-300.
55 Wu D, Lim E, Vaillant F, Asselin-Labat ML, Visvader JE & Smyth GK. ROAST: rotation gene set tests for complex microarray experiments. *Bioinformatics*. 2010; **26**: 2176-2182.
56 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**: 15545-15550.
57 Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL & Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011; **27**: 431-432.
58 Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A & Bader GD. Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One*. 2010; **5**: e13984.

Table I. IC50 values were estimated after 24 h treatment with UNBS1450 on the same panel of cell models as in Figure 1C,D. The impact of UNBS1450 on cell metabolism/viability was evaluated by Cell Titer-Glo® assay. Values are the mean of three independent experiments ± SD.

Cell line	**IC50 24h (nM)**
U937	17.8 ± 1.0
Raji	40.2 ± 3.7
K562	32.7 ± 3.1
Jurkat	15.6 ± 0.7
PC3	51.0 ± 17.0
DU145	21.0 ± 3.0
A549	32.0 ± 3.0
SH-SY5Y	28.4 ± 0.4
S-K-NAS	48.7 ± 4.9
BE2-M17	51.0 ± 2.0

Figure Legends

Figure 1. Mcl-1 protein is early and ubiquitously down-regulated by UNBS1450 in human cancer cells. Kinetic analysis by Western blot of Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 protein expression in U937 (**A**) and Jurkat (**B**) cells following the treatment with UNBS1450 (20 nM). In parallel, caspase activation was assayed by analysis of caspase-3 cleavage and confirmed by caspase-3/7 activity assay (bottom panels). **C**) Western Blot analysis of the levels of basal expression of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL proteins in different human cell lines. **D**) Comparative Western blot analysis of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL expression after UNBS1450 treatment at the corresponding IC50 values for 24 h. One of three independent experiments is shown for the Western blot analysis. Values are the mean of three independent experiments +/- SD. Statistical analysis was performed with one way-ANOVA test (post-hoc test: Sidak). Significance is reported as: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ respect control values.

Figure 2. Mcl-1 is a common target of cardiac glycosides. U937 cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of (**A**) the cardenolides ouabain, digitoxin and digoxin or (**B**) the bufadienolides cinobufagin and proscillaridin A. Apoptosis was quantified by analysis the nuclear morphology. Values are the mean of three independent experiments +/- SD. The levels of the three major anti-apoptotic Bcl-2 proteins were analyzed in parallel by Western blot. One of three independent experiments is shown. Statistical analysis was performed with one way-ANOVA test (post-hoc test: Sidak). Significance is reported as * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ respect control values.

Figure 3. The effect of UNBS1450 on apoptosis is independent of transcriptional modulation (Microarray analysis). Venn diagram (**A**) showing the number of significant genes at each time point and overlap between gene lists. Up-regulated genes (red) and down-regulated genes (blue) were specified. The number at the bottom right of the figure indicated the number genes not significant in any condition (**B**-**D**). GO biological processes affected by treatment after (**B**) 3 h, (**C**) 6 h, and (**D**) 9 h is reported. Up-regulated processes are in red and down-regulated processes are in blue. Green links indicate similarity between processes.

Figure 4. UNBS1450 down-regulates Mcl-1 protein expression *via* a mechanism involving protein stability and the proteasome. A) After treatment of Jurkat cells with UNBS1450 (20 nM) Mcl-1 mRNA expression was measured after 0, 2, 4, 6 and 8, 10 and 12 h (a time leading to Mcl-1 protein downregulation in this cell model). **B**) Same analysis was performed on U937 cells with UNBS1450 (20 nM) or ouabain (100 nM), where Mcl-1 mRNA expression was measured after 0, 2, 4, 6 and 8 h. **C**) Analysis of Mcl-1 protein stability. U937 cells were incubated with 20 nM UNBS1450 and after 6 h co-treated with or without 10 μM cycloheximide (CHX) for further 2 h compared to untreated control cells (Ctrl). Samples were collected every 30 minutes and analyzed by Western blot. Graph reports the quantification of Mcl-1 protein of 6 independent experiments +/- SD. **D**) Determination of the concentration of MG132 required to inhibit the proteasome activity in U937 cells. Results are the mean of three independent experiments +/- SD. **E**) 5 μM MG132 were selected to analyze the effect on Mcl-1 protein expression in presence/absence of UNBS1450. MG132 was added after 6 h treatment with 20 nM UNBS1450. Samples were collected after 2 h for Western blot analysis of Mcl-1. **F**) Effects of the pan-caspase inhibitor (zVAD; 50 μM) on apoptosis (top) and Mcl-1/Bcl-xL expression (bottom) after 12 h treatment with UNBS1450. **G**) Analysis of the impact of UNBS1450 on NOXA expression at mRNA and protein levels. U937 cells treated with 20 μM cisplatin for 24 h were used as positive control. Western blots are representative of three independent experiments. Results are the mean of three independent experiments +/- SD. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA test (post-hoc test: Dunnett or Sidak). Significance is reported as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. In panel (**B**), significance is reported for UNBS1450 + CHX vs. CHX or UNBS1450.

Figure 5. Mcl-1 down-regulation regulates cytocidal effects of UNBS1450. SH-SY5Y cells were transfected and treated as reported in Material and methods with WT Mcl-1 plasmid (**A** and **B**) or KR Mcl-1 plasmid (**C** and **D**). Induction of apoptosis was analyzed by nuclear morphology after 16 h UNBS1450 (25 nM) treatment. In parallel, Mcl-1 level and caspase-3/-7 cleavage were assessed by Western blot. (**D**) A concentration of 5 μM of MG132 was selected to study the impact on apoptosis (**E**) and (**F**) Mcl-1, caspase-3/7 cleavage in presence/absence of UNBS1450. MG132 was

added after 10 h treatment with 25 nM UNBS1450, the minimum time required to induce Mcl-1 modulation in these cells (not shown), to minimize any side toxic effects of a longer exposure to the proteasome inhibitor. Western blots are representative of three independent experiments. The results are the mean of three independent experiments +/- SD. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA test (post-hoc test: Dunnett or Tukey) Significance is reported as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.001$ against the respective control values.

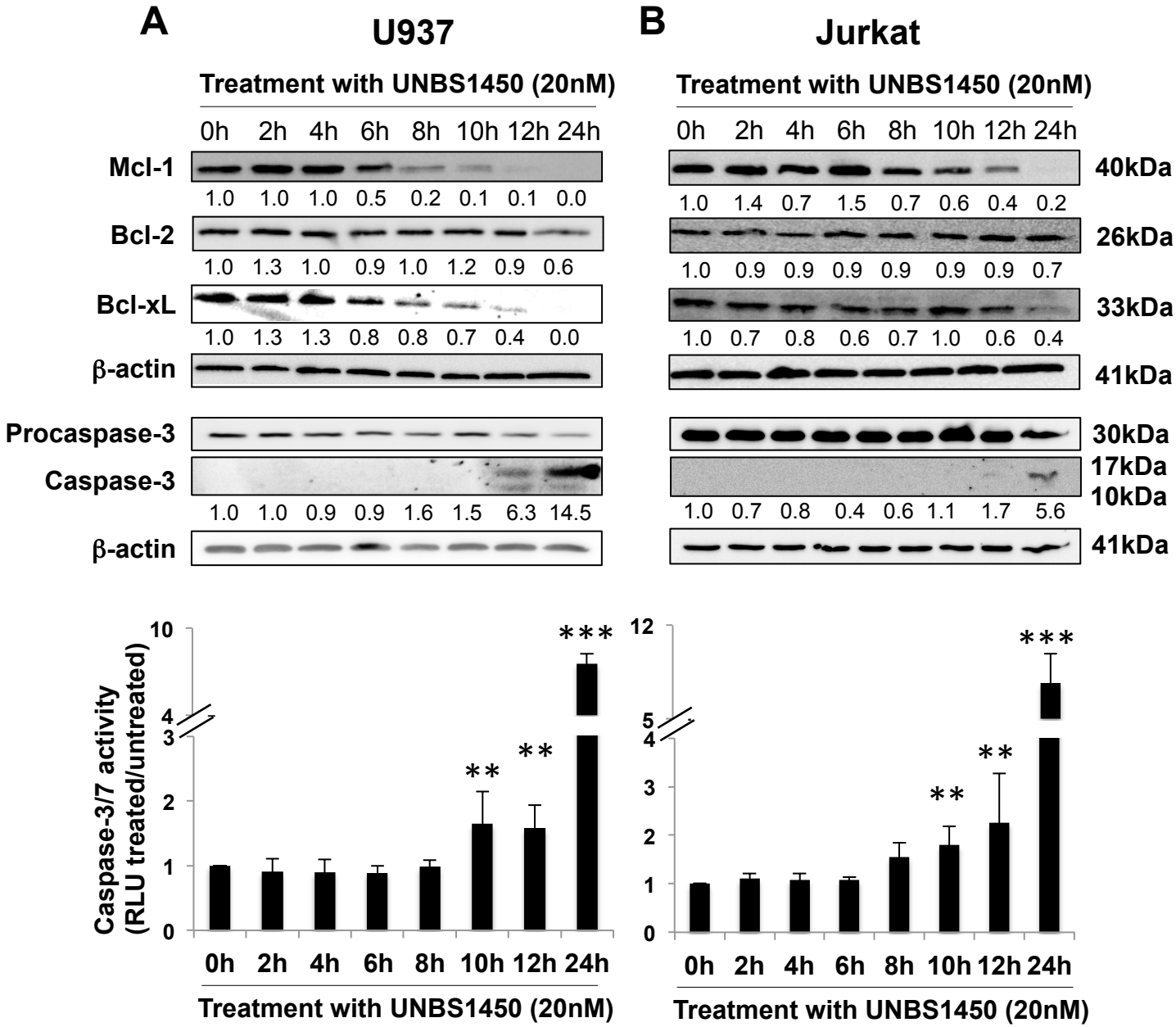

A
U937
Treatment with UNBS1450 (20nM)
0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 24h
Mcl-1
1.0 1.0 1.0 0.5 0.2 0.1 0.1 0.0
Bcl-2
1.0 1.3 1.0 0.9 1.0 1.2 0.9 0.6
Bcl-xL
1.0 1.3 1.3 0.8 0.8 0.7 0.4 0.0
β-actin
Procaspase-3
Caspase-3
1.0 1.0 0.9 0.9 1.6 1.5 6.3 14.5
β-actin
B
Jurkat
Treatment with UNBS1450 (20nM)
0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 24h
40kDa
1.0 1.4 0.7 1.5 0.7 0.6 0.4 0.2
26kDa
1.0 0.9 0.9 0.9 0.9 0.9 0.9 0.7
33kDa
1.0 0.7 0.8 0.6 0.7 1.0 0.6 0.4
41kDa
30kDa
17kDa
10kDa
1.0 0.7 0.8 0.4 0.6 1.1 1.7 5.6
41kDa
Caspase-3/7 activity
(RLU treated/untreated)
0 1 2 3 4 10
**
**
***
0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 24h
Treatment with UNBS1450 (20nM)
0 1 2 3 4 5 12
**
**
***
0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 24h
Treatment with UNBS1450 (20nM)

Figure 1

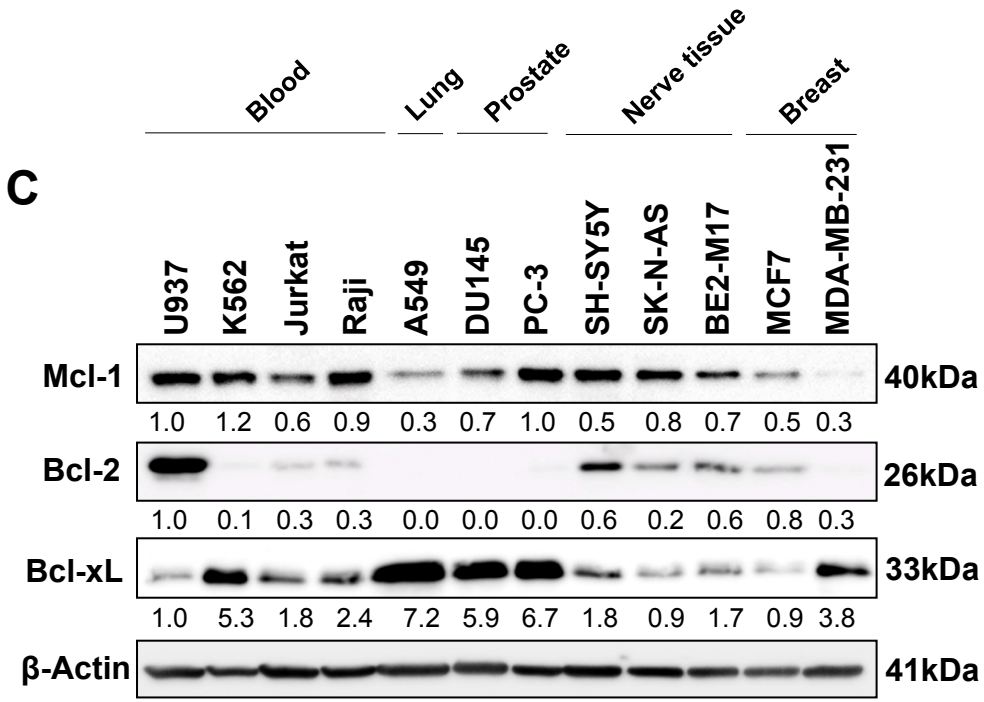

C
Blood
Lung
Prostate
Nerve tissue
Breast
U937
K562
Jurkat
Raji
A549
DU145
PC-3
SH-SY5Y
SK-N-AS
BE2-M17
MCF7
MDA-MB-231
Mcl-1
40kDa
1.0 1.2 0.6 0.9 0.3 0.7 1.0 0.5 0.8 0.7 0.5 0.3
Bcl-2
26kDa
1.0 0.1 0.3 0.3 0.0 0.0 0.0 0.6 0.2 0.6 0.8 0.3
Bcl-xL
33kDa
1.0 5.3 1.8 2.4 7.2 5.9 6.7 1.8 0.9 1.7 0.9 3.8
β-Actin
41kDa

Figure 1

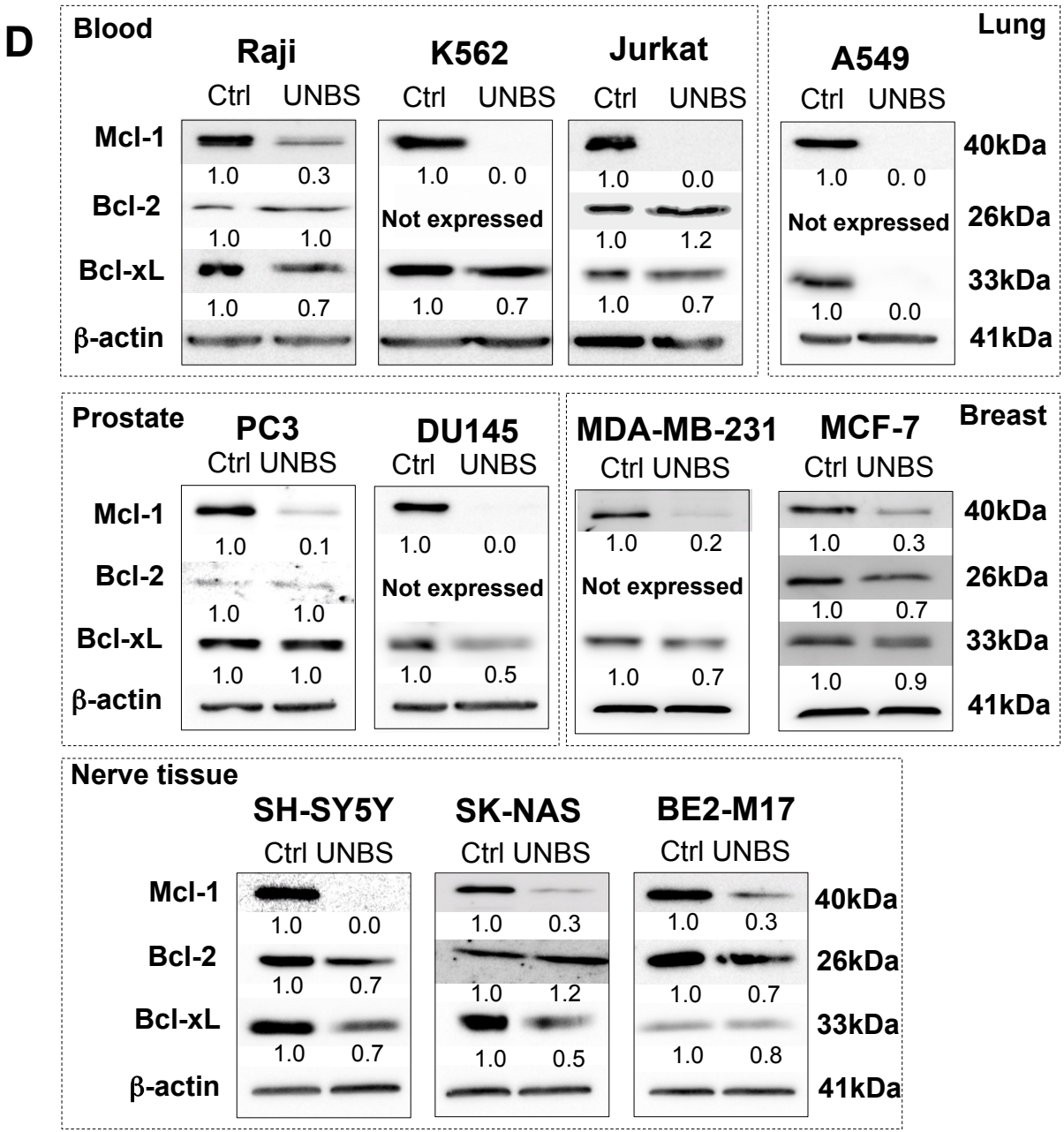

D
Blood
Raji
K562
Jurkat
Lung
A549
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Mcl-1
Bcl-2
Bcl-xL
β-actin
1.0 0.3
1.0 1.0
1.0 0.7
1.0 0. 0
Not expressed
1.0 0.7
1.0 0.0
1.0 1.2
1.0 0.7
1.0 0. 0
Not expressed
1.0 0.0
40kDa
26kDa
33kDa
41kDa
Prostate
PC3
DU145
MDA-MB-231
MCF-7
Breast
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Mcl-1
Bcl-2
Bcl-xL
β-actin
1.0 0.1
1.0 1.0
1.0 1.0
1.0 0.0
Not expressed
1.0 0.5
1.0 0.2
Not expressed
1.0 0.7
1.0 0.3
1.0 0.7
1.0 0.9
40kDa
26kDa
33kDa
41kDa
Nerve tissue
SH-SY5Y
SK-NAS
BE2-M17
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Ctrl UNBS
Mcl-1
Bcl-2
Bcl-xL
β-actin
1.0 0.0
1.0 0.7
1.0 0.7
1.0 0.3
1.0 1.2
1.0 0.5
1.0 0.3
1.0 0.7
1.0 0.8
40kDa
26kDa
33kDa
41kDa

Figure 1

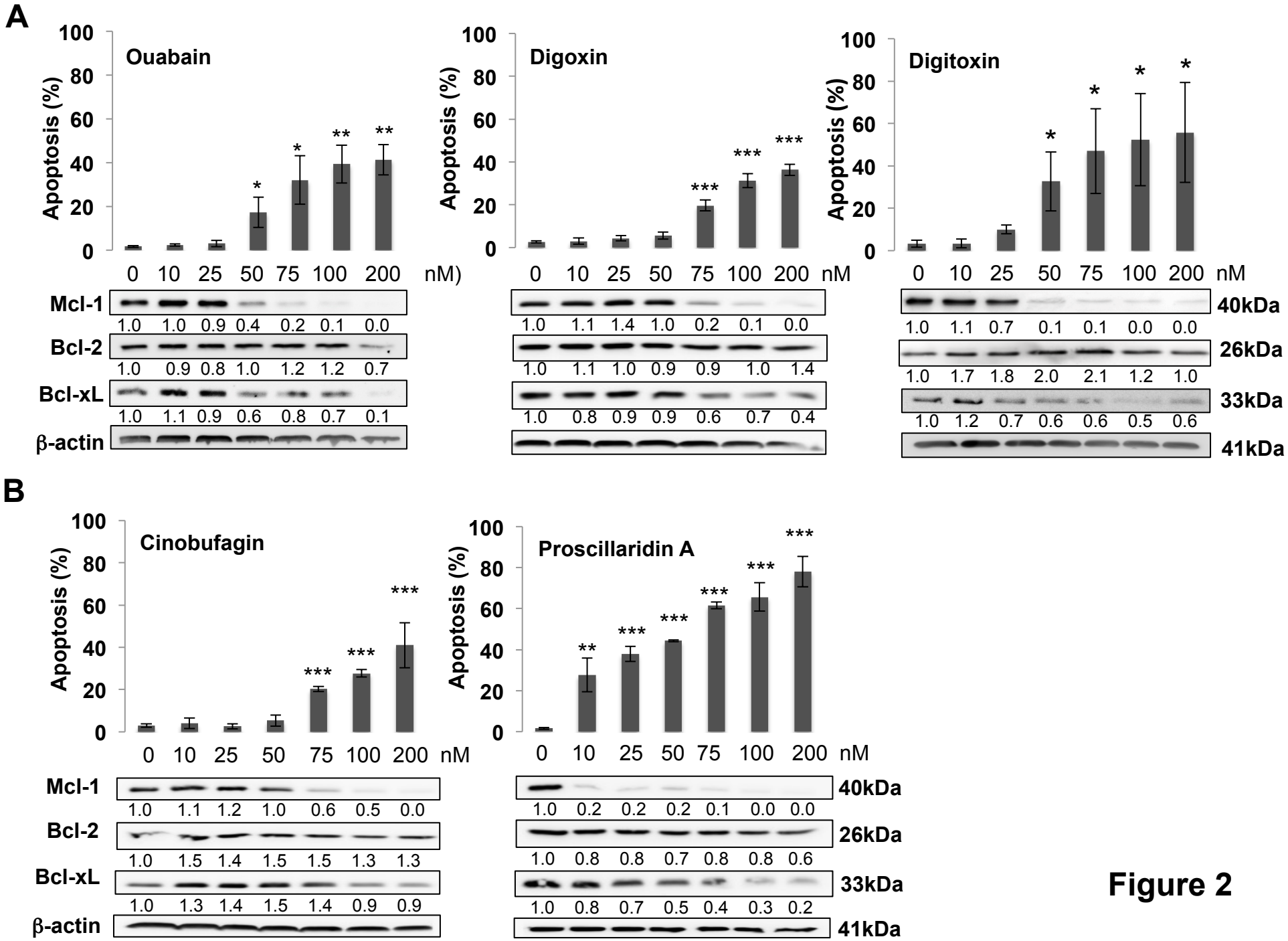

A
Ouabain
Digoxin
Digitoxin
Apoptosis (%)
0 10 25 50 75 100 200 nM
Mcl-1
1.0 1.0 0.9 0.4 0.2 0.1 0.0
1.0 1.1 1.4 1.0 0.2 0.1 0.0
1.0 1.1 0.7 0.1 0.1 0.0 0.0
Bcl-2
1.0 0.9 0.8 1.0 1.2 1.2 0.7
1.0 1.1 1.0 0.9 0.9 1.0 1.4
1.0 1.7 1.8 2.0 2.1 1.2 1.0
Bcl-xL
1.0 1.1 0.9 0.6 0.8 0.7 0.1
1.0 0.8 0.9 0.9 0.6 0.7 0.4
1.0 1.2 0.7 0.6 0.6 0.5 0.6
β-actin
40kDa
26kDa
33kDa
41kDa
B
Cinobufagin
Proscillaridin A
1.0 1.1 1.2 1.0 0.6 0.5 0.0
1.0 0.2 0.2 0.2 0.1 0.0 0.0
1.0 1.5 1.4 1.5 1.5 1.3 1.3
1.0 0.8 0.8 0.7 0.8 0.8 0.6
1.0 1.3 1.4 1.5 1.4 0.9 0.9
1.0 0.8 0.7 0.5 0.4 0.3 0.2

Figure 2

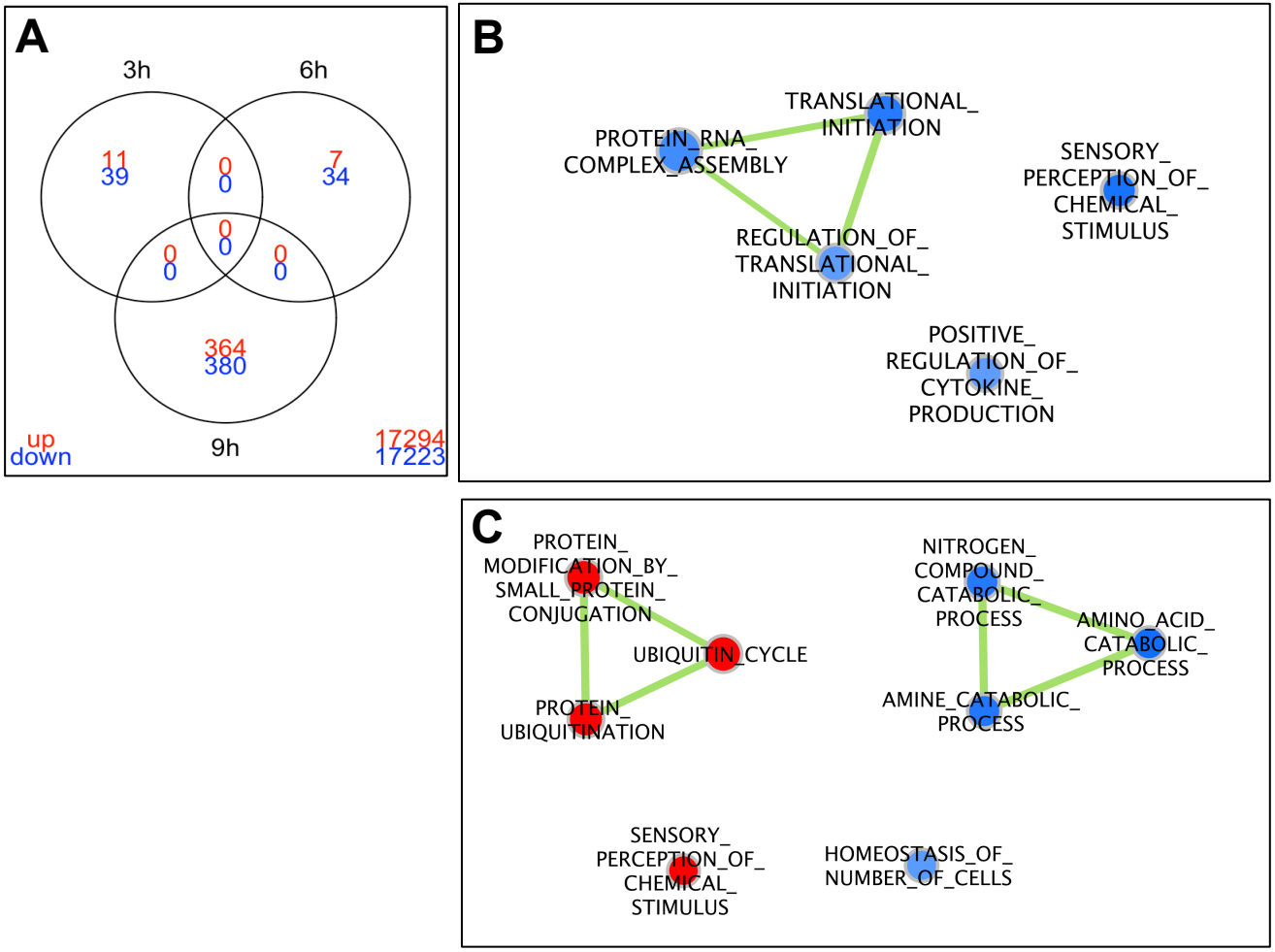

A
3h
6h
9h
11
39
0
0
7
34
0
0
0
0
0
0
364
380
up
down
17294
17223
B
TRANSLATIONAL_
INITIATION
PROTEIN_RNA_
COMPLEX_ASSEMBLY
SENSORY_
PERCEPTION_OF_
CHEMICAL_
STIMULUS
REGULATION_OF_
TRANSLATIONAL_
INITIATION
POSITIVE_
REGULATION_OF_
CYTOKINE_
PRODUCTION
C
PROTEIN_
MODIFICATION_BY_
SMALL_PROTEIN_
CONJUGATION
UBIQUITIN_CYCLE
PROTEIN_
UBIQUITINATION
NITROGEN_
COMPOUND_
CATABOLIC_
PROCESS
AMINO_ACID_
CATABOLIC_
PROCESS
AMINE_CATABOLIC_
PROCESS
SENSORY_
PERCEPTION_OF_
CHEMICAL_
STIMULUS
HOMEOSTASIS_OF_
NUMBER_OF_CELLS

Figure 3

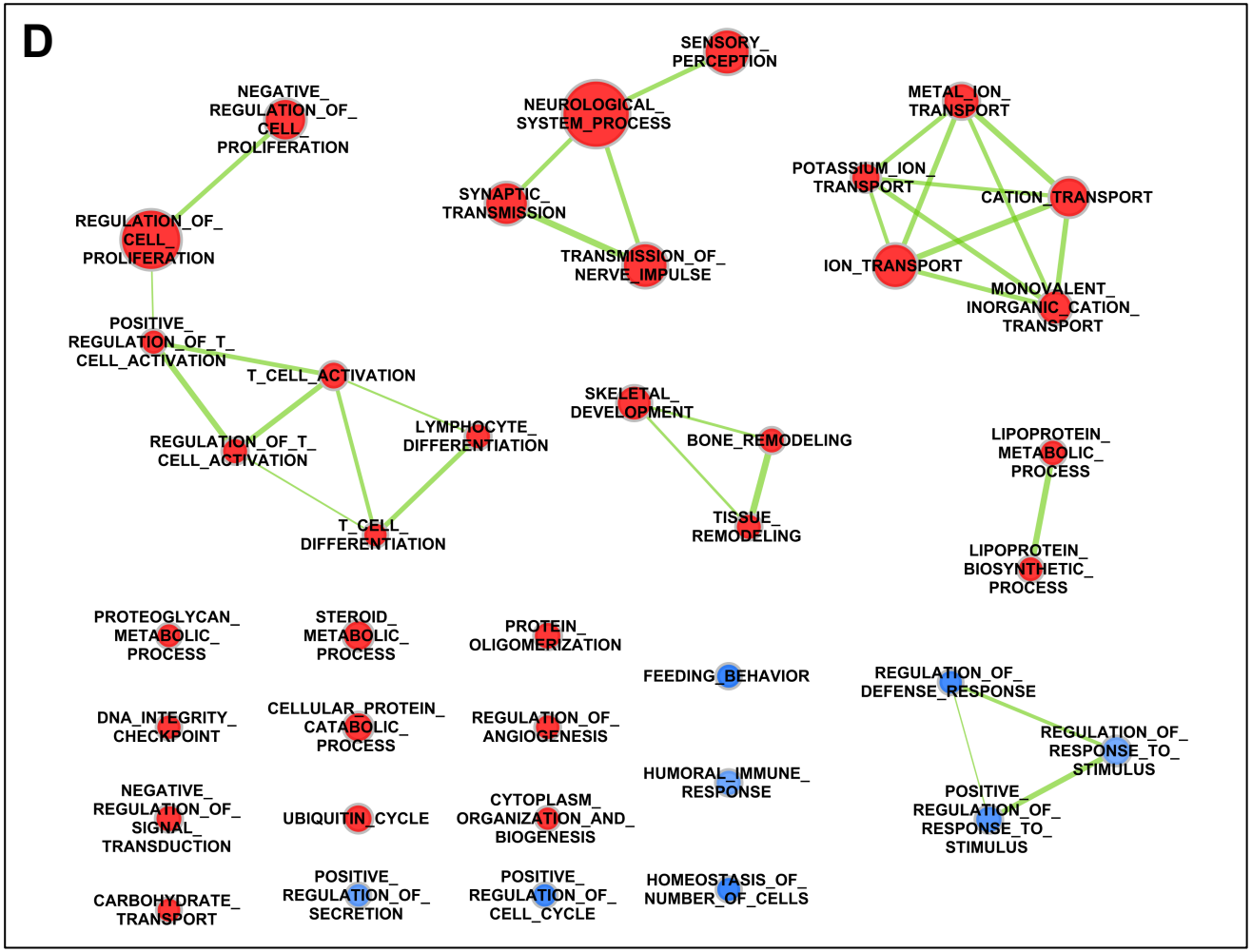

D
SENSORY_ PERCEPTION
NEGATIVE_ REGULATION_OF_ CELL_ PROLIFERATION
NEUROLOGICAL_ SYSTEM_PROCESS
METAL_ION_ TRANSPORT
POTASSIUM_ION_ TRANSPORT
CATION_TRANSPORT
SYNAPTIC_ TRANSMISSION
REGULATION_OF_ CELL_ PROLIFERATION
TRANSMISSION_OF_ NERVE_IMPULSE
ION_TRANSPORT
MONOVALENT_ INORGANIC_CATION_ TRANSPORT
POSITIVE_ REGULATION_OF_T_ CELL_ACTIVATION
T_CELL_ACTIVATION
SKELETAL_ DEVELOPMENT
LIPOPROTEIN_ METABOLIC_ PROCESS
LYMPHOCYTE_ DIFFERENTIATION
REGULATION_OF_T_ CELL_ACTIVATION
BONE_REMODELING
T_CELL_ DIFFERENTIATION
TISSUE_ REMODELING
LIPOPROTEIN_ BIOSYNTHETIC_ PROCESS
PROTEOGLYCAN_ METABOLIC_ PROCESS
STEROID_ METABOLIC_ PROCESS
PROTEIN_ OLIGOMERIZATION
FEEDING_BEHAVIOR
REGULATION_OF_ DEFENSE_RESPONSE
DNA_INTEGRITY_ CHECKPOINT
CELLULAR_PROTEIN_ CATABOLIC_ PROCESS
REGULATION_OF_ ANGIOGENESIS
REGULATION_OF_ RESPONSE_TO_ STIMULUS
HUMORAL_IMMUNE_ RESPONSE
NEGATIVE_ REGULATION_OF_ SIGNAL_ TRANSDUCTION
UBIQUITIN_CYCLE
CYTOPLASM_ ORGANIZATION_AND_ BIOGENESIS
POSITIVE_ REGULATION_OF_ RESPONSE_TO_ STIMULUS
CARBOHYDRATE_ TRANSPORT
POSITIVE_ REGULATION_OF_ SECRETION
POSITIVE_ REGULATION_OF_ CELL_CYCLE
HOMEOSTASIS_OF_ NUMBER_OF_CELLS

Figure 3

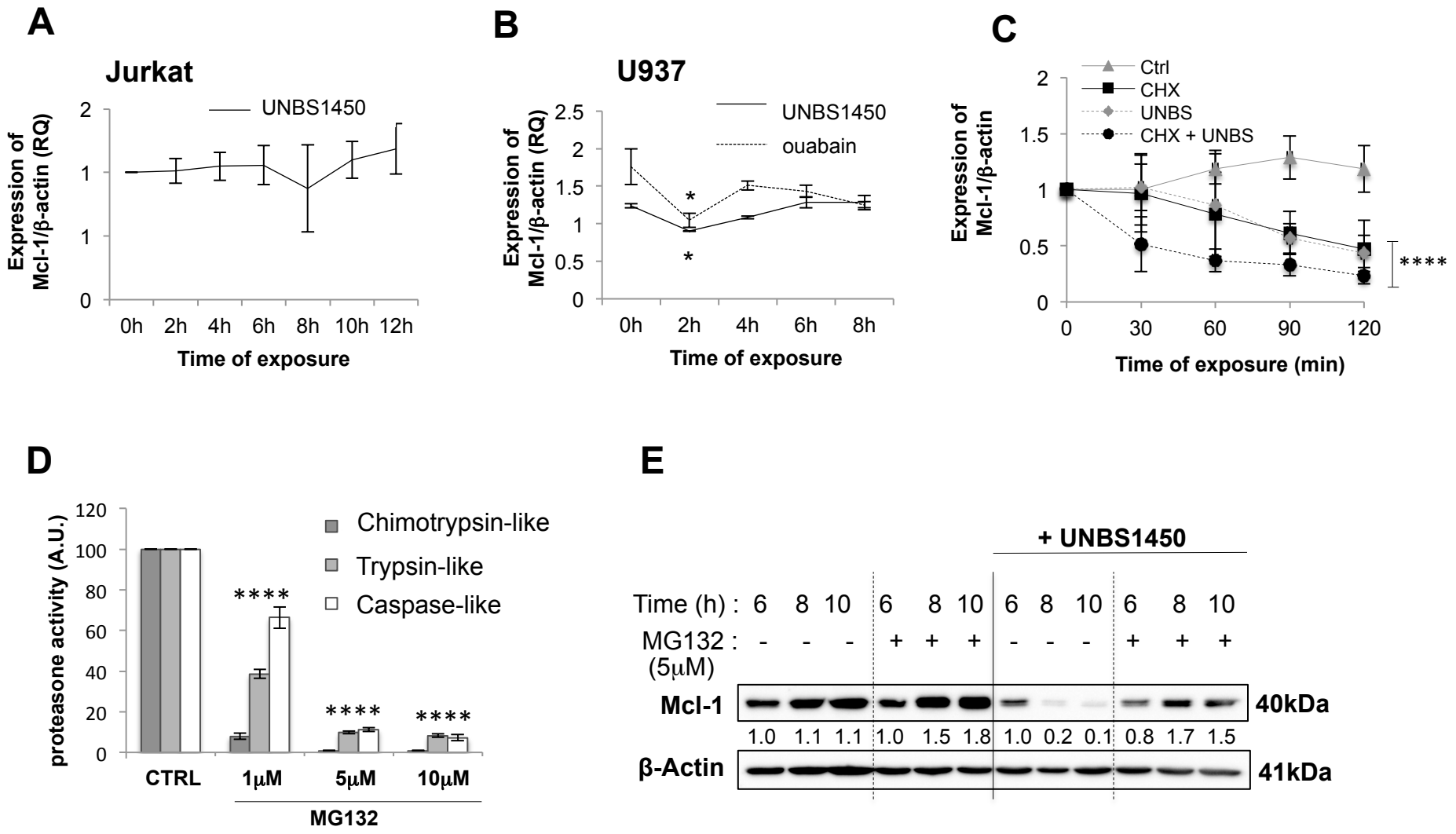

A
Jurkat
UNBS1450
Expression of Mcl-1/β-actin (RQ)
Time of exposure
0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h
B
U937
UNBS1450
ouabain
Expression of Mcl-1/β-actin (RQ)
Time of exposure
0h 2h 4h 6h 8h
C
Ctrl
CHX
UNBS
CHX + UNBS
Expression of Mcl-1/β-actin
****
Time of exposure (min)
D
Chimotrypsin-like
Trypsin-like
Caspase-like
proteasone activity (A.U.)
****
****
****
CTRL
1μM
5μM
10μM
MG132
E
+ UNBS1450
Time (h) : 6 8 10 6 8 10 6 8 10 6 8 10
MG132 : - - - + + + - - - + + +
(5μM)
Mcl-1
40kDa
1.0 1.1 1.1 1.0 1.5 1.8 1.0 0.2 0.1 0.8 1.7 1.5
β-Actin
41kDa

Figure 4

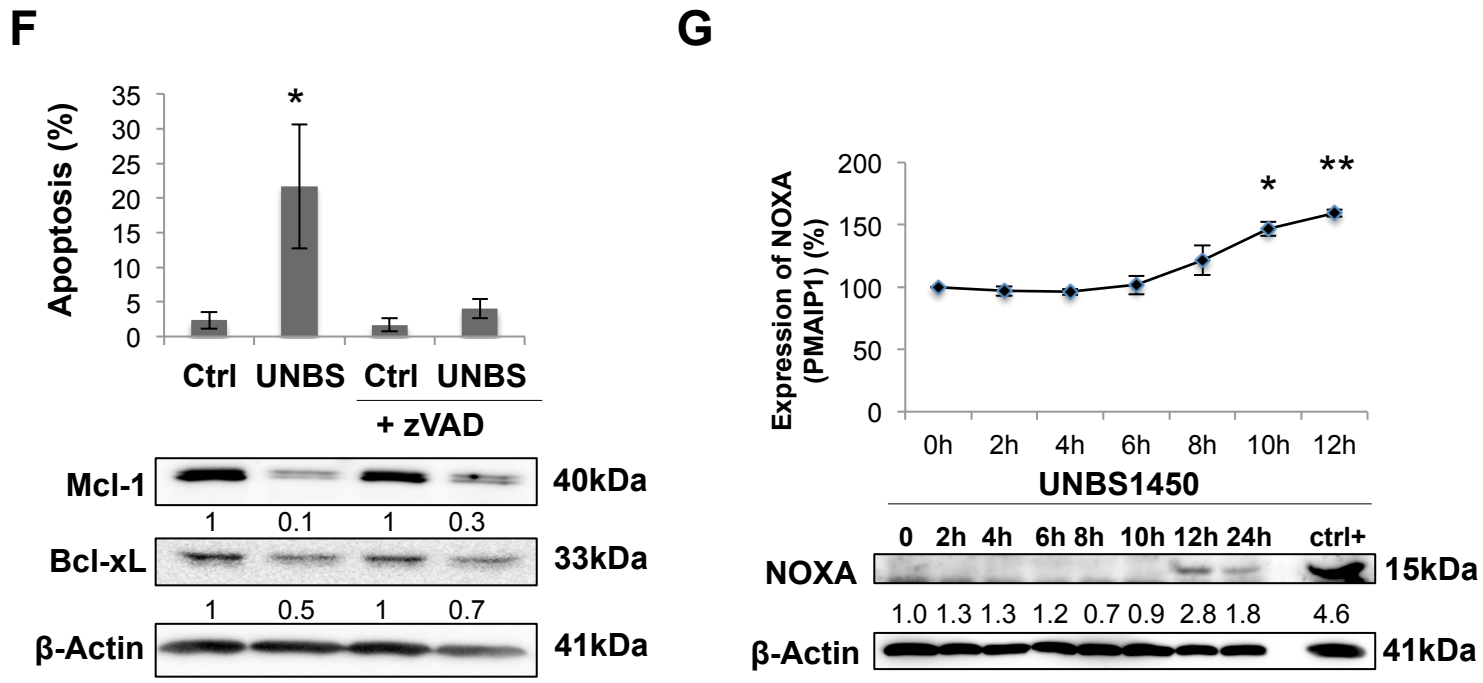

F
Apoptosis (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
*
Ctrl
UNBS
Ctrl
UNBS
+ zVAD
Mcl-1
40kDa
1
0.1
1
0.3
Bcl-xL
33kDa
1
0.5
1
0.7
β-Actin
41kDa
G
Expression of NOXA (PMAIP1) (%)
200
150
100
50
0
*
**
0h
2h
4h
6h
8h
10h
12h
UNBS1450
0
2h
4h
6h
8h
10h
12h
24h
ctrl+
NOXA
15kDa
1.0
1.3
1.3
1.2
0.7
0.9
2.8
1.8
4.6
β-Actin
41kDa

Figure 4

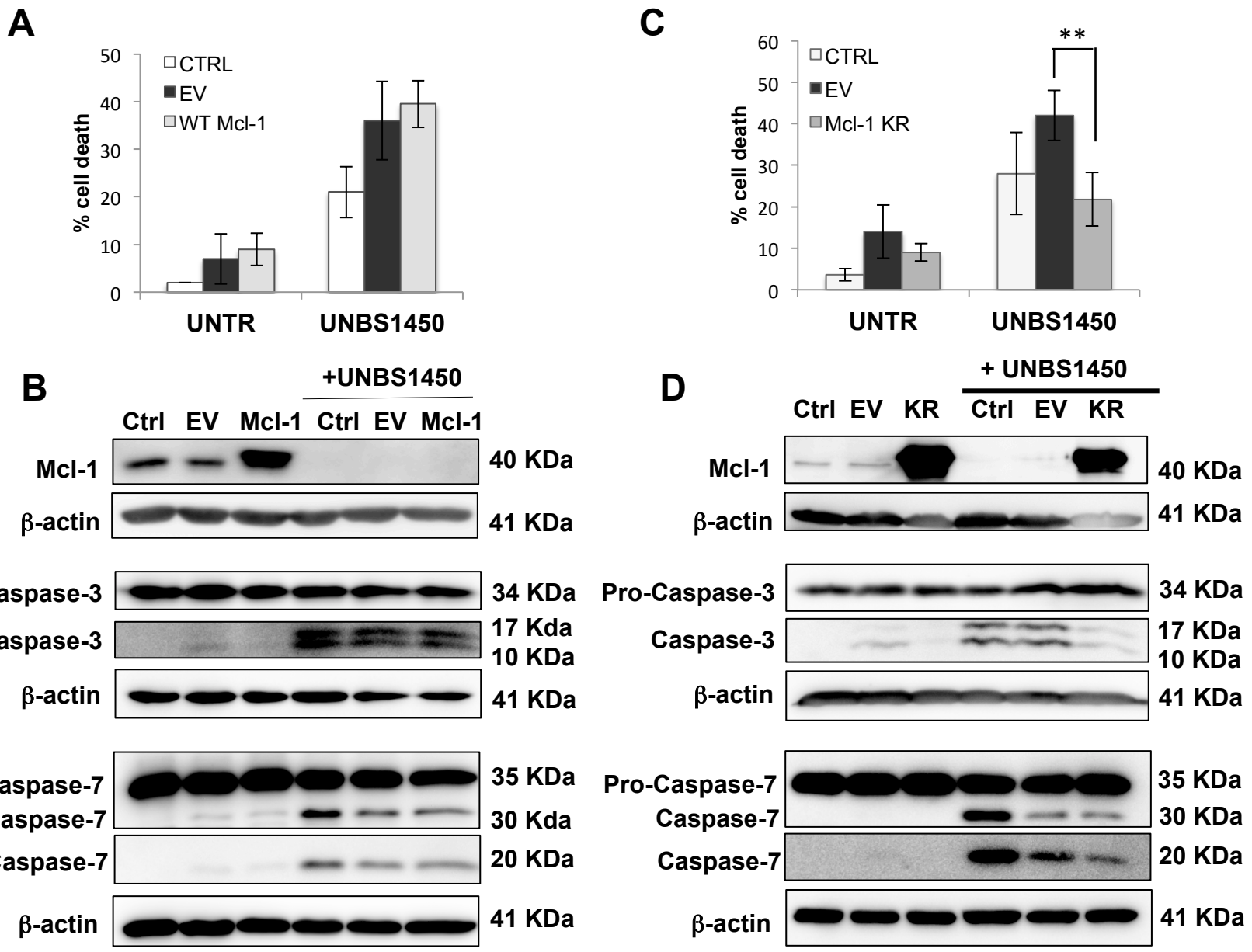

A
% cell death
CTRL
EV
WT Mcl-1
UNTR
UNBS1450
C
% cell death
CTRL
EV
Mcl-1 KR
**
UNTR
UNBS1450
B
+UNBS1450
Ctrl EV Mcl-1 Ctrl EV Mcl-1
Mcl-1
40 KDa
β-actin
41 KDa
Pro-Caspase-3
34 KDa
Caspase-3
17 Kda
10 KDa
β-actin
41 KDa
Pro-Caspase-7
35 KDa
Caspase-7
30 Kda
Caspase-7
20 KDa
β-actin
41 KDa
D
+ UNBS1450
Ctrl EV KR Ctrl EV KR
Mcl-1
40 KDa
β-actin
41 KDa
Pro-Caspase-3
34 KDa
Caspase-3
17 KDa
10 KDa
β-actin
41 KDa
Pro-Caspase-7
35 KDa
Caspase-7
30 KDa
Caspase-7
20 KDa
β-actin
41 KDa

Figure 5

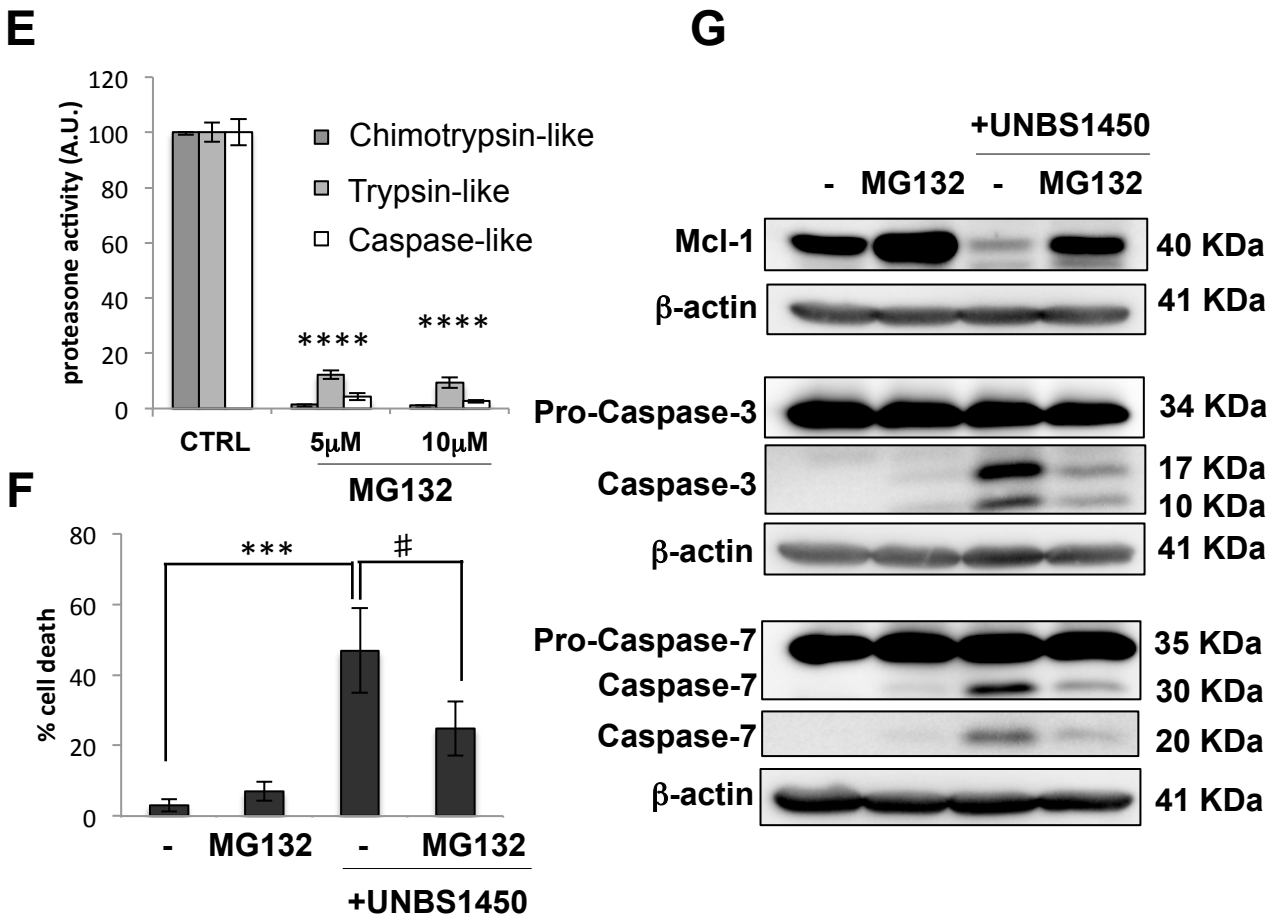

E
proteasone activity (A.U.)
120
100
80
60
40
20
0
Chimotrypsin-like
Trypsin-like
Caspase-like
****
****
CTRL
5μM
10μM
MG132
F
% cell death
80
60
40
20
0
***
#
-
MG132
-
MG132
+UNBS1450
G
+UNBS1450
-
MG132
-
MG132
Mcl-1
40 KDa
β-actin
41 KDa
Pro-Caspase-3
34 KDa
Caspase-3
17 KDa
10 KDa
β-actin
41 KDa
Pro-Caspase-7
35 KDa
Caspase-7
30 KDa
Caspase-7
20 KDa
β-actin
41 KDa

Figure 5

2,5-Dimethyl-celecoxib inhibits cell cycle progression and induces apoptosis in human leukemia cells

Cyril Sobolewski[1], Noémie Legrand[1&], Florian Muller[1&], Claudia Cerella[1], Fabienne Mack[1], Mario Dicato[1], and Marc Diederich[1,2*]

[1] Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg
9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg
[2]Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

&Equal contribution

Running title: DMC inhibits cell growth in leukemia

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; ATF4, activating transcription factor 4; COX, cyclooxygenase; CHOP, C/EBP homologous protein; CML, chronic myelogenous leukemia; ERK1/2: Extracellular-Regulated Kinase 1/2; GRP78, 78kDA glucose-regulated protein; Il-1β, Interleukin-1β; PGE2, prostaglandin E2; NF-κB, Nuclear Factor-kappa B; TNFα, Tumor Necrosis Factor α;

***Corresponding author**: Marc Diederich Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 151-742, Korea
E-mail address: E-Mail: marcdiederich@snu.ac.kr;
Tel.: +82-2-880-8919.

Abstract

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an essential regulator of cancer promotion and progression. Extensive efforts to target this enzyme have been developed in order to reduce growth of cancer cells for chemopreventive and therapeutic reasons. In this context, cyclooxygenase-2 inhibitors present interesting anti-tumor effects. However, inhibition of COX-2 by anti-COX-2 compound celecoxib was recently associated with detrimental cardiovascular side effects limiting its clinical use. As many anti-cancer effects of celecoxib are COX-2-independent, analogues such as 2,5-dimethyl-celecoxib represent a promising alternative. Indeed, this compound lacks COX-2-inhibitory activity with fewer side effects.

In this study, we investigated the effect of this molecule on growth of hematologic cancer cell lines (U937, Jurkat, Hel and Raji. and K562). We found that this molecule is able to reduce the growth of all the cell lines more efficiently than celecoxib and induces apoptosis. Cell death was associated with downregulation of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 protein expression. We also found that DMC induces ER stress and an alteration of cell cycle progression at the G1/S transition in U937 cells. Accordingly, typical downregulation of c-Myc, cyclin D1 and an upregulation of p27 were observed. Interestingly, for shorter time points, an alteration of mitotic progression, associated with the downregulation of survivin protein expression as observed. Finally, our data show that despite the ability of DMC to inhibit the growth of leukemic/lymphoblastic cell lines, no beneficial effects were observed when DMC was combined with cisplatin or TRAIL. Altogether, our data provide new evidences about the mode of action of this compound on hematologic malignancies.

Key words: DMC, leukemia, apoptosis, cell cycle

Introduction

Hematologic disorders are among the most frequent cancers and despite the existing therapies, mortality rate remains very high due to development of chemoresistance (Stankovic and Marston, 2008). For these reasons, there is a need to discover efficient drugs that can be used in cancer therapy. Cyclooxygenase-2 (COX-2), an important enzyme for inflammation, (Chandrasekharan and Simmons, 2004; Ristimaki, 2004; Howe, 2007; Sobolewski *et al.*) is overexpressed in many cancer types and contributes to tumor aggressiveness by favoring cancer cells proliferation and survival (Ristimaki, 2004; Wun *et al.*, 2004; Secchiero *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). In this context specific COX-2 inhibitors, such as the "coxib" family have been tested as good candidates for cancer therapy (Mutter *et al.*, 2009; Sobolewski *et al.*). Most of these molecules are strong inducers of apoptosis or slow down cell cycle in many cancer models, including hematologic malignancies (Park *et al.*; Jendrossek *et al.*, 2003; Arunasree *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2009; Mutter *et al.*, 2009). Moreover, COX-2 inhibitors are able to sensitize tumors to existing therapies, such as chemotherapy, radiotherapy or photodynamic therapy (Cao and Prescott, 2002; Sobolewski *et al.*). Despite these beneficial effects, chronic use of COX-2 specific inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) were recently associated with severe side effects, including gastric ulcers or increased risks of stroke or myocardial infarction (Hudson *et al.*, 2007). Due to these effects, some COX-2 inhibitors, such as rofecoxib (Ortiz, 2004), were removed from the market and the use of the other coxibs was limited to patients without cardiomyopathy history. Moreover, anti-tumor properties of these molecules are not necessarily depending on COX-2 inhibition (Schonthal, 2006; Ryan *et al.*, 2008). Altogether, these data suggest caution for the chronic use of COX-2 inhibitors in cancer therapy.

Non-Coxib celecoxib analogs such as OSU-03012 or 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC) (Johnson *et al.*, 2005; Kardosh *et al.*, 2005; McCubrey *et al.*, 2006; Schonthal, 2006) represent promising alternative strategies in cancer therapy without the typical side effects (Kardosh *et al.*, 2005; Schonthal, 2006). Many studies demonstrated ability of DMC to reduce growth of several cancer cells more efficiently than COX-2 inhibitors (Backhus *et al.*, 2005; Dent *et al.*, 2005; Virrey *et al.*, 2010). The anti-tumor properties of Non-Coxib celecoxib analogs are associated with induction of apoptosis (Pyrko *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013), cell cycle alterations (Zhang *et al.*, 2007) and inhibition of tumor invasion and angiogenesis (Backhus *et al.*, 2005).

The induction of apoptosis has been associated with an inhibition of PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinases) /Akt (Protein Kinase B) signaling and thus downstream

survival signaling pathways (*i.e.*, Nuclear Factor kappa B, NFκB) (Fresno Vara *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Some studies have shown also a downregulation of survivin protein expression in different cell models (Zhang *et al.*, 2007). Survivin is a member of IAP (Inhibitors of Apoptosis) family, which inhibits caspases activation (Kelly *et al.*, 2011). More recently, the induction of apoptosis has been associated with endoplasmic reticulum stress (ER stress) (Schonthal, 2006; Pyrko *et al.*, 2007), showing that these molecules induce apoptosis through different mechanisms. Apoptosis is an organized process, where Bcl-2 family members play an important role (Burlacu, 2003). Indeed, the mitochondrial events occurring during apoptosis (*i.e.*, loss of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c) depend on the activation of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak, which can be inhibited through heterodimerization with anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1 (Burlacu, 2003). OSU-03012 can decrease Bcl-2 expression (Liu *et al.*, 2013) but the effect of DMC on the expression of these proteins is unknown. However, the ability of this molecule to inhibit the survival pathway PI3K/Akt (Wang *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011) suggests possible alterations of the anti-apoptotic protein Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1.

Non-Coxib celecoxib analogs affect also tumor growth through alteration of cell cycle progression (Pyrko *et al.*, 2006). Very few studies have been performed to clearly understand this effect but it appeared that OSU-03012 and DMC lead to cyclin A and B downregulation (Kardosh *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007), which are important for G2/M transition.

All these findings suggest that DMC is a promising molecule for cancer therapy. Some studies highlighted also additive or synergistic effect with photodynamic therapy (Ferrario *et al.*, 2011), radiotherapy or with chemotherapeutic agents (Cho *et al.*, 2009). However, these data were essentially obtained with adherent cell models whereas effects of DMC on hematologic malignancies remain poorly elucidated.

Here we investigated the effect of DMC on growth of hematological cells in comparison to its mother compound, celecoxib. We observed that DMC reduces cancer cell growth more efficiently. Our findings reveal that the growth inhibitory properties of DMC are due to an induction of ER stress, apoptosis and cell cycle alterations.

Materials and Methods

Cell culture and reagents- U937 (human histiocytic lymphoma), Jurkat (acute lymphoid leukemic T cells), K562 (chronic myeloid leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma) and Hel (human megakaryocytic acute myeloid leukemia) cells came from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). The cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Bio-Whittaker) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS; Lonza, Verviers, Belgium), 1% (v/v) antibiotic–antimycotic solution (Lonza) and 2 mM L-glutamine (Lonza) in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2. Similarly, the 293T cell line (human embryonic kidney) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, Belgiun) supplemented with 10% (v/v) fœtal bovine serum (Brunschwig) and 1 % (v/v) of penicillin/ streptomycin (Lonza). Peripheral blood mononuclear cells from healthy adult human donors were isolated by standard density separation method using Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Rosendaal, The Netherlands) as previously described (Cerella *et al.*, 2009). Purified PBMCs were washed twice with PBS1X and re-suspended in RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS and 1% antibiotic–antimycotic solution at a cell density of $2.0x10^6$ cells/ml. PBMCs were kept in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2.
Celecoxib and 2,5 dimethyl celecoxib were purchased from Sigma (Belgium) and dissolved to 20 mM in 100% DMSO. Cycloheximide, MG132, Thapsigargin and ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl-ether (EGTA) were purchased from Sigma Aldrich. Cisplatin was provided by TEVA Pharma.

Cell proliferation assay- The amount of viable cells was assessed by counting trypan blue (Lonza, Verviers, Belgium)-excluded cells with a Cedex cell counter (Innovatis AG, Howald, Luxembourg). At time 0, cells were plated in 6 well plates (200000 cells/ml).

Cell cycle analysis- Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences) following DNA staining with propidium iodide (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) and RNAse A (100 µg/ml; Roche, Luxembourg, Luxembourg) in Phosphate Buffered Saline (PBS). Events were recorded (10,000 events/sample) using the CellQuest software (http://www.bdbiosciences.com/features/products/display_product.php?keyID=92); data were analyzed with the FlowJo 8.8.7 software (Tree Star, Inc.).

May-Grünwald Giemsa histochemical analysis- Cells ($2x10^5$) were washed twice with phosphate buffer solution (PBS) and then resuspended in PBS and fixed on a slide using the

cytocentrifuge system (StatSpin, Aartselaar, Belgium). The slides were sequentially incubated in a pure modified May-Grünwald eosin-methylene blue solution (Merck, Leuven, Belgium) for 5 min in May-Grünwald solution diluted in water (1:5, v/v) and, finally, in Giemsa solution (Merck) diluted in water (1:20, v/v) for 20 min. The slides were washed in water and observed with an optical microscope (Leica, DM 2000, Lecuit, Luxembourg).

Immunofluorescence analysis of phospho-Histone H3- U937 cells were fixed and permeabilized as previously described (Sobolewski *et al.*, 2011) and immunostained with an antibody against Histone H3 phosphorylated on serine 10 (BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgium) (1:50). After a one-hour incubation at room temperature, cells were washed twice in PBS and incubated with a fluorophore-conjugated anti-mouse secondary antibody (Alexa Fluor 568, Molecular Probes/Invitrogen, Merelbeke, Belgium) for 1 h at room temperature. After two washes with PBS, the cells were analyzed by flow cytometry as described above.

Analysis and quantification of calcium content and calcium release by the ER- After treatment with DMC for 8h, U937 cells were washed twice in Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with 10mg/ml glucose and 65mM Ca2+. Then, cells were stained with 1µM Fluo4-AM at room temperature in the dark for 40 min and after dye removal, cells were re-suspended in HBSS solution supplemented with 10mg/ml glucose and 65mM Ca2+ (2.10^6/ml). Cells were finally kept at room temperature for 20 min to allow de-esterification of the dye. The fluorescence intensity was monitored by flow cytometry at 488nm.
To observe the release of calcium by the ER, U937 cells were stained with Fluo4-AM as described above and then treated with EGTA (65mM) to chelate extracellular calcium and then treated with 300nM thapsigargin as previously described (Cerella *et al.*, 2011a). The fluorescence intensity was monitored by flow cytometry at 488nm during 250 seconds.

Analysis and quantification of apoptosis- The percentage of apoptotic cells was evaluated by counting the number of cells displaying apoptotic features, such as fragmented and condensed nuclei (Juncker *et al.*). At least 100 cells in three random fields were counted by fluorescence microscopy (Leica-DM IRB microscope) after staining the nuclei with Hoechst 33342 (1µg/ml Sigma). Apoptosis estimation was also confirmed by Annexin V/ Propidium Iodide staining and FACS analysis according to the manufacturer protocol (BD Biosciences). The loss of mitochondrial membrane potential was analyzed by MitoTracker® Red staining (MTR,

Molecular Probes/Invitrogen) as previously described (Cerella *et al.*, 2011b). Briefly, $1x10^6$ cells were incubated for 20 min at 37°C with 50 nM MitoTracker® Red. Fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Events were recorded (10,000 events/sample) using the CellQuest software. Data were further analyzed with the FlowJo 8.8.7 software.

Real Time PCR- Total RNA from U937 cells were extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer protocol. cDNA was synthesized from one µg of total RNA by using OligodT primers and the Superscript™ First strand Synthesis System (Invitrogen). The real time PCR reaction was performed with the Platinum® High Fidelity *Taq* DNA Polymerase and specific primers (Eurogentec) for c-Myc sense: 5'-TGC TCC ATG AGG AGA CAC C-3'; antisense: 5'-TCG ATT TCT TCC TCA TCT TCT TG-3'), cyclin D1 (sense: 5'-CGT GGC CTC TAA GAT GAA GG-3'; antisense: 5'-CCA CTT GAG CTT GTT CAC CA-3'), p27 (sense: 5'-AAT AAG GAA GCG ACC TGC AA-3'; antisense: 5'-GGG GAA CCG TCT GAA ACA TT-3'), cyclin B1 (sense : 5'-CACTTCCTTCGGAGAGCATC-3'; antisense : 5'-AGAAGGAGGAAAGTGCACCA-3') and β-actin (sense: 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' ; antisense : 5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3'), ATF4 (sense: 5'-ATGGGTTCTCCAGCGACAAG-3' ; antisense : GAAGGCATCCTCCTTGCTGT), CHOP (sense: 5'-CAGAACCAGCAGAGGTCACA-3' ; antisense : 5'-AGCTGTGCCACTTTCCTTTC-3'), GRP78 (sense: 5'-CGTGGAGATCATCGCCAAC-3'; antisense: 5'-ACATAGGACGGCGTGATGC-3'). The PCR amplification was performed for 40 cycles with the following settings: 94°C for 2 min, 60°C for 1 min, 68°C for 2 min. Results were expressed as a ratio between mRNA of target gene and β-actin.

Western Blot analysis- Total protein lysates were obtained by resuspending the cells in Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER®, Pierce) supplemented with protease inhibitors (Complete, Roche). For protein stability analysis, cells were treated with cycloheximide (10µg/ml) for 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min prior to cells lysis. Protein concentrations were calculated using Bradford method as previously described (Bradford, 1976). Cell lysates were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE; 10%) using 20-40 µg of total protein extract. Then, proteins were transferred to PVDF membranes and blocked for 1h with 5% non-fat milk in PBS-Tween. Membranes were incubated with 0.5–1 µg/ml of the following primary antibodies: overnight for anti-caspase-8, -9, Bcl-xL, Mcl-1, survivin (Cell Signaling, Leiden, The

Netherlands) or anti-caspase-3, anti-cyclin B1 (Santa Cruz Biotechnology), Bcl-2 (Calbiochem, Leuven, Belgium) and 1 h for anti-β-actin (Sigma). Membranes were washed three times with PBS-Tween, and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 1h at room temperature. The different antibodies were diluted in a PBS-1% Tween solution containing 5% of milk. The protein bands were revealed using the ECL Plus Western Blotting Detection System Kit (GE Healthcare). β-actin was used as a loading control. A densitometric analysis of the western blots was performed using ImageJ 1.43u software, with β-actin for normalization.

Statistical analysis- Statistical analyses were performed using Student's T-test for unpaired data. P-values ≤ 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (*) were considered significant.

Results

DMC reduces the growth of leukemic and lymphoblastic cell lines. The effect of celecoxib and 2,5 dimethyl celecoxib (0, 10, 20 and 40µM) on the growth of U937 and K562 cells was assessed by trypan blue exclusion assay for up to 48h of treatment (Fig. 1A and B). Our findings revealed that celecoxib and DMC were able to reduce the growth of both cell lines but DMC was more efficient than celecoxib (59.45 ± 12.38 % of growth inhibition after 48h for celecoxib vs 85.67 ± 2.49 % for DMC). In order to generalize our results, we demonstrated inhibition of cell proliferation by DMC in other leukemic cell models including Hel, Jurkat and Raji (Fig. 1C). U937 cells appeared to be the most sensitive cell line, with a cytostatic effect from 20µM.

DMC induces apoptosis in hematologic cell lines. Inhibition of cell growth by DMC can be due to an induction of apoptosis. We investigated this possibility, by analyzing alteration of nuclear morphology by Hoechst 33342 staining and fluorescence microscopy (Fig. 2A and B). A significant accumulation of apoptotic cells was observed in Hel, Jurkat, K562, Raji and U937 cell lines with 40µM after 24h. No significant apoptosis induction was observed with celecoxib at the same concentration (40µM) in Jurkat, K562 and U937 cells. In Hel cells, celecoxib induced apoptosis but to a lesser compared to DMC. As observed in U937 cells, nuclei of DMC treated cells display characteristic apoptotic morphologies, with nuclei shrinkage and cleavage (Fig. 2B). We confirmed this apoptotic effect by Annexin V / Propidium Iodide staining and FACS analysis. Our data show 7.24 ± 0.38% of apoptosis in untreated cells vs 27.54 ± 1.56% in DMC-treated cells (40µM) (Fig.2C). Apoptosis is even stronger after 48h of treatment and becomes significant from 20µM in U937 cell lines, while celecoxib induces apoptosis only from 60µM after 48h in U937 cells (Fig. 3A and B). Our data explain why DMC displays stronger anti-proliferative properties (Fig. 1). Apoptosis is a complex process, which can lead to the activation of caspases. We were able to see the cleavage of caspase-9, -8 and -3 upon DMC treatment (from 20µM) after 24h, suggesting a caspase-dependent apoptosis (Fig. 3C). Cleavage of these caspases was also observed with celecoxib but only for much higher, clinically irrelevant, concentrations (from 60µM), thus confirming the nuclear morphology analysis (Fig. 3C).

DMC reduces expression of anti-apoptotic proteins. Induction of apoptosis can be the consequence of mitochondrial events, such as the loss of mitochondrial membrane potential (Burlacu, 2003). We compared the abilities of the two drugs to induce the loss of

mitochondrial membrane potential by using Mitotracker® staining (Fig. 4A). We found that DMC increases by 87.6 ± 14.44% the amount of cells with a low mitochondrial membrane potential, while no significant effect was observed with celecoxib at the same concentration. The down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family members (Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1) plays an important role in the regulation of mitochondrial events occurring during apoptosis (Burlacu, 2003). Following this hypothesis, we first performed a kinetic analysis with U937 cells in order to determine the minimum time required for DMC to induce apoptosis. A significant induction of apoptosis was already observed after 4h of treatment with 40µM (Fig. 4B). Next, we investigated the effect of DMC on Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 protein expression in U937 cells (Fig. 4C). Our data revealed a down-regulation of the three Bcl-2 anti-apoptotic proteins with 40µM of DMC after 8h. Interestingly, a down-regulation of Mcl-1 was observed with 20µM of DMC, before apoptosis induction thus suggesting a causative link between these events. A downregulation of Mcl-1 was also observed with celecoxib, after 48h with 40µM but the effect is lower than DMC (Fig.4D). In addition, a kinetic analysis of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 protein expression revealed that Mcl-1 down-regulation is an early event after DMC treatment, occurring already after 15 min of treatment, before apoptosis induction (Fig. 4E). Interestingly, this downregulation is not a consequence of a modulation of protein stability (Fig.5A). Indeed, by using cycloheximide as a translation inhibitor, we found that the half-life of Mcl-1 protein is not significantly affected by DMC treatment (74.7 ± 12.5 min for untreated cells vs 75.3 ± 9.5 min for DMC-treated cells). Moreover, the proteasome inhibitor MG132 was unable to revert DMC-induced Mcl-1 downregulation as well as DMC-induced apoptosis, thus suggesting a proteasome-independent effect (Fig.5B). In addition, no alterations of Mcl-1 mRNA expression was observed (Fig.5C). Our results show that DMC-induced apoptosis is associated with the downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 family members and suggest that DMC downregulates Mcl-1 expression through a translation inhibition.

DMC induces endoplasmic reticulum (ER) stress in U937 cells

The anti-tumor properties of DMC or OSU-03012 have been associated with their abilities to induce ER stress (Pyrko *et al.*, 2007), which in turn inhibit protein translation (Teske *et al.*, 2011). Such effect could explain the downregulation of Mcl-1. We found that DMC was able to increase the expression of several well-known ER stress markers, including ATF4 (activating transcription factor 4), CHOP (C/EBP homologous protein) and GRP78 (78kDa glucose-regulated protein) (Lee and Ozcan, 2014), after 8h of treatment, prior to apoptosis

induction (Fig. 6A) As a positive control, we used 293T cells treated for 12h with thapsigargin and similar modulations were observed. ER-stress is associated with the release of calcium from the ER (Deniaud *et al.*, 2008). Accordingly, we observed an increase of 120.75 ± 48.85 % the calcium amount in U937 cells treated for 8h with DMC (Fig. 6B). Then, by using thapsigargin to elicit calcium release by the ER, we found that DMC-treated cells did not respond and no calcium release was observed (Fig. 6C). This data is a further indication that DMC induce ER stress in U937 cells.

DMC induces cell cycle alterations at the G1/S transition and in mitosis in U937 cells. ER stress induction is frequently associated with cell cycle alteration, especially at the G1/S phase (Han *et al.*, 2013). Moreover, our previous results (Sobolewski *et al.*, 2011) already demonstrated that celecoxib affects G1/S transition in U937 cells. The structural similarities between celecoxib and DMC might be associated with common biological effects. We analyzed the effect of non-toxic doses of DMC on cell cycle distribution after 24h of treatment (Fig.7A). Our data show that DMC induces an accumulation of U937 cells in G0/G1 phase of cell cycle (45.3 ± 3.76% in DMC-treated cells vs 37.7 ± 2.33% for untreated cells), thus showing that DMC shares some common characteristics with celecoxib (Sobolewski *et al.*, 2011). Next, we analyzed the expression of factors playing an important role in the G1/S transition, especially proteins involved in the early steps of this transition such as c-Myc. In U937-treated cells, a downregulation of c-Myc protein could be observed with 20µM (Fig.7B). This effect is associated with the modulation of different c-Myc target genes, especially the downregulation of cyclin D1 and an upregulation of p27 (Fig.7B). Cyclin B1 is also downregulated, thus providing a correlation with the decrease in the number of cells in G2/M phase of cell cycle (Fig.7A). Interestingly, we found that DMC does not affect c-Myc mRNA level and that at a higher concentration (40µM) DMC downregulates c-Myc expression at the protein level already within 1h of treatment (Fig.7C). A similar but less important accumulation in G0/G1 phase of cell cycle was also observed in K562 cells treated with 40µM of DMC after 48h (Fig.7D). We also found that c-Myc is downregulated in this cell line (Fig.7D), thus showing that this effect is not restricted to U937 cells. In the other cell lines, Hel, Jurkat and Raji cells, only an increase of the sub-G1 population could be observed (Fig.7E), thus confirming the induction of apoptosis observed in Fig.2 but no specific alteration of cell cycle was found. Our data show for the first time the ability of DMC to inhibit the expression of c-Myc oncogene in leukemic cell models.

Recently, it has been suggested that DMC could induce an alteration of mitosis in a ER-stress-dependent manner (Stankovic and Marston, 2008). These pieces of evidence prompted us to clarify this point. To this purpose, a detailed cell analysis with May-Grünwald Giemsa (MGG) staining has been performed after 12h of treatment (Fig. 8A). We used concentrations of DMC below 40µM in order to stay in a range of concentration unable to affect cell viability. The analysis demonstrated an increase in the percentage of mitotic cells (+18.67 ± 3.06%) with mainly prophase-like features. This effect has also been observed earlier (4h) before induction of apoptosis, thus suggesting a link between the two events (Fig. 8B). In contrary, a decrease of the mitotic index was observed with celecoxib, thus showing another difference between the compound despite their structural similarities. In K562 cells, no accumulation of mitotic cells has been observed, even after 48h of treatment, thus suggesting a correlation between apoptosis and mitotic alteration (Fig. 8C). In U937 cells, we confirmed this accumulation in early mitosis by the analysis of histone H3 phosphorylation (on serine 10) by FACS and fluorescence microscopy after 12h (Fig. 8D). This effect was accompanied by a modest accumulation of the cells in G2/M (Fig. 8E).

The accumulation of mitotic cells can be the consequence of a spindle defect. We verified this aspect with alpha-tubulin immunostaining (Fig. 8F). The analysis revealed an accumulation of cells with bipolar spindles, characteristic of cells in prophase (Nigg and Stearns, 2011). Thus, data suggest a possible effect on chromosome segregation. Analysis of the expression of different cell cycle regulators of mitosis entry and spindle formation (cyclin B1, survivin) revealed a modest accumulation of cyclin B1, in line with the accumulation of phospho-histone H3 observed previously. Interestingly, a down-regulation of survivin has been observed with DMC (Fig. 8G). As survivin is a key component for chromosome segregation during mitosis (Mita *et al.*, 2008), its down-regulation may explain the accumulation of mitotic cells in prophase upon DMC treatment. Moreover, survivin is also an inhibitor of caspase cleavage and its downregulation probably favors the induction of apoptosis. Altogether, our data demonstrate also that DMC reduces the growth of U937 cells also by affecting mitotic progression.

Effect of DMC on healthy cells (PBMC) and on cisplatin/TRAIL-induced apoptosis in U937 cells. The growth inhibitory properties of DMC suggest possible beneficial effects for the treatment of hematologic malignancies. However, in order to assess the toxicity of DMC on healthy analogs of our cancer models, we treated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with celecoxib or DMC (0-40µM) for up to 48h. Our nuclear morphology analysis

shows that celecoxib and DMC induce significantly apoptosis of PBMCs from 40µM (Fig. 9A). This result was confirmed by caspase-3 cleavage analysis (Fig. 9B). For concentrations below 40µM, which inhibit cell proliferation or induce cell death in our cancer models (Fig. 1 and 3), no significant induction of apoptosis was observed.

Next, we tested the effect of sub-apoptogenic doses of DMC (0-20µM) on cisplatin-induced apoptosis in U937. Cisplatin was chosen due to its ability to efficiently induce cell death in our cell lines (Cerella *et al.*, 2011b). As evidenced in Fig.10A, cisplatin induces efficiently apoptosis in U937 (71.7 ± 3.51% after 8h of treatment). However, U937 pre-treated with DMC (24h with concentrations from 1 to 20µM) appeared to be more resistant to cisplatin-induced apoptosis (40.0 ± 10% of apoptosis). Our data suggest that despite the different anti-tumor properties of this molecule, DMC counteracts cisplatin-induced apoptosis. We repeated the same kind of analysis with the physiological apoptosis inducer TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) (Fig.10B). This experiment revealed that the pre-treatment with DMC did not potentiate the effect of TRAIL. Only, with 20µM of DMC an additive effect was observed.

Discussion

In our study, we demonstrated that DMC induces apoptosis in different hematologic cancer cells. Comparing DMC and celecoxib, we found that DMC induces apoptosis in a range of concentrations where celecoxib is not yet toxic for the cells. These data show that DMC is more efficient than its mother compound to induce apoptosis. In U937 cells, we demonstrated that DMC was able to induce caspases cleavage, which was preceded by an early down-regulation of anti-apoptotic proteins, Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1. The fact that all cell lines are affected by the treatment independently of their level of expression of COX-2 (Sobolewski *et al.*, 2011), suggest a COX-2 independent effect. Moreover, this effect is p53 independent, since U937 cells do not express this protein (Sobolewski *et al.*, 2011). Anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family mediate their effects by inhibiting pro-apoptotic proteins such as Bax and Bak, which activate the loss of mitochondrial potential and the release of cytochrome c (Burlacu, 2003). Our findings revealed for the first time the ability of DMC to down-regulate Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 protein expression with an early decrease in the case of Mcl-1. Mcl-1 represents an important therapeutic target in solid and hematologic malignancies (Akgul, 2009). Thus, the ability of DMC to downregulate its expression efficiently suggests an interesting therapeutic property. DMC-induced apoptosis has been associated with an induction of endoplasmic reticulum stress usually associated with an arrest of protein translation, which can lead to the rapid downregulation of short-lived proteins, such as Mcl-1 or c-Myc (Pyrko *et al.*, 2007; Trivigno *et al.*, 2013). We also found that DMC induces ER-stress in U937 cells and our data suggest an inhibition of Mcl-1 translation following DMC exposure. These data are in agreement with previous published studies and suggest that Mcl-1 down-regulation is an important intermediate in the cytostatic and/or apoptotic effect of DMC. Moreover, Mcl-1 down-regulation may represent the link between DMC-induced ER stress and DMC-induced mitochondrial alteration(s). Also, the exact mechanisms by which these molecules induce ER stress are not really clear. The ability of DMC and OSU-03012 to inhibit Akt activity (Wang *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011) may give part of the answer. Indeed, PI3K/Akt pathway can prevent ER stress through an accumulation of GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78 kDa), a molecular chaperone able to bind misfolded proteins (Dai *et al.*, 2010). DMC and OSU-03012 inhibit Akt and this effect may account in the induction of ER stress in cancer cells but this link remains to be demonstrated. In preliminary data, we found that DMC depletes calcium in the ER (data not shown).

In addition, our study has revealed an ability of DMC to reduce the expression of survivin. Our data are in agreement with published studies in other cell models, showing

survivin down-regulation in the same range of concentrations. This protein belongs to the IAP family, which inhibit the activation of caspases (Kelly *et al.*, 2011). Thus its down-regulation may contribute to DMC-induced apoptosis.

The ability of DMC to inhibit the growth of our cell lines is also associated with cell cycle disturbances. We previously published that celecoxib could affect cell cycle progression at the G1/S transition (Sobolewski *et al.*, 2011). We found that DMC displays also this property, which was associated in this study with a dowregulation of c-Myc protein expression. As a consequence, c-Myc target genes were also modulated and we observed the downregulation of cyclin D1 mRNA and an induction of p27 mRNA. Some studies have documented an effect of celecoxib analog OSU-03012 at G2/M transition, through a downregulation of cyclin A and B (Zhang *et al.*, 2007). Similar results have been observed with DMC together with an up-regulation of p27 in a Burkitt's lymphoma model *in vitro* and *in vivo* (Kardosh *et al.*, 2005). Moreover, inhibition of CDK1 and CDK2 was observed. These pieces of data prompted us to investigate also mitosis for shorter times of treatment. Our findings revealed that DMC induces an early accumulation of U937 cells in mitosis, particularly in prophase/metaphase phases, thus showing different cell cycle alterations occurring in a chronological manner. Interestingly, an accumulation of multiple myeloma cells in G2/M has been observed upon OSU-03012 treatment (Zhang *et al.*, 2007), suggesting common mechanism between the two analogs. However this effect was never described with DMC. Moreover, mitotic arrest is frequently associated with an induction of p53 family members, which affect mitosis through different mechanisms, like the activation of checkpoint kinases or the induction of p21 expression, a well-know inhibitor of CDK1-cyclin B complex (Cobrinik, 2005). However, U937 cells do not express p53 or p73 (Sobolewski *et al.*, 2011). This effect on mitosis was not observed with celecoxib, thus showing major differences in their mechanisms despite their similar molecular structure. This difference might explain why DMC is a stronger anti-proliferative agent. In parallel, the fact that there is no significant increase of mitotic index in K562 cell line, suggest a good correlation between apoptosis and the mitotic alteration. An accumulation of cells in prophase may be the consequence of an alteration in prophase/metaphase transition. One mechanism implicated in this transition, is the alignment and the correct attachment of microtubules to chromosomes, for cytokinesis. This mechanism is driven by the chromosomal passenger complex (CPC), a complex of proteins containing Aurora kinase A, Borealin, INcenp and survivin (Carmena *et al.*, 2012). Many studies have discovered that any alterations of chromosomal passenger complex components, lead to mitosis defects including perturbations of chromosome

alignment, multipolar spindles, abnormal cytokinesis (Lamers *et al.*, 2011). In our study, we have observed a down-regulation of survivin. Thus it is conceivable that this effect might contribute to the alteration of mitotic progression. Downregulation of survivin has been already observed with DMC in other cancer cells models (Pyrko *et al.*, 2006) in a p53 independent manner. In these studies the consequence on mitosis was suggested but not demonstrated. Our study provides this first observation, which is consistent with this previous study, because U937 cells do no express p53 (Sobolewski *et al.*, 2011). Moreover, it is also known that Bcl-2 family members are downregulated during mitotic alterations. This effect is particularly observed for Mcl-1 protein, probably due to its short half-life compared to Bcl-2 or Bcl-xL (Huber *et al.*, 2011). This effect is due to the degradation by the 26S proteasome after phosphorylation by CDK1/Cyclin B or JNK (Sakurikar *et al.*, 2012). Our study revealed a downregulation of Mcl-1 prior to mitosis alteration, thus suggesting that Mcl-1 might be associated with mitotic progression.

COX-2 inhibitors have demonstrated an ability to induce apoptosis or to reduce cell cycle progression in many different cancer cell types (Sobolewski *et al.*, 2010). These effects involve various mechanisms, which are associated with the specific inhibition of COX-2 enzyme. However, for some inhibitors, like celecoxib, several off-target mechanisms have been discovered (Ryan *et al.*, 2008). This is the case in U937 cells, as we demonstrated in a previous study, showing a downregulation of cyclin D1, c-Myc and an up-regulation of p27 (Sobolewski *et al.*, 2011). Moreover, the chronic and specific inhibition of COX-2 can be associated with severe side effects (Antman *et al.*, 2005), thus limiting their use for therapeutic purposes. Non-active COX-2 inhibitors analogs such as DMC seem to be good candidates to separate the anti-tumor properties of celecoxib and their detrimental effects. In this paper, we have demonstrated that DMC possess stronger anti-tumor properties than celecoxib.

Furthermore, some studies demonstrated synergistic or additive effect between DMC and chemotherapy (Kardosh *et al.*, 2008) or photodynamic therapy (Ferrario *et al.*, 2011). In U937 cells, we already published that a combination of celecoxib or DMC with etoposide does not generate any beneficial effects (Cerella *et al.*, 2011b). Similarly in this study, DMC prevented cisplatin-induced apoptosis, thus suggesting the development of chemoresistance mechanisms with DMC treatment. However, we did not try yet other agents, especially those acting on mitosis progression (e.g., taxol) or inducing ER-stress (e.g., bortezomib). The combination of DMC and bortezomib seems to be beneficial, as evidenced by a study on glioblastoma cells (Kardosh *et al.*, 2008). Moreover, some studies have reported that the

downregulation of Mcl-1 can sensitize different kinds of tumor cells to extrinsic apoptosis, induced by TRAIL (Kim *et al.*, 2008; Jacquemin *et al.*, 2012). DMC may sensitize cancer cells to these apoptotic stimuli more efficiently than COX-2 inhibitors. Such effect might be useful to improve the prognosis of many cancers (Kuijlen *et al.*, 2010).

In summary (Fig. 11), our study provides new insights about the effect of DMC on tumor growth. Our data show that DMC is a more potent growth inhibitor compared to celecoxib. DMC also modulates the expression of proteins of major concern in oncology, such as Mcl-1, c-Myc, p27, survivin thus suggesting that DMC may represent a promising agent for the treatment of hematologic malignancies. However, our study suggests also some cautions regarding the combination of this molecule with chemotherapy.

Acknowledgements

C.S. and C.C. were recipients of doctoral and postdoctoral Télévie grants, respectively. CC is supported by a "Waxweiler grant for cancer prevention research" from the Action Lions "Vaincre le Cancer".Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by ''Recherche Cancer et Sang'' Foundation, by the ''Recherches Scientifiques Luxembourg'' association, by ''Een Haerz fir kriibskrank Kanner'' association, by the Action Lions ''Vaincre le Cancer''association and by Télévie Luxembourg. MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [grant number 2012-0001184]; MD is supported by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

Conflicts of interest

We have no actual or potential conflict of interest.

Figures legends

Figure 1. DMC decreases the growth of different hematologic cancer cell models more efficiently than celecoxib. U937 and K562 cells were seeded at $2x10^5$ cells/ml and then treated with 0, 10, 20 and 40 µM of celecoxib or DMC for 48 h (**A**). The cell concentration was estimated by trypan blue exclusion assay. The percentage of growth inhibition for U937 cells with celecoxib or DMC (40µM) after 48h of treatment are represented in the table below the graphs. The pictures corresponding to U937 cells treated with DMC (40µM) for 24h are represented in **B**. A similar experiment was performed on the other hematologic cell models with DMC (Hel, Jurkat and Raji cells) (**C**). The experiments are representative of three independent experiments (± SD). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 2. DMC induces apoptosis in the different hematologic cell lines. Hel, Jurkat, K562, Raji and U937 cells were treated with 40µM of celecoxib or DMC. The apoptosis rate was analyzed by counting apoptotic nuclei after 24h (**A**). Pictures of U937 cells showing the nuclei morphologies are represented in **B**. The estimation of apoptosis was further confirmed by Annexin V /Propidium Iodide staining in U937 cells treated with 40µM of DMC for 24h (**C**). The data represent the mean of three independent experiments (± SD). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 3. DMC induces apoptosis in U937 cells at lesser concentrations than celecoxib. U937 cells were treated with different concentrations of celecoxib (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100µM) or DMC (0, 10, 20, 40µM) for 48h. The percentage of apoptotic cells was calculated by counting apoptotic nuclei (**A**). An analysis of caspase-8, -9 and -3 cleavage was performed by western blot analysis on U937 cells treated with 40, 60, 80 or 100µM of celecoxib or 10, 20, 40µM of DMC for 48h (**B)**. The data represent the mean of three independent experiments (± SD). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 4. DMC induces the loss of mitochondrial membrane potential and reduces the expression of anti-apoptotic proteins prior to apoptosis induction. The impact of celecoxib (40µM), DMC (40µM) or etoposide (100µM: positive control) on the mitochondrial membrane potential was analyzed by Mitotracker® Red staining and FACS analysis in U937 after 24h of treatment (**A**). A kinetic analysis (0, 2, 4, 8 and 24h) of apoptosis was performed

on U937 cells treated with DMC (0, 10, 20 and 40µM) (**B**). The apoptosis rate was analyzed by counting apoptotic nuclei. Then, the protein expression of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 was appreciated by western blot analysis after 8h of treatment with 0, 10, 20 and 40µM of DMC (**C**). Similarly, U937 cells were treated for 48h with celecoxib (0, 10, 20 and 40µM) and Mcl-1 expression was evaluated by western blot analysis (**D**). **E**. U937 cells were treated with 40µM of DMC for 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Then, the protein expression of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 was appreciated by western blot analysis. The results are representative of three independent experiments (± SD). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 5. DMC-induced Mcl-1 downregulation does not occur through protein degradation or mRNA modulation. The half-life of Mcl-1 protein in untreated or DMC-treated U937 cells (20µM, 24h) was determined by blocking translation with cycloheximide treatment (10µg/ml) for 0, 15, 30, 60 and 120 min (**A**). As another approach to evaluate possible degradation of Mcl-1, U937 cells were treated for 1h with the proteasome inhibitor MG132 (5µM) and then with DMC (40µM, for 4h). Then the expression of Mcl-1 was evaluated by western blot analysis (**B**). The level of Mcl-1 mRNA was also analyzed by real time PCR in U937 cells treated with 40µM of DMC for 2h (**C**). The experiments are representative of three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 6. DMC induces ER-stress in U937 cells. U937 cells were treated for 8h with DMC (0, 20 and 40µM) and the expression of ER-stress markers (ATF4, CHOP and GRP78) was investigated by real-time PCR (**A**). As a positive control, 293T cells were treated for 12h with 300nM of thapsigargin. **B.** The effect of DMC on calcium content was evaluated by Fluo4-AM staining and FACS analysis. **C.** The release of calcium by the ER was studied in U937 cells treated 8h with 20µM of DMC, by eliciting reticular flux with thapsigargin (300nM). The release of calcium was monitored by Fluo4-AM staining and FACS analysis. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 7. DMC induces cell cycle disturbance at the G1/S transition. U937 cells were treated with DMC (0, 10 and 20µM) for 24h. Then a cell cycle analysis by propidium iodide staining and FACS was performed (**A**). Then, the expression of G1/S regulators was investigated by western blot analysis (for c-Myc) and by Real-time PCR (for c-Myc, cyclin D1, p27 and cyclin B1) in U937 cells treated 24h with DMC (**B**). A kinetic analysis of c-Myc protein expression was performed on U937 cells treated with 40µM of DMC for 0, 15, 30, 60, 90 and

120 min (**C**). Then Mcl-1's expression was evaluated by western blot. A similar cell cycle analysis as well as c-Myc western blot was performed on K562 cells treated 48h with 0, 10, 20 or 40µM of DMC (**D**). Cell cycle was also analyzed on Hel, Jurkat and Raji cells (**E**). The data represent the mean ± SD of three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 8. DMC induces mitotic alterations in U937 cells prior to apoptosis induction. U937 cells were treated with celecoxib (40µM) or DMC (20µM) for 12h. Then, the percentage of mitotic cells was estimated by MGG staining (**A**). Pictures corresponding to the experiment are represented above the histogram. A similar experiment was performed after 4h of treatment. The percentage of mitotic cells was calculated by counting mitotic cells with an MGG staining (**B**). The percentage of mitotic cells in K562 after 48h of treatment with 20µM of DMC was also estimated with an MGG staining (**C**). To confirm the effect of DMC on mitosis, an immunostaining for phospho-histone H3 (ser10) was performed in U937 cells after 12h of treatment (**D**). The fluorescence intensity was assessed by FACS and fluorescence microscopy. In addition, a cell cycle analysis by FACS was performed on U937 cells treated with DMC (0, 10 and 20µM) for 12h (**E**). An immunostaining for tubulin-α was also performed on U937 cells treated 12h with 20µM of DMC. Corresponding pictures are represented in **F**. The expression of the mitotic regulators, cyclin B1 and survivin, was analyzed on U937 cells treated 12h with 0, 10 or 20µM of DMC (**G**). The data represent the mean of three independent experiments (± SD). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 9. Effect of celecoxib and DMC on PBMCs. PBMCs were treated for 24 and 48h with celecoxib or DMC (10-40µM). Apoptosis was estimated by nuclear morphology (**A**) and by western blot analysis of caspase-3 cleavage (**B**) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 10. Effect of DMC on cisplatin/TRAIL-induced apoptosis in U937. U937 cells were treated with different concentrations of DMC for 24h (from 1 to 20 µM) and then treated with cisplatin (100µM) for 8h (**A**) or TRAIL (5ng/ml) for 8h (**B**). Apoptosis was evaluated by nuclear morphology. The data represent the mean of three independent experiments (± SD). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with controls.

Figure 11. Differential effects between celecoxib and DMC in U937 cells. **A**. The differences between celecoxib and DMC in term of molecular structure, growth inhibitory properties (IC50 24h) and abilities to affect cell cycle and apoptosis are represented in this table. **B.** Summary of the action of DMC on cell proliferation and apoptosis on our hematopoietic cancer cell models.

References

Akgul, C., 2009. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. Cell Mol Life Sci 66, 1326-1336.

Antman, E.M., DeMets, D., Loscalzo, J., 2005. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. Circulation 112, 759-770.

Arunasree, K.M., Roy, K.R., Anilkumar, K., Aparna, A., Reddy, G.V., Reddanna, P., 2008. Imatinib-resistant K562 cells are more sensitive to celecoxib, a selective COX-2 inhibitor: role of COX-2 and MDR-1. Leuk Res 32, 855-864.

Backhus, L.M., Petasis, N.A., Uddin, J., Schonthal, A.H., Bart, R.D., Lin, Y., Starnes, V.A., Bremner, R.M., 2005. Dimethyl celecoxib as a novel non-cyclooxygenase 2 therapy in the treatment of non-small cell lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 130, 1406-1412.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.

Burlacu, A., 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. J Cell Mol Med 7, 249-257.

Cao, Y., Prescott, S.M., 2002. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. J Cell Physiol 190, 279-286.

Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., Earnshaw, W.C., 2012. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. Nat Rev Mol Cell Biol 13, 789-803.

Cerella, C., Cordisco, S., Albertini, M.C., Accorsi, A., Diederich, M., Ghibelli, L., 2011a. Magnetic fields promote a pro-survival non-capacitative Ca2+ entry via phospholipase C signaling. The international journal of biochemistry & cell biology 43, 393-400.

Cerella, C., Scherer, C., Cristofanon, S., Henry, E., Anwar, A., Busch, C., Montenarh, M., Dicato, M., Jacob, C., Diederich, M., 2009. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al2S4). Apoptosis : an international journal on programmed cell death 14, 641-654.

Cerella, C., Sobolewski, C., Chateauvieux, S., Henry, E., Schnekenburger, M., Ghelfi, J., Dicato, M., Diederich, M., 2011b. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. Biochem Pharmacol.

Chandrasekharan, N.V., Simmons, D.L., 2004. The cyclooxygenases. Genome Biol 5, 241.

Cho, H.Y., Thomas, S., Golden, E.B., Gaffney, K.J., Hofman, F.M., Chen, T.C., Louie, S.G., Petasis, N.A., Schonthal, A.H., 2009. Enhanced killing of chemo-resistant breast cancer cells via controlled aggravation of ER stress. Cancer Lett 282, 87-97.

Cobrinik, D., 2005. Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene 24, 2796-2809.

Dai, R.Y., Chen, S.K., Yan, D.M., Chen, R., Lui, Y.P., Duan, C.Y., Li, J., He, T., Li, H., 2010. PI3K/Akt promotes GRP78 accumulation and inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in HEK293 cells. Folia biologica 56, 37-46.

Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., Brenner, C., 2008. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. Oncogene 27, 285-299.

Dent, P., Yacoub, A., Grant, S., 2005. DMC: novel celecoxib derivatives to rap cancer. Cancer Biol Ther 4, 583-584.

Fan, X., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Zhan, D.Y., Igawa, K., Tomooka, K., Sasaguri, T., 2011. Celecoxib and 2,5-dimethyl-celecoxib prevent cardiac remodeling inhibiting Akt-mediated signal transduction in an inherited dilated cardiomyopathy mouse model. J Pharmacol Exp Ther 338, 2-11.

Ferrario, A., Lim, S., Xu, F., Luna, M., Gaffney, K.J., Petasis, N.A., Schonthal, A.H., Gomer, C.J., 2011. Enhancement of photodynamic therapy by 2,5-dimethyl celecoxib, a non-cyclooxygenase-2 inhibitor analog of celecoxib. Cancer Lett 304, 33-40.

Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treat Rev 30, 193-204.

Han, C., Jin, L., Mei, Y., Wu, M., 2013. Endoplasmic reticulum stress inhibits cell cycle progression via induction of p27 in melanoma cells. Cell Signal 25, 144-149.

Howe, L.R., 2007. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. Breast Cancer Res 9, 210.

Huber, S., Oelsner, M., Decker, T., zum Buschenfelde, C.M., Wagner, M., Lutzny, G., Kuhnt, T., Schmidt, B., Oostendorp, R.A., Peschel, C., Ringshausen, I., 2011. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. Leukemia 25, 838-847.

Hudson, M., Rahme, E., Richard, H., Pilote, L., 2007. Risk of congestive heart failure with nonsteroidal antiinflammatory drugs and selective Cyclooxygenase 2 inhibitors: a class effect? Arthritis Rheum 57, 516-523.

Jacquemin, G., Granci, V., Gallouet, A.S., Lalaoui, N., Morle, A., Iessi, E., Morizot, A., Garrido, C., Guillaudeux, T., Micheau, O., 2012. Quercetin-mediated Mcl-1 and survivin downregulation restores TRAIL-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma B cells. Haematologica 97, 38-46.

Jendrossek, V., Handrick, R., Belka, C., 2003. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. Faseb J 17, 1547-1549.

Johnson, A.J., Smith, L.L., Zhu, J., Heerema, N.A., Jefferson, S., Mone, A., Grever, M., Chen, C.S., Byrd, J.C., 2005. A novel celecoxib derivative, OSU03012, induces cytotoxicity in primary CLL cells and transformed B-cell lymphoma cell line via a caspase- and Bcl-2-independent mechanism. Blood 105, 2504-2509.

Juncker, T., Cerella, C., Teiten, M.H., Morceau, F., Schumacher, M., Ghelfi, J., Gaascht, F., Schnekenburger, M., Henry, E., Dicato, M., Diederich, M., UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. Biochem Pharmacol 81, 13-23.

Kardosh, A., Golden, E.B., Pyrko, P., Uddin, J., Hofman, F.M., Chen, T.C., Louie, S.G., Petasis, N.A., Schonthal, A.H., 2008. Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib. Cancer Res 68, 843-851.

Kardosh, A., Wang, W., Uddin, J., Petasis, N.A., Hofman, F.M., Chen, T.C., Schonthal, A.H., 2005. Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. Cancer Biol Ther 4, 571-582.

Kelly, R.J., Lopez-Chavez, A., Citrin, D., Janik, J.E., Morris, J.C., 2011. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. Mol Cancer 10, 35.

Kim, S.H., Ricci, M.S., El-Deiry, W.S., 2008. Mcl-1: a gateway to TRAIL sensitization. Cancer Res 68, 2062-2064.

Kuijlen, J.M., Bremer, E., Mooij, J.J., den Dunnen, W.F., Helfrich, W., 2010. Review: on TRAIL for malignant glioma therapy? Neuropathol Appl Neurobiol 36, 168-182.

Lamers, F., van der Ploeg, I., Schild, L., Ebus, M.E., Koster, J., Hansen, B.R., Koch, T., Versteeg, R., Caron, H.N., Molenaar, J.J., 2011. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. Endocr Relat Cancer 18, 657-668.

Lau, L.M., Wolter, J.K., Lau, J.T., Cheng, L.S., Smith, K.M., Hansford, L.M., Zhang, L., Baruchel, S., Robinson, F., Irwin, M.S., 2009. Cyclooxygenase inhibitors differentially modulate p73 isoforms in neuroblastoma. Oncogene 28, 2024-2033.

Lee, J., Ozcan, U., 2014. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. J Biol Chem 289, 1203-1211.

Lee, T.X., Packer, M.D., Huang, J., Akhmametyeva, E.M., Kulp, S.K., Chen, C.S., Giovannini, M., Jacob, A., Welling, D.B., Chang, L.S., 2009. Growth inhibitory and anti-tumour activities of OSU-03012, a novel PDK-1 inhibitor, on vestibular schwannoma and malignant schwannoma cells. European journal of cancer 45, 1709-1720.

Liu, B., Shi, Z.L., Feng, J., Tao, H.M., 2008. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt. Cell Biol Int 32, 494-501.

Liu, J., Qin, C.K., Lv, W., Zhao, Q., Qin, C.Y., 2013. OSU-03012, a non-cox inhibiting celecoxib derivative, induces apoptosis of human esophageal carcinoma cells through a p53/Bax/cytochrome c/caspase-9-dependent pathway. Anticancer Drugs 24, 690-698.

McCubrey, J.A., Lahair, M.M., Franklin, R.A., 2006. OSU-03012 in the treatment of glioblastoma. Mol Pharmacol 70, 437-439.

Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., Giles, F.J., 2008. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. Clin Cancer Res 14, 5000-5005.

Mutter, R., Lu, B., Carbone, D.P., Csiki, I., Moretti, L., Johnson, D.H., Morrow, J.D., Sandler, A.B., Shyr, Y., Ye, F., Choy, H., 2009. A phase II study of celecoxib in combination with paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 15, 2158-2165.

Nigg, E.A., Stearns, T., 2011. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. Nat Cell Biol 13, 1154-1160.

Ortiz, E., 2004. Market withdrawal of Vioxx: is it time to rethink the use of COX-2 inhibitors? J Manag Care Pharm 10, 551-554.

Park, S.W., Kim, H.S., Hah, J.W., Jeong, W.J., Kim, K.H., Sung, M.W., Celecoxib inhibits cell proliferation through the activation of ERK and p38 MAPK in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Anticancer Drugs 21, 823-830.

Pyrko, P., Kardosh, A., Liu, Y.T., Soriano, N., Xiong, W., Chow, R.H., Uddin, J., Petasis, N.A., Mircheff, A.K., Farley, R.A., Louie, S.G., Chen, T.C., Schonthal, A.H., 2007. Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. Mol Cancer Ther 6, 1262-1275.

Pyrko, P., Soriano, N., Kardosh, A., Liu, Y.T., Uddin, J., Petasis, N.A., Hofman, F.M., Chen, C.S., Chen, T.C., Schonthal, A.H., 2006. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. Mol Cancer 5, 19.

Ristimaki, A., 2004. Cyclooxygenase 2: from inflammation to carcinogenesis. Novartis Found Symp 256, 215-221; discussion 221-216, 259-269.

Ryan, E.P., Bushnell, T.P., Friedman, A.E., Rahman, I., Phipps, R.P., 2008. Cyclooxygenase-2 independent effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on oxidative stress and intracellular glutathione content in normal and malignant human B-cells. Cancer Immunol Immunother 57, 347-358.

Sakurikar, N., Eichhorn, J.M., Chambers, T.C., 2012. Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phosphoregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. J Biol Chem 287, 39193-39204.

Schonthal, A.H., 2006. Antitumor properties of dimethyl-celecoxib, a derivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2: implications for glioma therapy. Neurosurg Focus 20, E21.

Secchiero, P., Barbarotto, E., Gonelli, A., Tiribelli, M., Zerbinati, C., Celeghini, C., Agostinelli, C., Pileri, S.A., Zauli, G., 2005. Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells. Am J Pathol 167, 1599-1607.

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Diederich, M., 2011. Cox-2 inhibitors induce early c-Myc downregulation and lead to expression of differentiation markers in leukemia cells. Cell Cycle 10.

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., Diederich, M., 2010. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. Int J Cell Biol 2010, 215158.

Stankovic, T., Marston, E., 2008. Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo 136, 187-192.

Teske, B.F., Wek, S.A., Bunpo, P., Cundiff, J.K., McClintick, J.N., Anthony, T.G., Wek, R.C., 2011. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell 22, 4390-4405.

Trivigno, D., Bornes, L., Huber, S.M., Rudner, J., 2013. Regulation of protein translation initiation in response to ionizing radiation. Radiation oncology 8, 35.

Virrey, J.J., Liu, Z., Cho, H.Y., Kardosh, A., Golden, E.B., Louie, S.G., Gaffney, K.J., Petasis, N.A., Schonthal, A.H., Chen, T.C., Hofman, F.M., 2010. Antiangiogenic

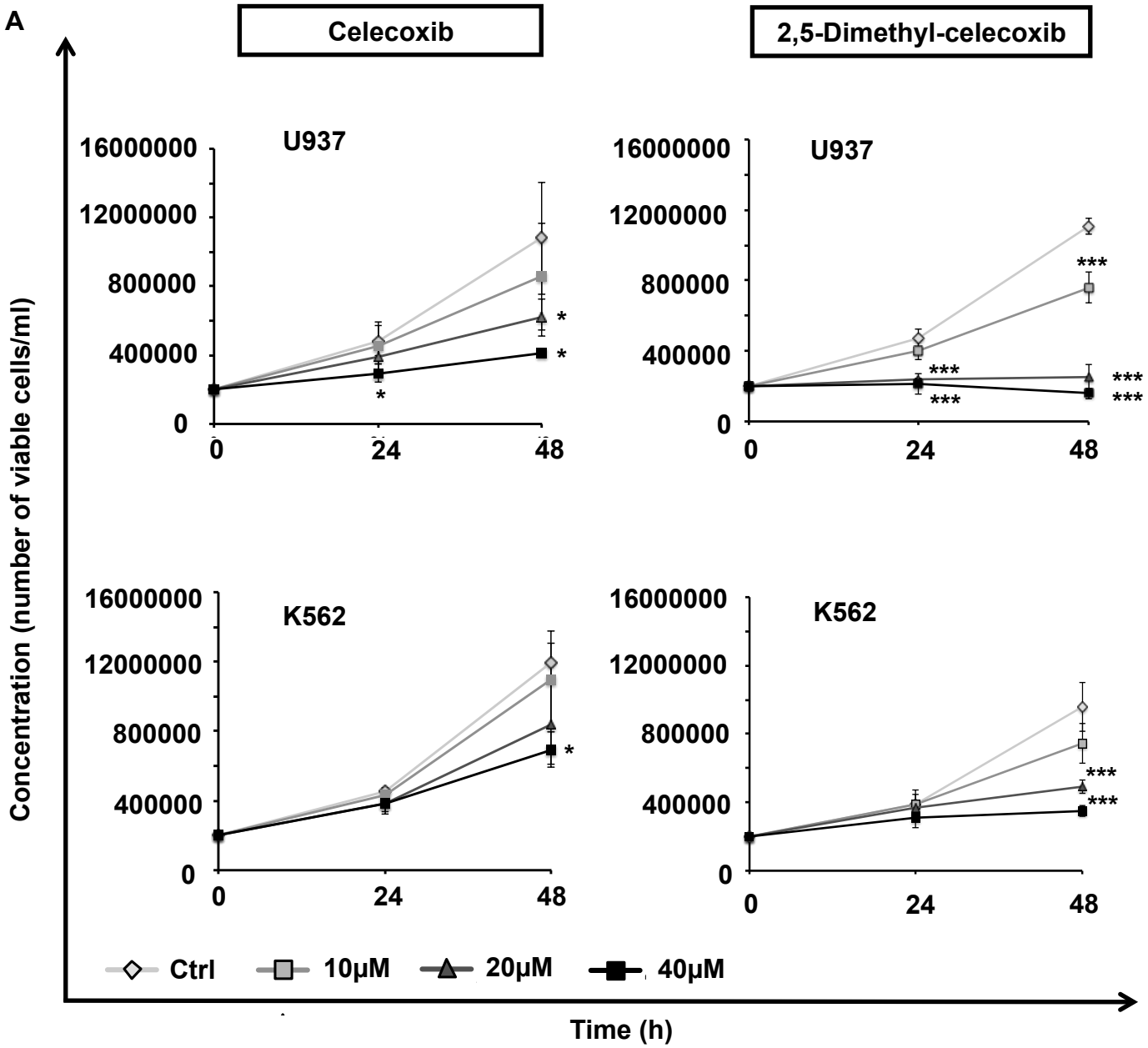
activities of 2,5-dimethyl-celecoxib on the tumor vasculature. Mol Cancer Ther 9, 631-641.

Wang, W., Bergh, A., Damber, J.E., 2005. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. Clin Cancer Res 11, 3250-3256.

Wang, Y.C., Kulp, S.K., Wang, D., Yang, C.C., Sargeant, A.M., Hung, J.H., Kashida, Y., Yamaguchi, M., Chang, G.D., Chen, C.S., 2008. Targeting endoplasmic reticulum stress and Akt with OSU-03012 and gefitinib or erlotinib to overcome resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. Cancer Res 68, 2820-2830.

Wun, T., McKnight, H., Tuscano, J.M., 2004. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. Leuk Res 28, 179-190.

Zhang, S., Suvannasankha, A., Crean, C.D., White, V.L., Johnson, A., Chen, C.S., Farag, S.S., 2007. OSU-03012, a novel celecoxib derivative, is cytotoxic to myeloma cells and acts through multiple mechanisms. Clin Cancer Res 13, 4750-4758.



U937	Celecoxib	2,5 dimethyl celecoxib
Percentage of growth inhibition after 48h	59.45 ± 12.38 %	85.67 ± 2.49 %

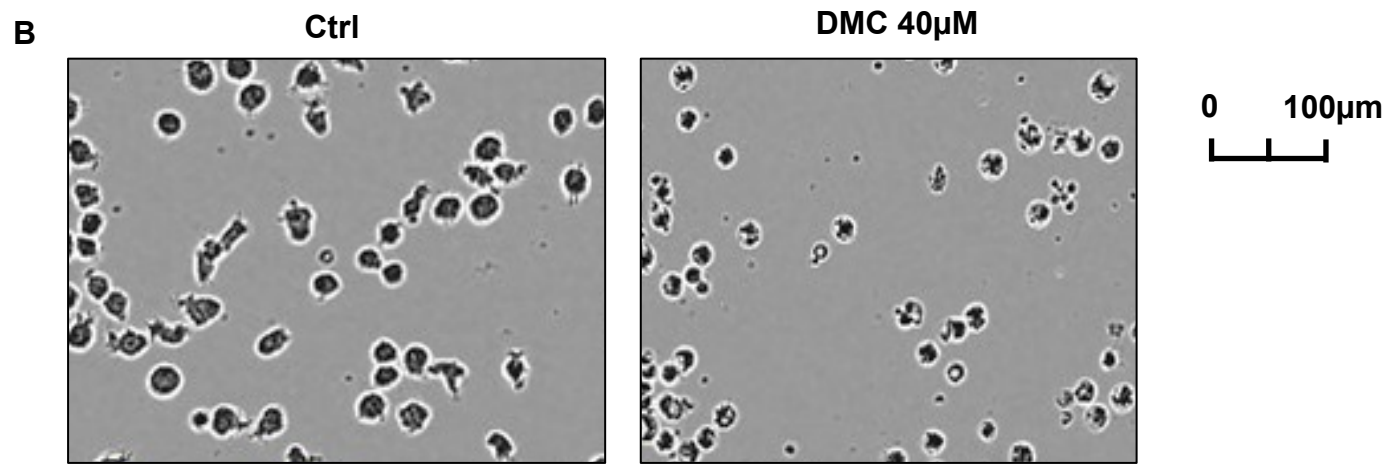


Fig. 1

C

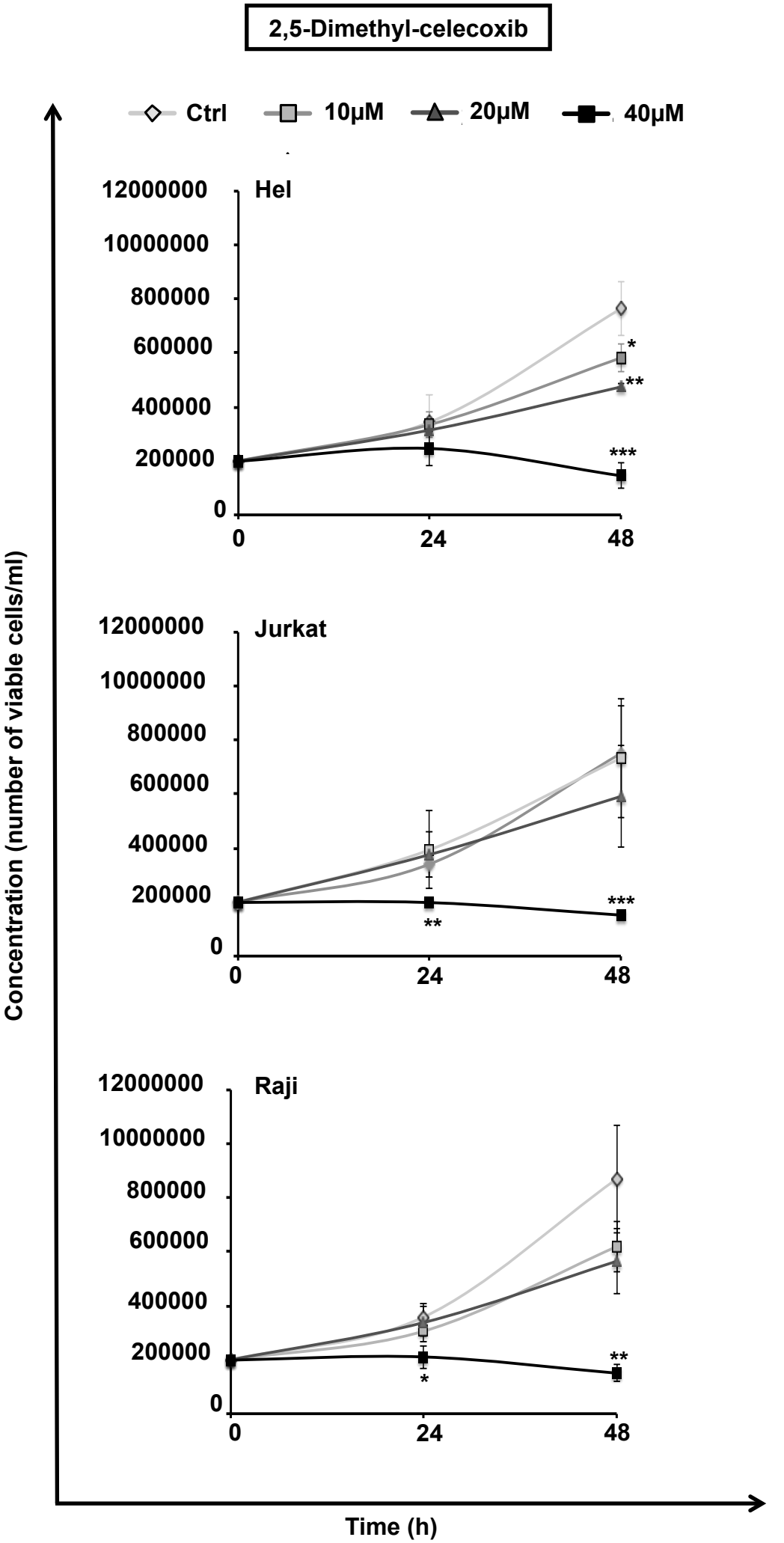

2,5-Dimethyl-celecoxib
Ctrl
10μM
20μM
40μM
Hel
Jurkat
Raji
12000000
10000000
800000
600000
400000
200000
0
0
24
48
*
**
***
Concentration (number of viable cells/ml)
Time (h)

Fig. 1

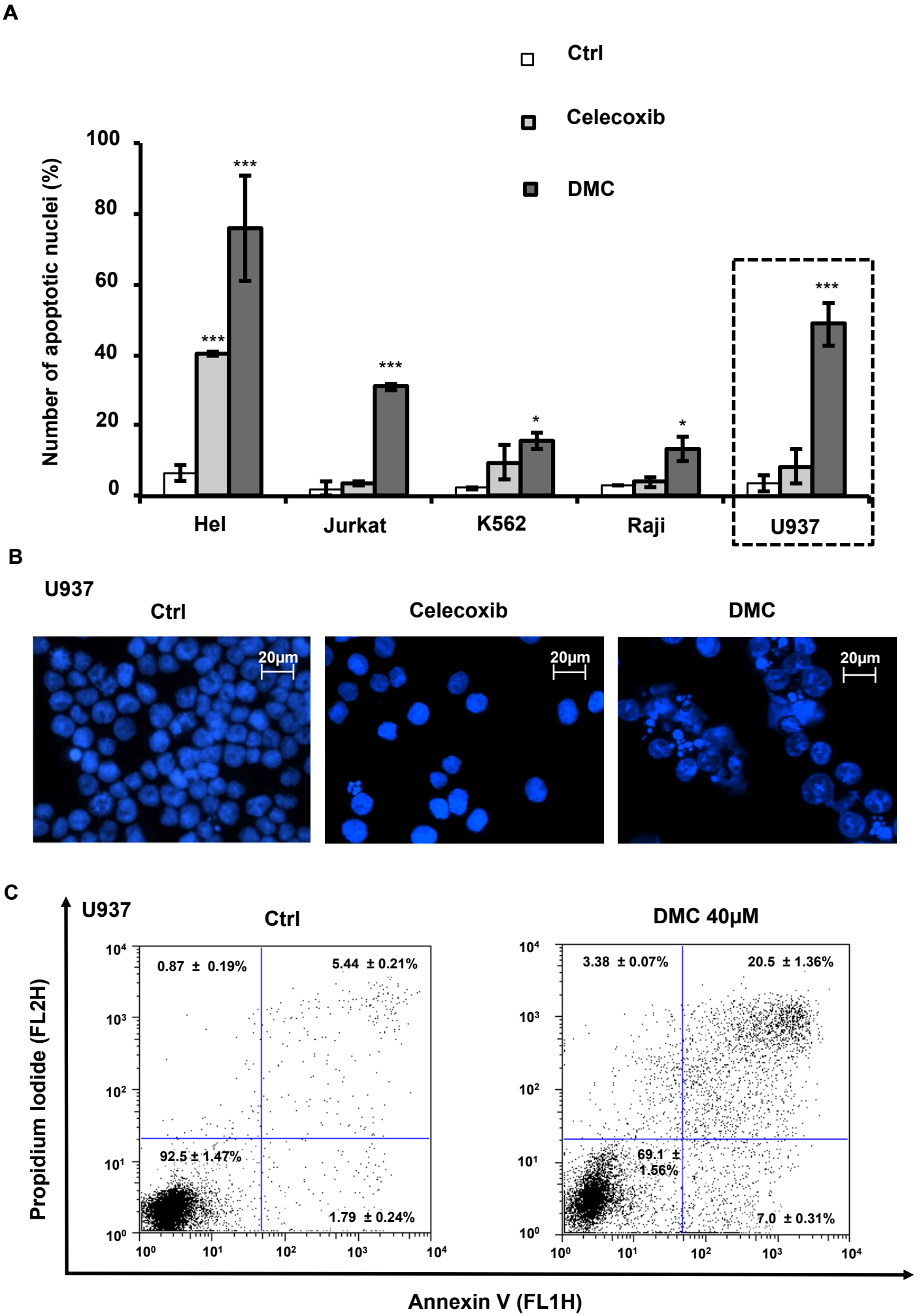

A
Ctrl
Celecoxib
DMC
Number of apoptotic nuclei (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
***
*
*
***
Hel
Jurkat
K562
Raji
U937
B
U937
Ctrl
Celecoxib
DMC
20μm
20μm
20μm
C
U937
Ctrl
DMC 40μM
0.87 ± 0.19%
5.44 ± 0.21%
92.5 ± 1.47%
1.79 ± 0.24%
3.38 ± 0.07%
20.5 ± 1.36%
69.1 ± 1.56%
7.0 ± 0.31%
Propidium Iodide (FL2H)
Annexin V (FL1H)

Fig. 2

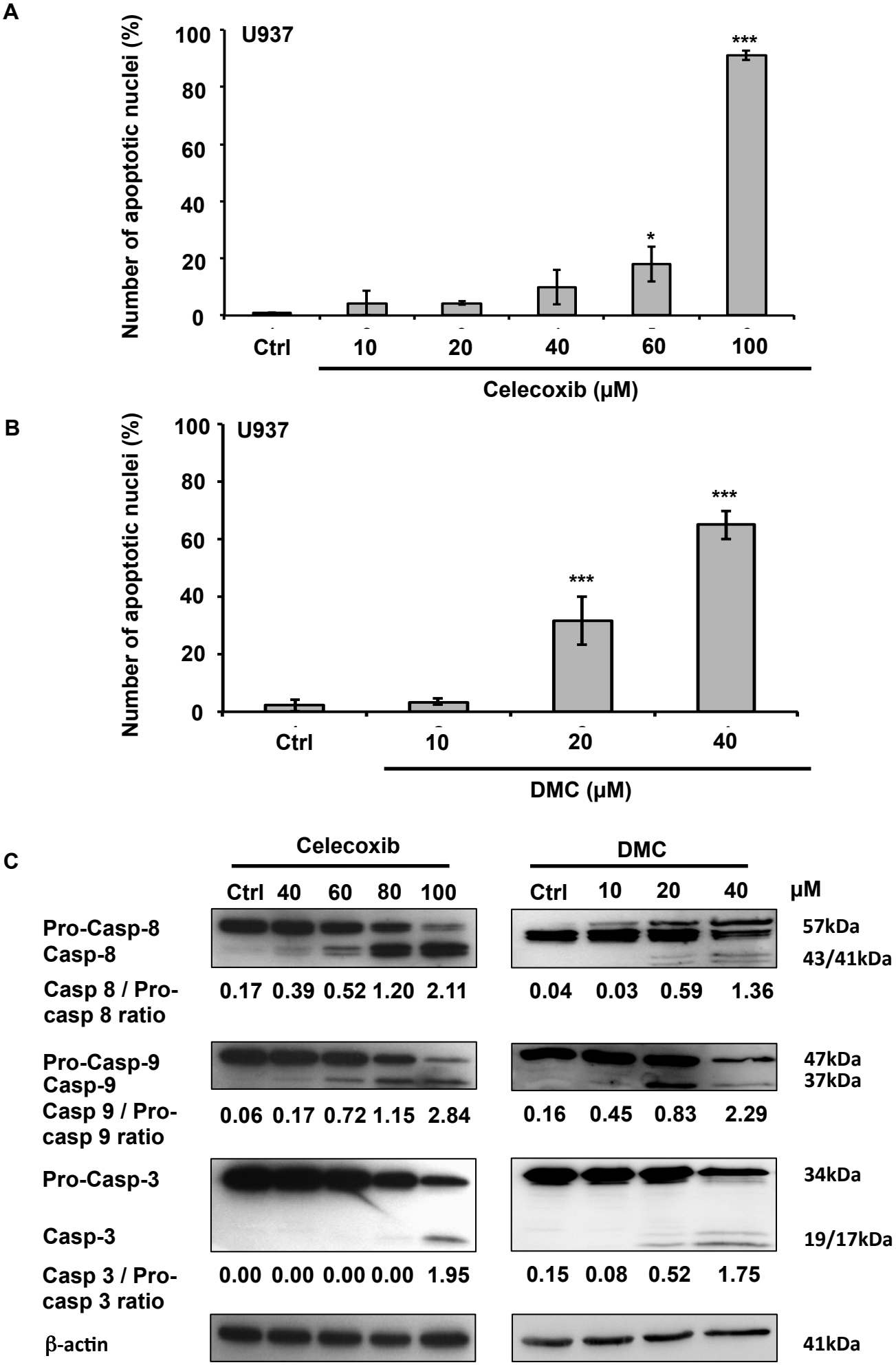

A
U937
Number of apoptotic nuclei (%)
100
80
60
40
20
0
***
*
Ctrl
10
20
40
60
100
Celecoxib (μM)
B
U937
Number of apoptotic nuclei (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
Ctrl
10
20
40
DMC (μM)
C
Celecoxib
DMC
Ctrl 40 60 80 100
Ctrl 10 20 40
μM
Pro-Casp-8
Casp-8
57kDa
43/41kDa
Casp 8 / Pro-casp 8 ratio
0.17 0.39 0.52 1.20 2.11
0.04 0.03 0.59 1.36
Pro-Casp-9
Casp-9
47kDa
37kDa
Casp 9 / Pro-casp 9 ratio
0.06 0.17 0.72 1.15 2.84
0.16 0.45 0.83 2.29
Pro-Casp-3
34kDa
Casp-3
19/17kDa
Casp 3 / Pro-casp 3 ratio
0.00 0.00 0.00 0.00 1.95
0.15 0.08 0.52 1.75
β-actin
41kDa

Fig. 3

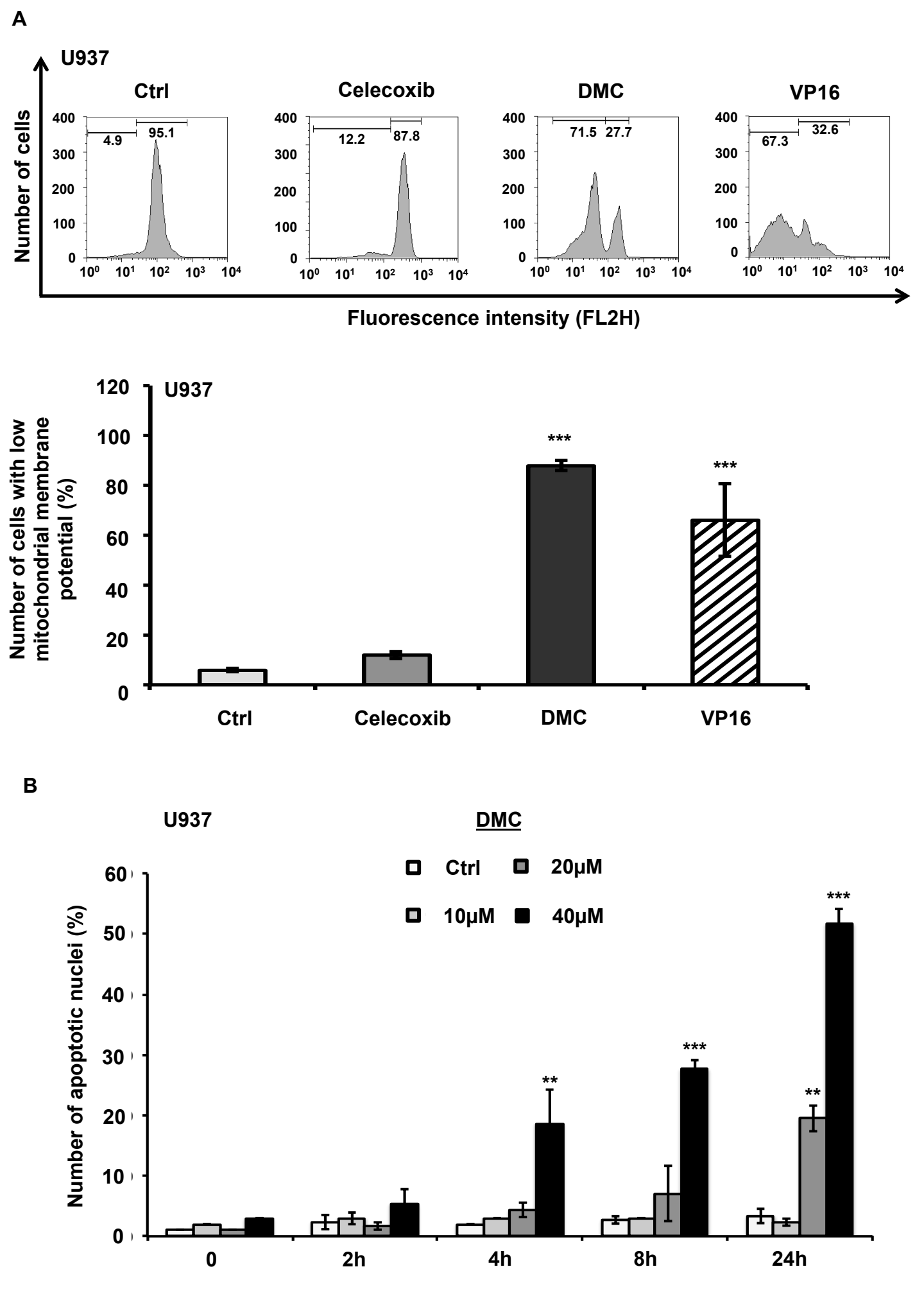

A
U937
Ctrl
Celecoxib
DMC
VP16
Number of cells
4.9
95.1
12.2
87.8
71.5
27.7
67.3
32.6
Fluorescence intensity (FL2H)
U937
Number of cells with low mitochondrial membrane potential (%)
***
***
Ctrl
Celecoxib
DMC
VP16
B
U937
DMC
Ctrl
20μM
10μM
40μM
Number of apoptotic nuclei (%)
**
***
**
***
0
2h
4h
8h
24h

Fig. 4

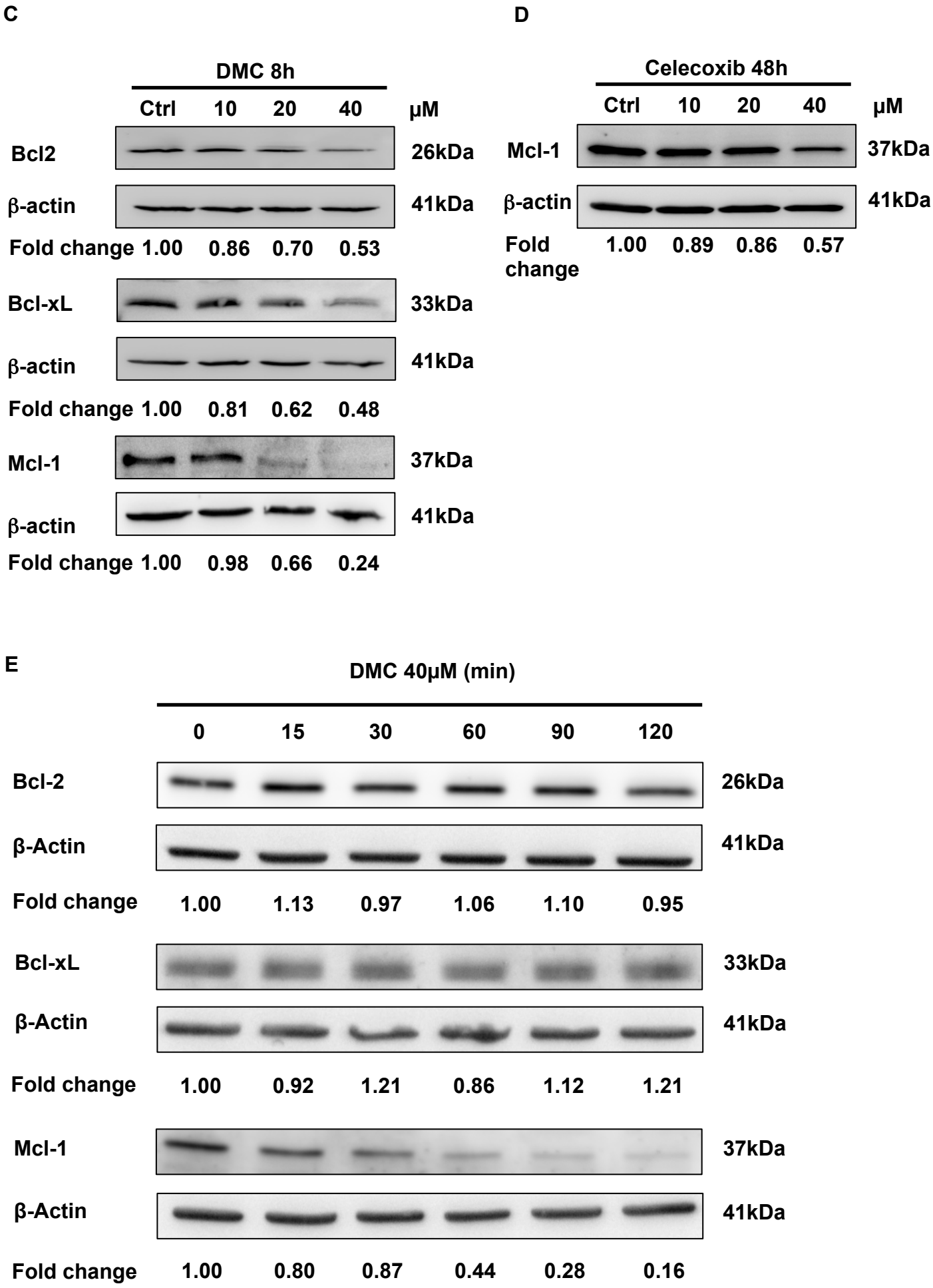

C
DMC 8h
Ctrl 10 20 40 μM
Bcl2
26kDa
β-actin
41kDa
Fold change 1.00 0.86 0.70 0.53
Bcl-xL
33kDa
β-actin
41kDa
Fold change 1.00 0.81 0.62 0.48
Mcl-1
37kDa
β-actin
41kDa
Fold change 1.00 0.98 0.66 0.24
D
Celecoxib 48h
Ctrl 10 20 40 μM
Mcl-1
37kDa
β-actin
41kDa
Fold change 1.00 0.89 0.86 0.57
E
DMC 40μM (min)
0 15 30 60 90 120
Bcl-2
26kDa
β-Actin
41kDa
Fold change 1.00 1.13 0.97 1.06 1.10 0.95
Bcl-xL
33kDa
β-Actin
41kDa
Fold change 1.00 0.92 1.21 0.86 1.12 1.21
Mcl-1
37kDa
β-Actin
41kDa
Fold change 1.00 0.80 0.87 0.44 0.28 0.16

Fig. 4

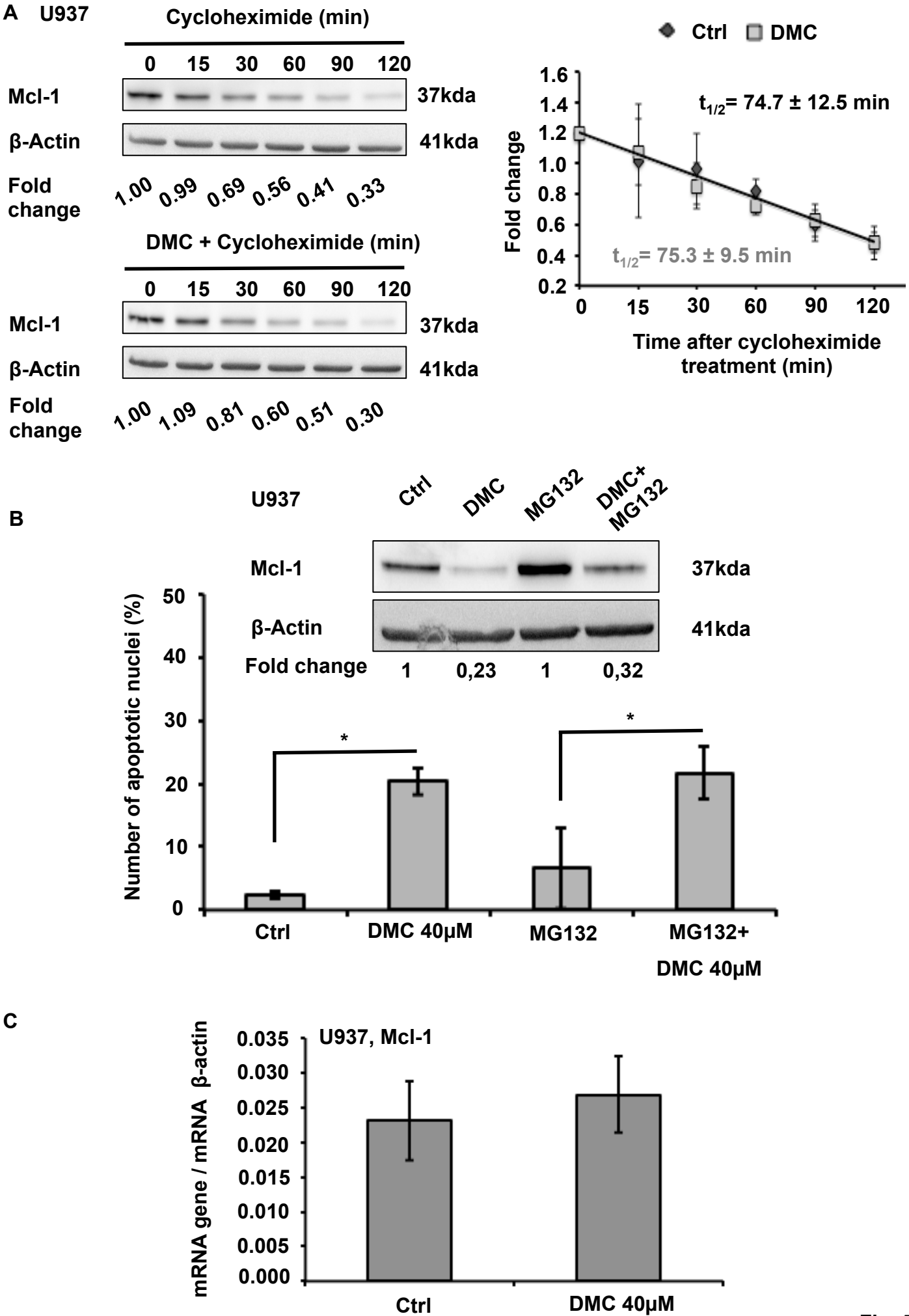

A
U937
Cycloheximide (min)
0
15
30
60
90
120
Mcl-1
37kda
β-Actin
41kda
Fold change
1.00
0.99
0.69
0.56
0.41
0.33
DMC + Cycloheximide (min)
0
15
30
60
90
120
Mcl-1
37kda
β-Actin
41kda
Fold change
1.00
1.09
0.81
0.60
0.51
0.30
Ctrl
DMC
Fold change
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
t1/2= 74.7 ± 12.5 min
t1/2= 75.3 ± 9.5 min
0
15
30
60
90
120
Time after cycloheximide treatment (min)
B
U937
Ctrl
DMC
MG132
DMC+ MG132
Mcl-1
37kda
β-Actin
41kda
Fold change
1
0,23
1
0,32
Number of apoptotic nuclei (%)
50
40
30
20
10
0
*
*
Ctrl
DMC 40μM
MG132
MG132+ DMC 40μM
C
U937, Mcl-1
mRNA gene / mRNA β-actin
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
Ctrl
DMC 40μM

Fig. 5

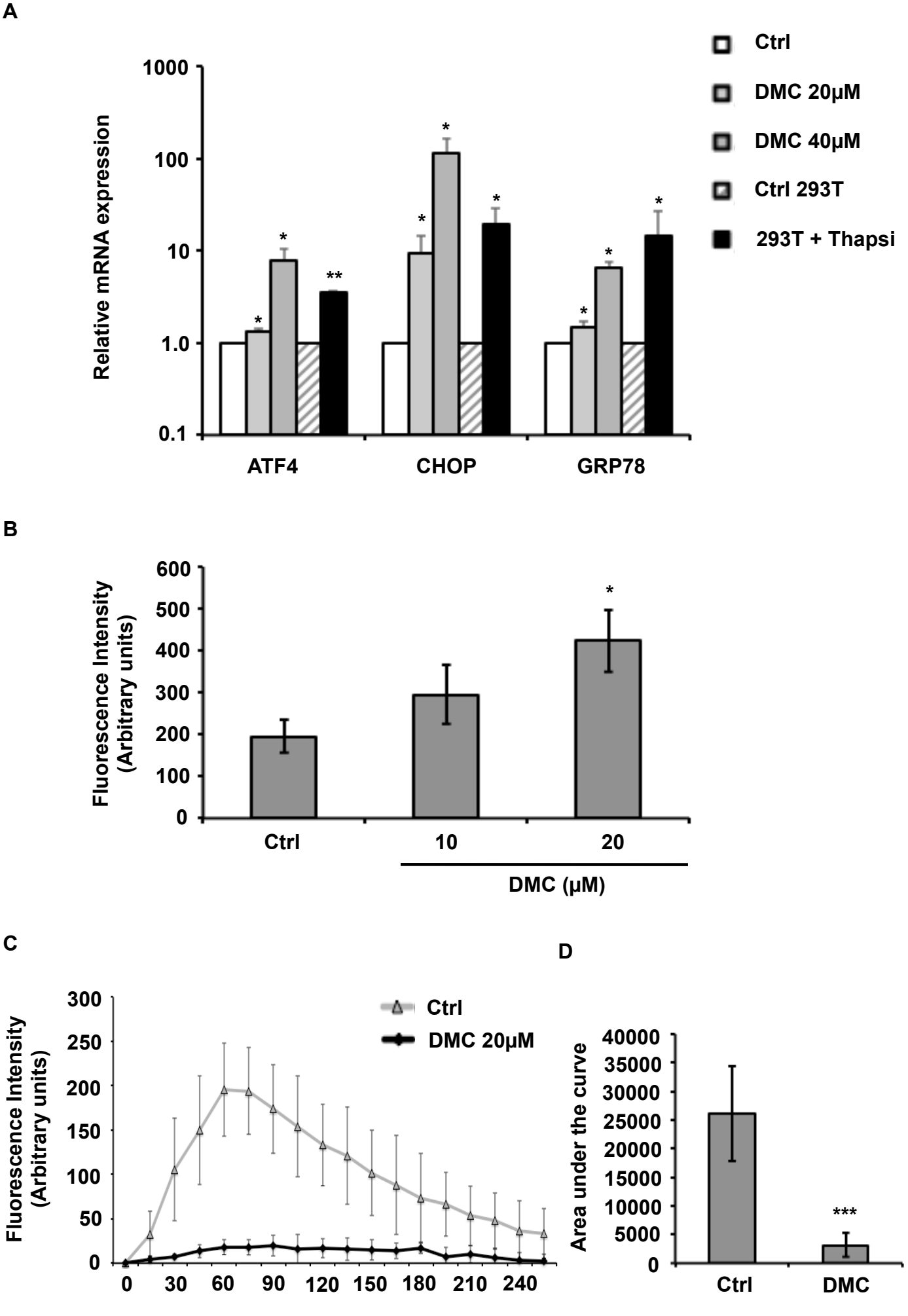
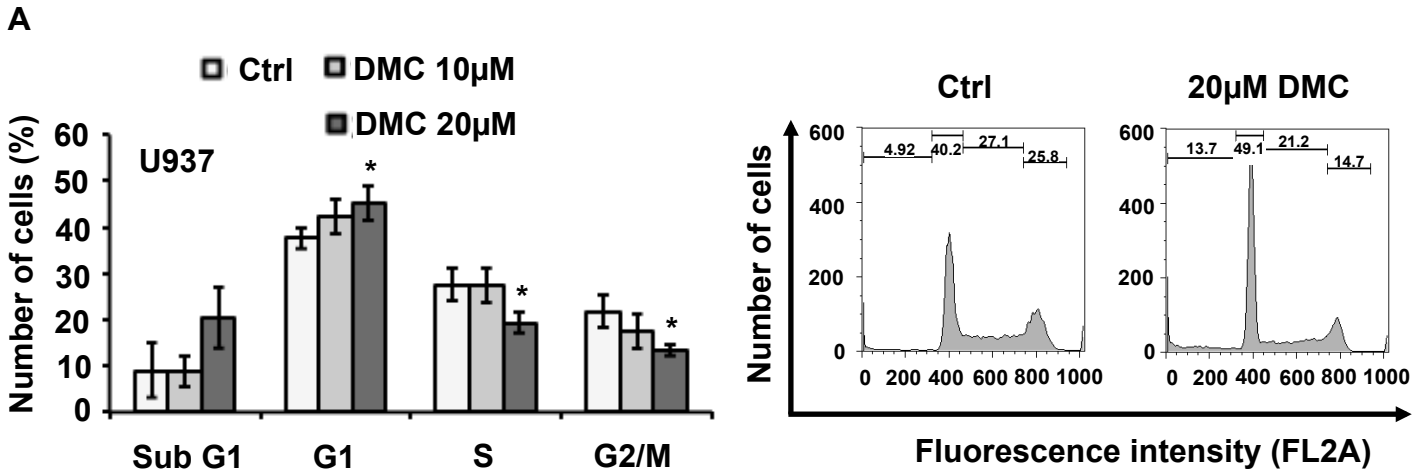
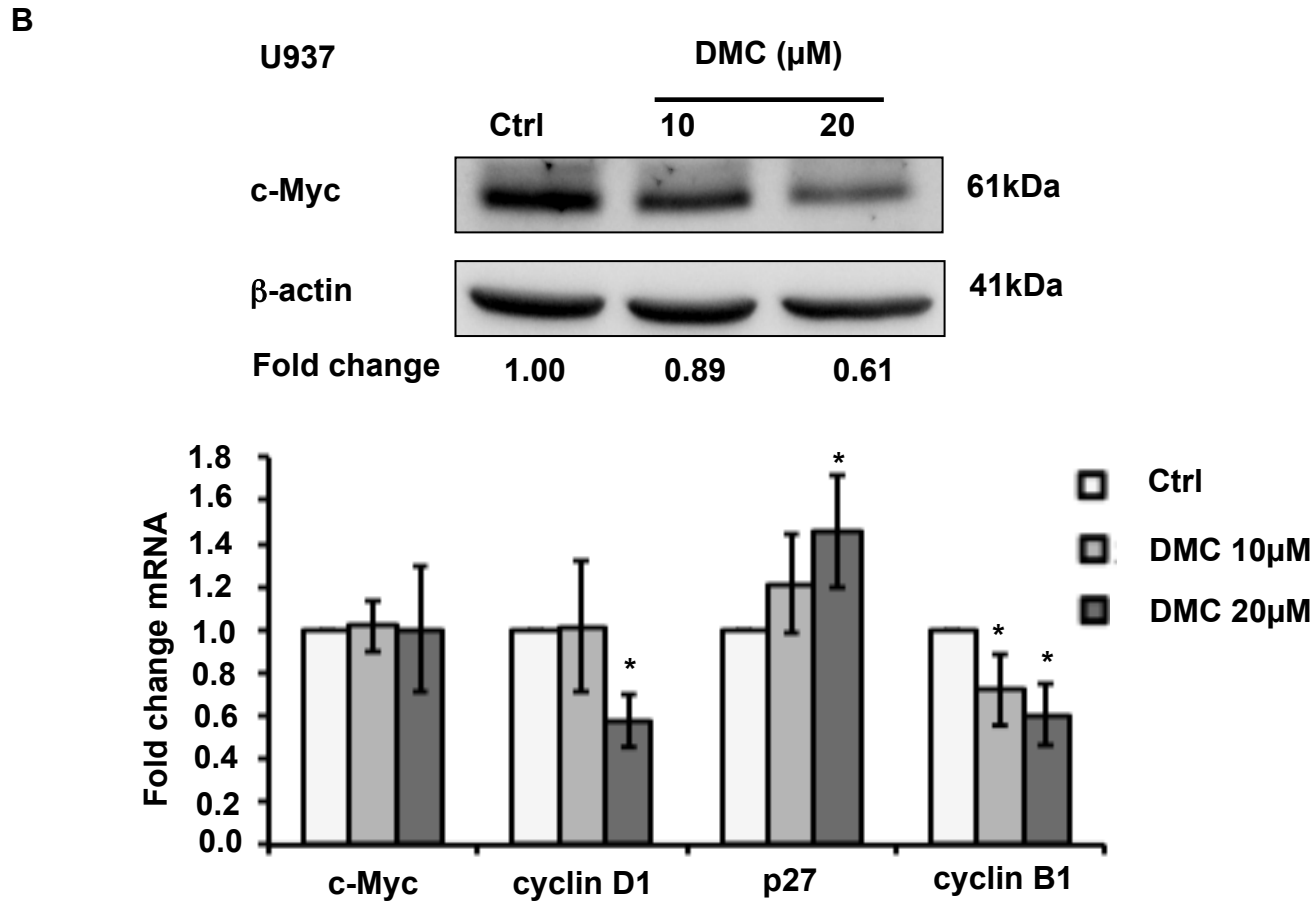

A
Relative mRNA expression
1000
100
10
1.0
0.1
Ctrl
DMC 20μM
DMC 40μM
Ctrl 293T
293T + Thapsi
ATF4
CHOP
GRP78
B
Fluorescence Intensity (Arbitrary units)
600
500
400
300
200
100
0
Ctrl
10
20
DMC (μM)
C
Fluorescence Intensity (Arbitrary units)
300
250
200
150
100
50
0
Ctrl
DMC 20μM
0
30
60
90
120
150
180
210
240
D
Area under the curve
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
***
Ctrl
DMC

Fig. 6


A
Ctrl
DMC 10μM
DMC 20μM
U937
Number of cells (%)
Sub G1
G1
S
G2/M
Ctrl
20μM DMC
Number of cells
4.92
40.2
27.1
25.8
13.7
49.1
21.2
14.7
Fluorescence intensity (FL2A)


B
U937
DMC (μM)
Ctrl
10
20
c-Myc
61kDa
β-actin
41kDa
Fold change
1.00
0.89
0.61
Fold change mRNA
Ctrl
DMC 10μM
DMC 20μM
c-Myc
cyclin D1
p27
cyclin B1

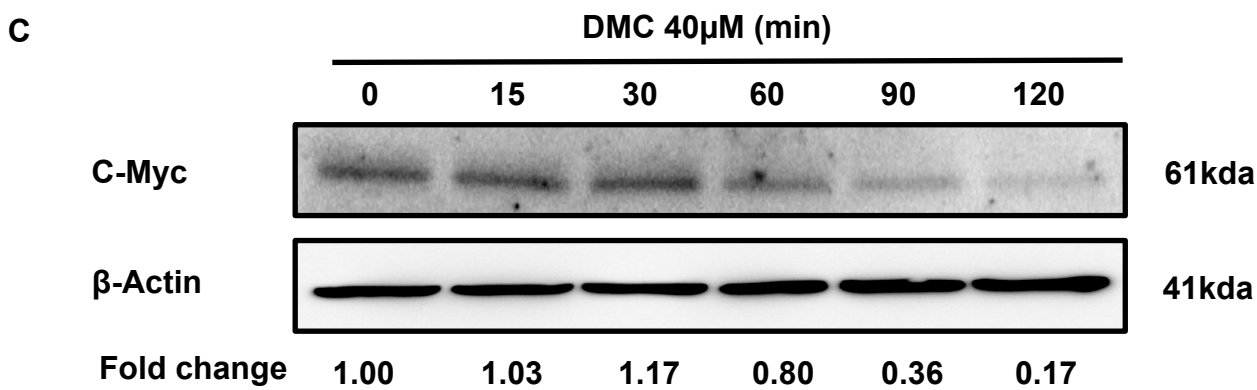

C
DMC 40μM (min)
0
15
30
60
90
120
C-Myc
61kda
β-Actin
41kda
Fold change
1.00
1.03
1.17
0.80
0.36
0.17

Fig. 7

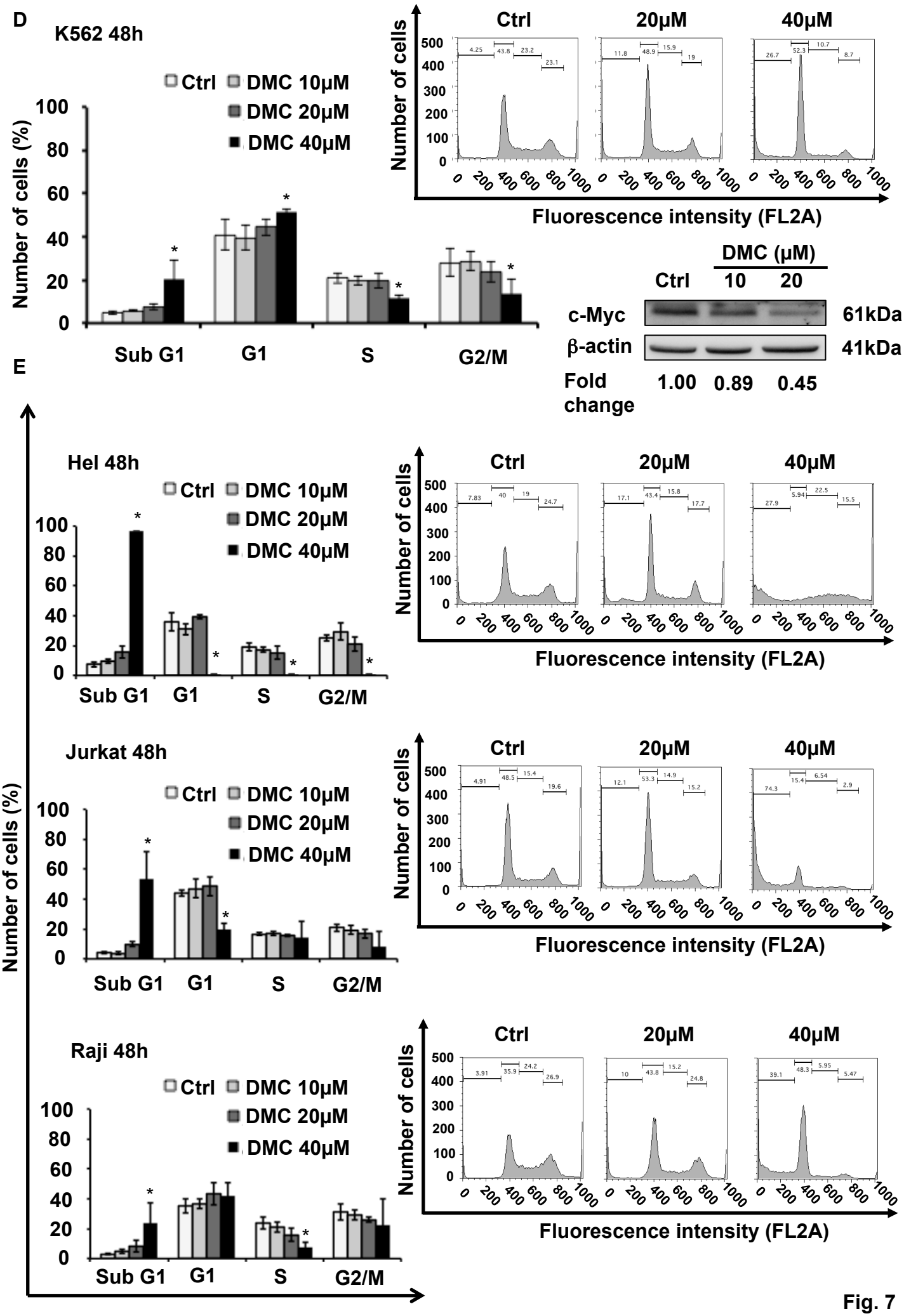

D
K562 48h
Ctrl
DMC 10μM
DMC 20μM
DMC 40μM
Number of cells (%)
Sub G1
G1
S
G2/M
Ctrl
20μM
40μM
Number of cells
Fluorescence intensity (FL2A)
DMC (μM)
Ctrl
10
20
c-Myc
61kDa
β-actin
41kDa
Fold change
1.00
0.89
0.45
E
Hel 48h
Jurkat 48h
Raji 48h

Fig. 7

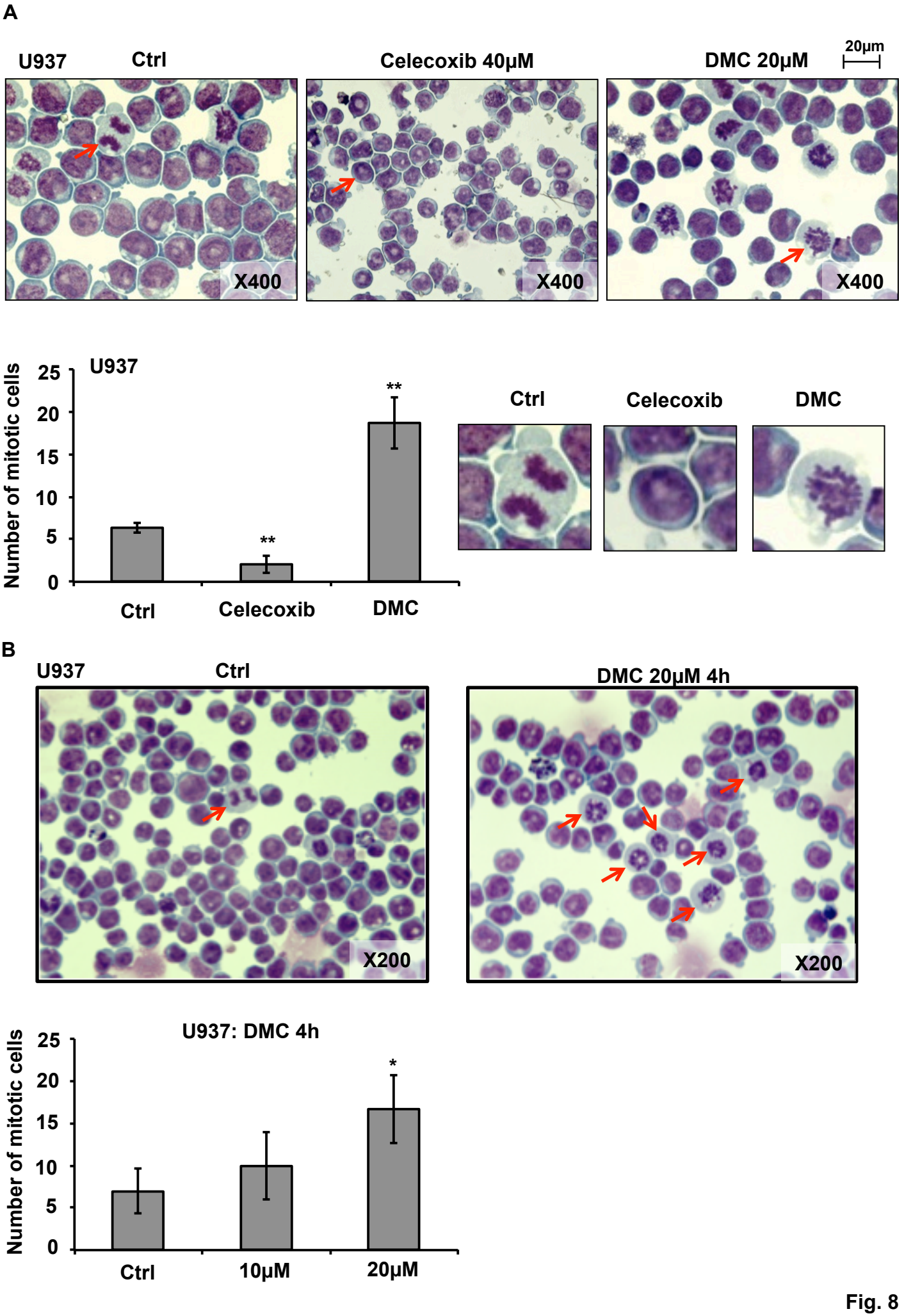
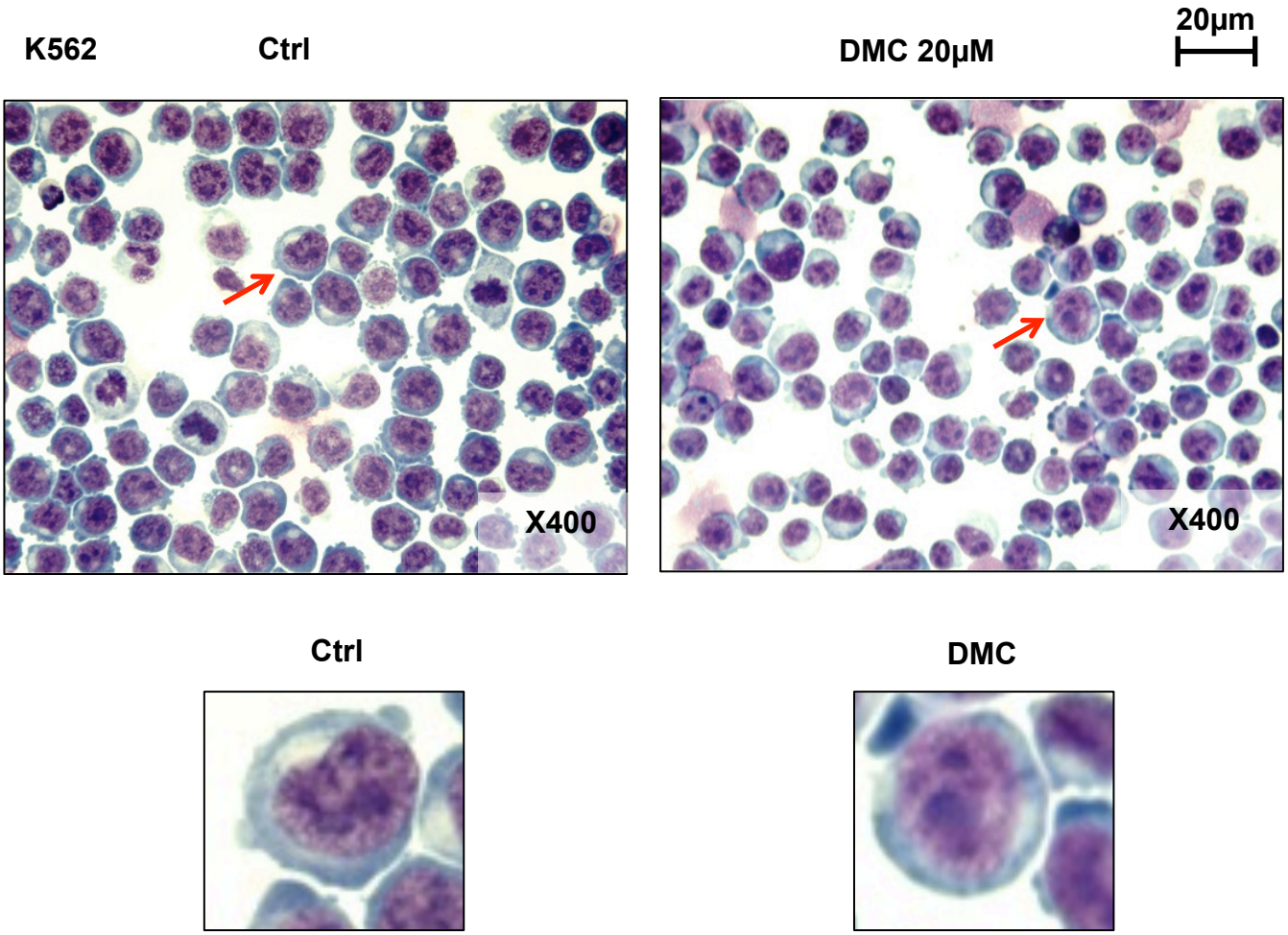

A
U937
Ctrl
Celecoxib 40μM
DMC 20μM
20μm
X400
X400
X400
U937
Number of mitotic cells
25
20
15
10
5
0
**
**
Ctrl
Celecoxib
DMC
Ctrl
Celecoxib
DMC
B
U937
Ctrl
DMC 20μM 4h
X200
X200
U937: DMC 4h
Number of mitotic cells
25
20
15
10
5
0
*
Ctrl
10μM
20μM

Fig. 8

C


K562
Ctrl
DMC 20μM
20μm
X400
X400
Ctrl
DMC

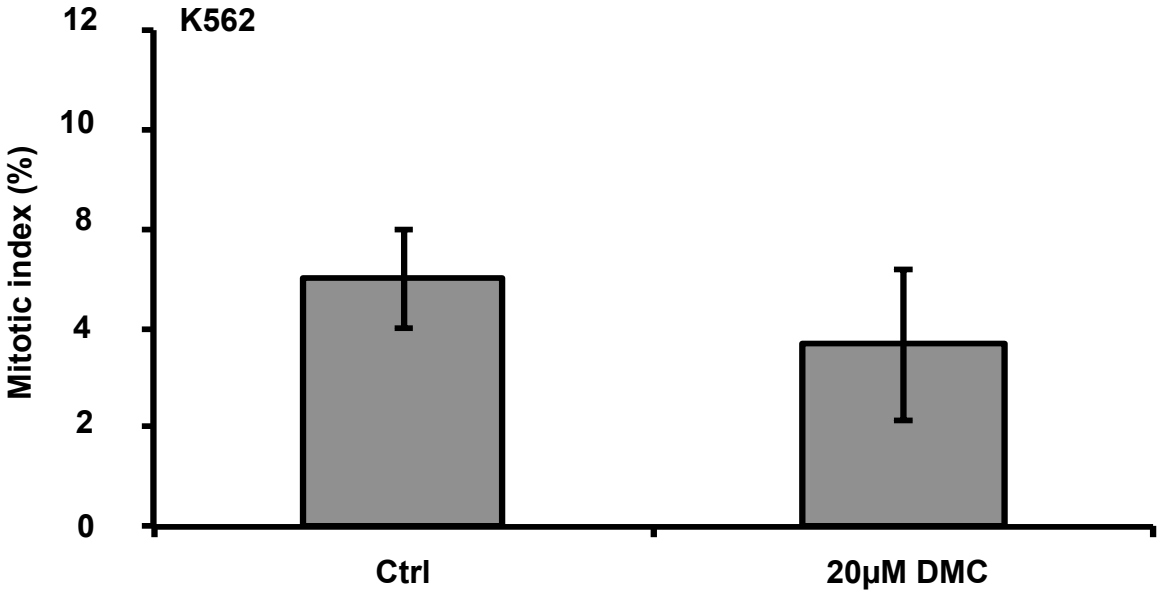

K562
12
10
8
4
2
0
Mitotic index (%)
Ctrl
20μM DMC

Fig. 8

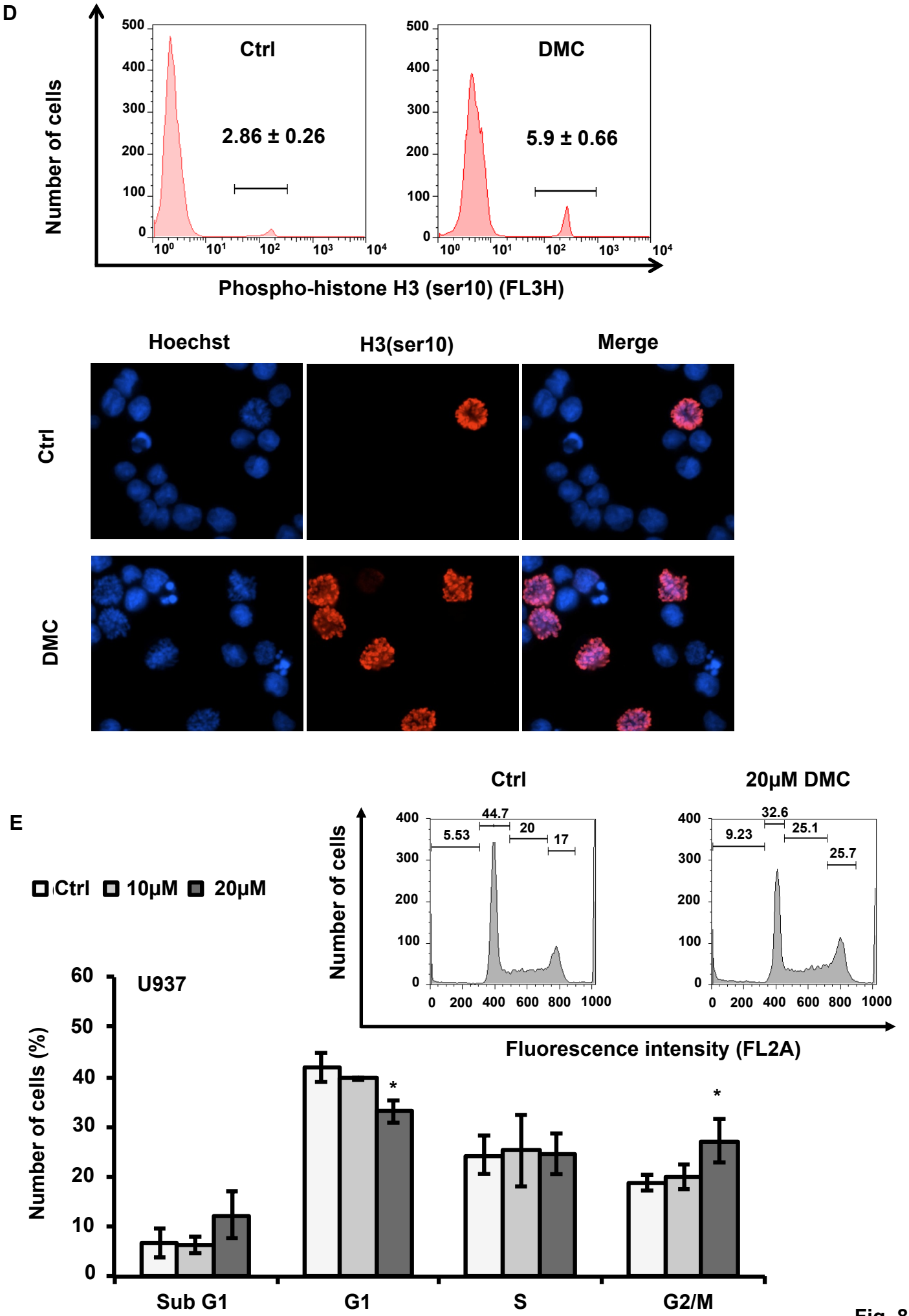
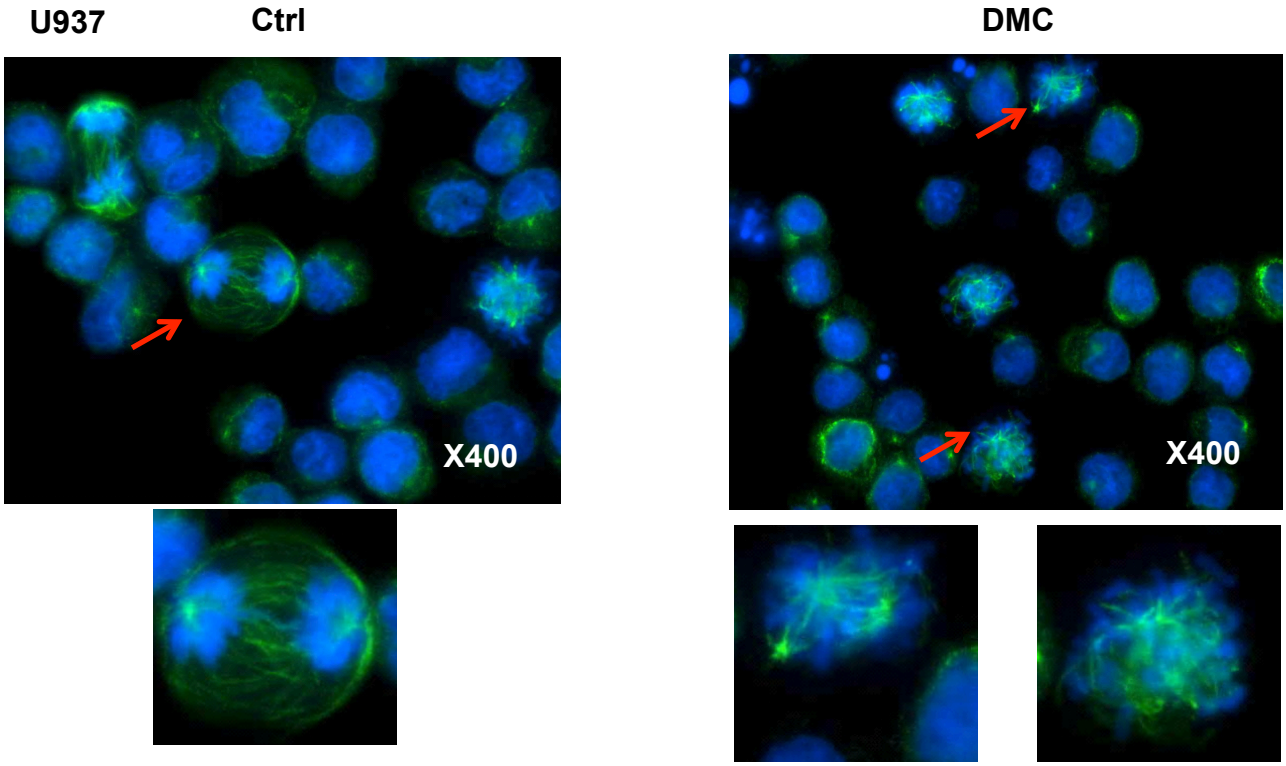

D
Ctrl
2.86 ± 0.26
DMC
5.9 ± 0.66
Number of cells
Phospho-histone H3 (ser10) (FL3H)
Hoechst
H3(ser10)
Merge
Ctrl
DMC
E
Ctrl
20μM DMC
44.7
5.53
20
17
32.6
9.23
25.1
25.7
Number of cells
Fluorescence intensity (FL2A)
Ctrl
10μM
20μM
U937
Number of cells (%)
Sub G1
G1
S
G2/M

Fig. 8

F


U937
Ctrl
DMC
X400
X400

G

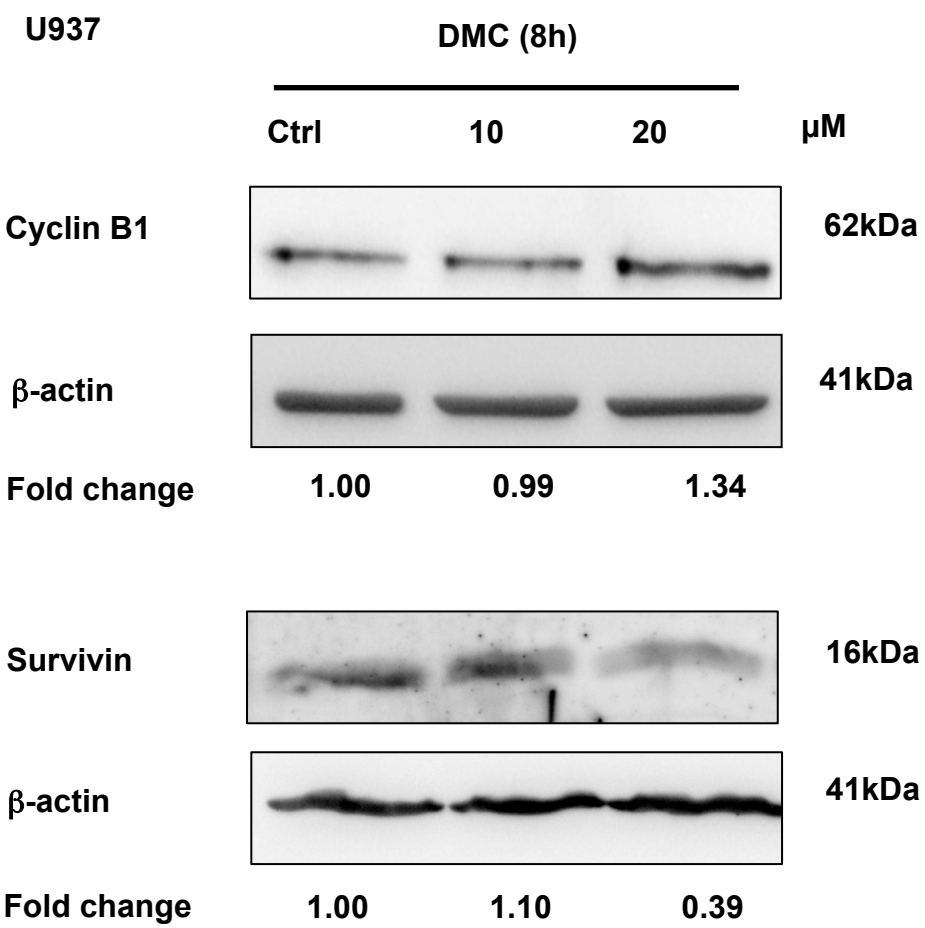
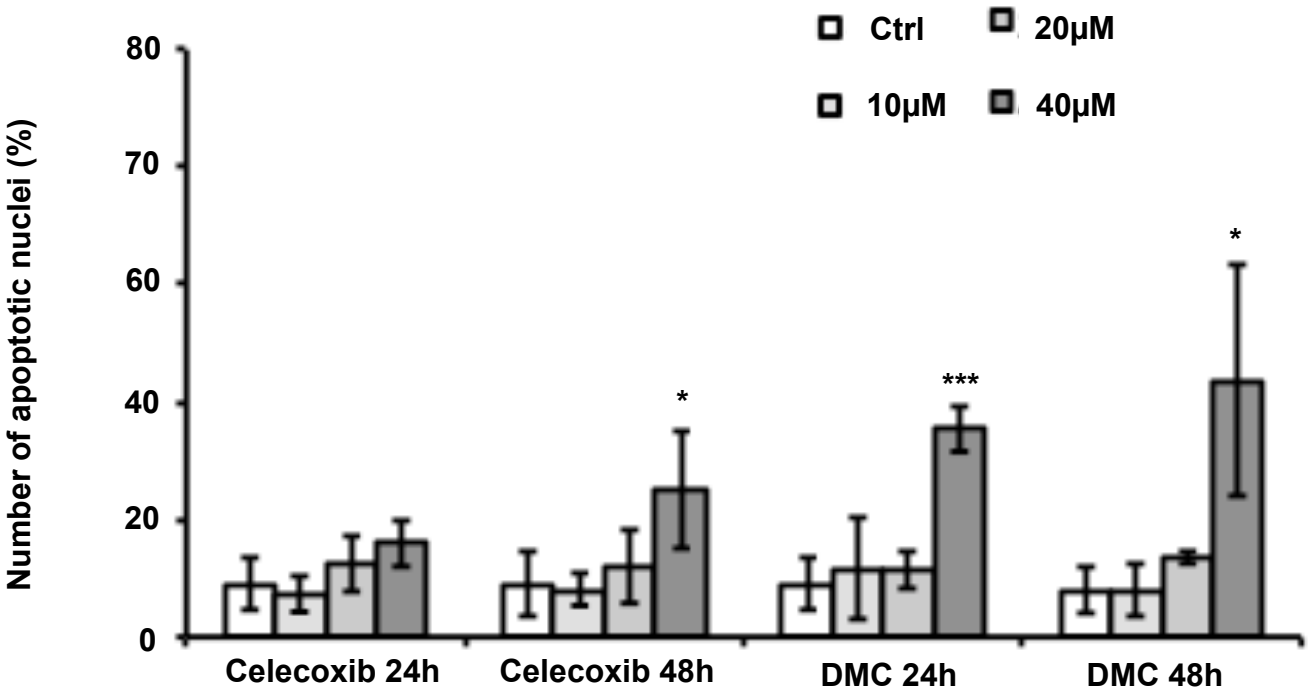

U937
DMC (8h)
Ctrl
10
20
μM
Cyclin B1
62kDa
β-actin
41kDa
Fold change
1.00
0.99
1.34
Survivin
16kDa
β-actin
41kDa
Fold change
1.00
1.10
0.39

Fig. 8

A


Ctrl
20μM
10μM
40μM
Number of apoptotic nuclei (%)
80
70
60
40
20
0
*
***
*
Celecoxib 24h
Celecoxib 48h
DMC 24h
DMC 48h

B

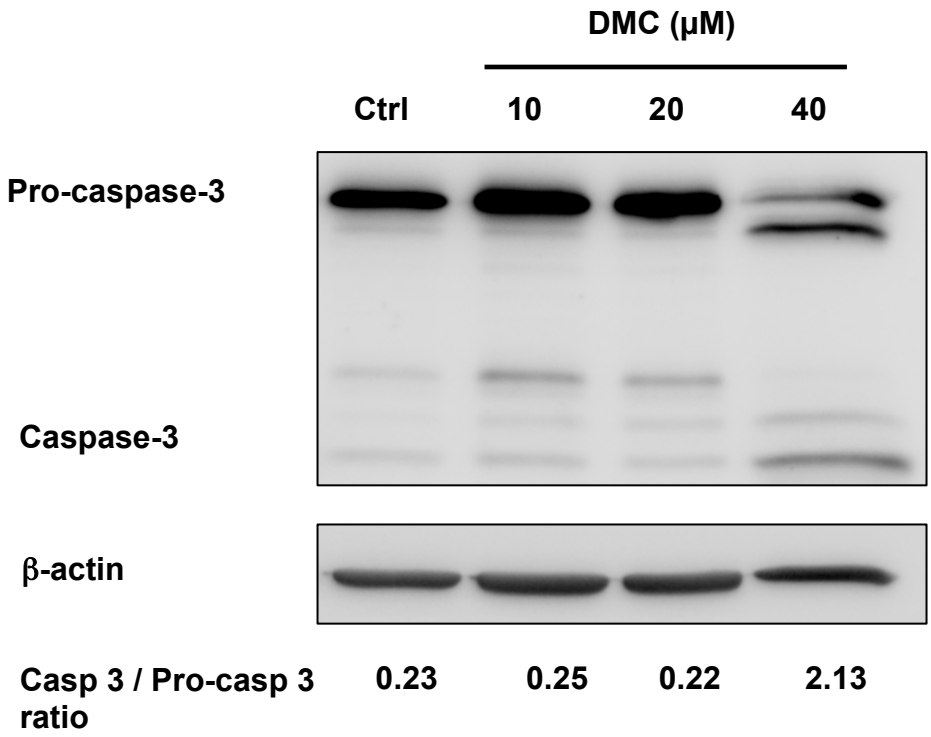
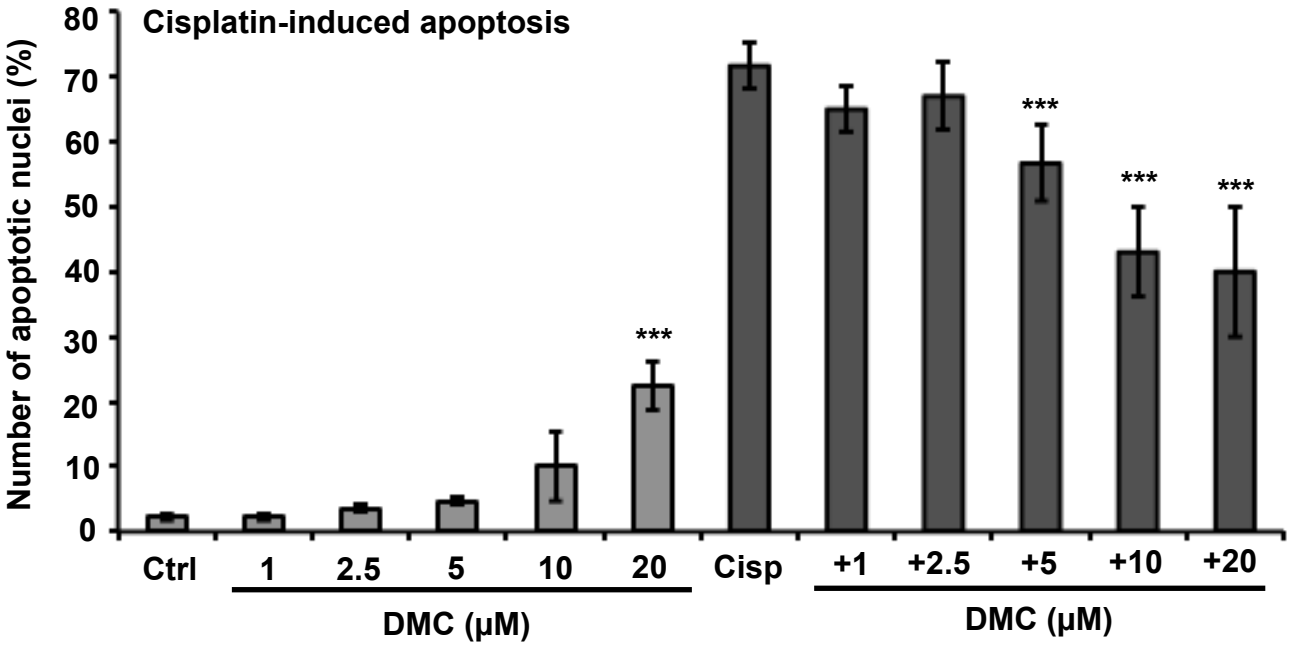

DMC (μM)
Ctrl
10
20
40
Pro-caspase-3
Caspase-3
β-actin
Casp 3 / Pro-casp 3 ratio
0.23
0.25
0.22
2.13

Fig. 9

A


Cisplatin-induced apoptosis
Number of apoptotic nuclei (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
***
***
***
Ctrl
1
2.5
5
10
20
Cisp
+1
+2.5
+5
+10
+20
DMC (μM)
DMC (μM)

B

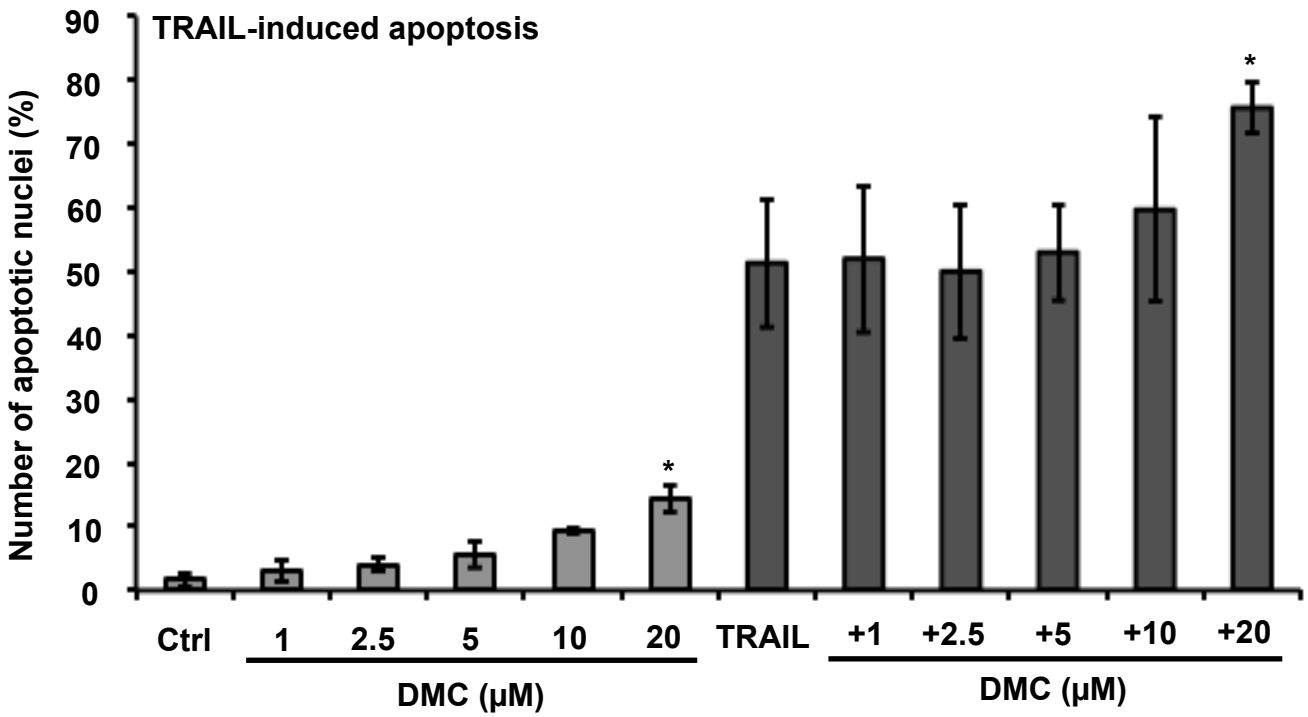

TRAIL-induced apoptosis
Number of apoptotic nuclei (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
Ctrl
1
2.5
5
10
20
TRAIL
+1
+2.5
+5
+10
+20
DMC (μM)
DMC (μM)

Fig. 10

A

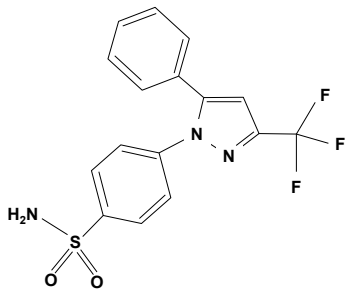
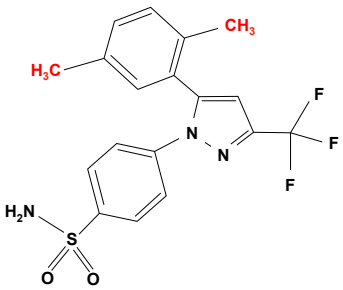
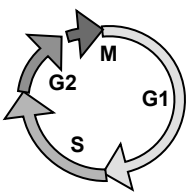
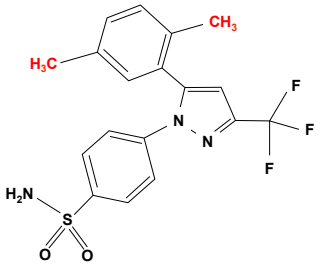
Molecules	Celecoxib	2,5-dimethyl-celecoxib
Chemical structure		
% Growth inhibition 48h	**59.45 ± 12.38 %**	**85.67 ± 2.49 %**
Effect on cell cycle 	**Accumulation in G0/G1 phase of cell cycle:** *Downregulation of c-Myc, cyclin D1, up-regulation of p27*	**Accumulation in G0/G1 phase of cell cycle after 24h:** *Downregulation of c-Myc, cyclin D1,up-regulation of p27* **Affects mitotic progression after short treatment:** *Accumulation of cells in prophase: cyclin BI accumulation, survivin downregulation*
Effect on apoptosis 	**Induces apoptosis from 60µM after 24h** *Small downregulation of Mcl-1* **Prevents chemotherapics-induced apoptosis in U937 cells**	**Induces apoptosis from 20µM after 24h** *Downregulation of Mcl-1, survivin* **Prevents cisplatin/etoposide-induced apoptosis in U937 cells**

Fig. 11

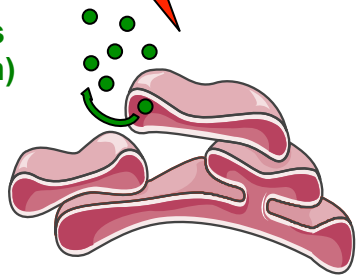
B



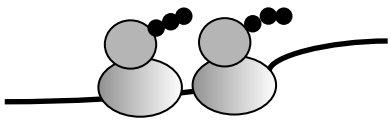
DMC

ER STRESS

Ca2+
homeostasis
(ER depletion)

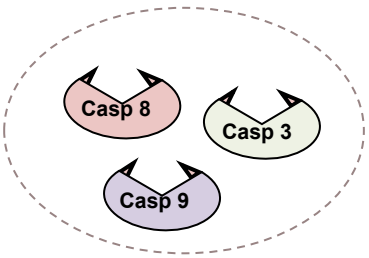


Translation inhibition?

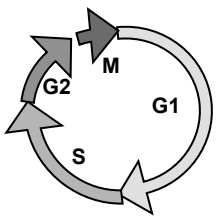


Mcl-1
C-myc

CHOP activation



Caspases activation



Cell cycle alterations:
G0/G1, G2/M



Apoptosis

Fig. 11

Celecoxib Prevents Curcumin-Induced Apoptosis in a Hematopoietic Cancer Cell Model

Cyril Sobolewski,[1] Florian Muller,[1] Claudia Cerella,[1] Mario Dicato,[1] and Marc Diederich[2]*

[1]*Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, Luxembourg, Luxembourg*
[2]*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea*

Molecules targeting pro-inflammatory pathways have demonstrated beneficial effects in cancer treatment. More recently, combination of natural and synthetic anti-inflammatory drugs was suggested as an appealing strategy to inhibit tumor growth. Herein, we show that curcumin, a polyphenol from *Curcuma longa* and celecoxib induce apoptosis in hematopoietic cancer cell lines (Hel, Jurkat, K562, Raji, and U937). Further investigations on the most sensitive cell line, U937, indicated that these effects were tightly associated with an accumulation of the cells in S and G2/M for curcumin and in G0/G1 phase of cell cycle for celecoxib, respectively. The effect of celecoxib on cell cycle is associated with an induction of p27 and the down-regulation of cyclin D1. However, in the case of combination experiments, the pretreatment of U937 cells with celecoxib at non-apoptogenic concentrations counteracted curcumin-induced apoptosis. We found that this effect correlated with the prevention of the accumulation in S and G2/M phase of cell cycle induced by curcumin. Similar results have been obtained when celecoxib and curcumin were co-administrated at the same time. Overall our data suggest that this natural and synthetic drug combination is detrimental for cell death induction. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: celecoxib; COX-2; curcumin; apoptosis; cell cycle

INTRODUCTION

The molecular basis linking chronic inflammation and tumor progression highlights the importance of pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α, and associated, nuclear factor-kappa B (NF-κB) cell signaling pathways [1–4]. Moreover, enzymes such as cyclooxygenase-2 (COX-2) are also key regulators of tumor promotion. Cyclooxygenases belongs to a family of enzymes that catalyze conversion of arachidonic acid to thromboxane and prostaglandins [5,6]. While COX-1, the first-identified isoform of this family is constitutively expressed and plays a role in tissue homeostasis, COX-2 expression is induced by pro-inflammatory stimuli [7] and is important for promotion of inflammation, fever, and carcinogenesis.

Recently, targeting COX-2 and NF-κB became appealing strategies in the development of anti-cancer treatments. COX-2 inhibitors can reduce tumor progression by inhibiting cell proliferation, inducing cellular apoptosis and inhibiting tumor invasion in different tumor cell types [8]. In addition, these inhibitors have synergistic effects when used in combination with existing therapies, such as chemotherapy, radiotherapy and photodynamic [8,9], although these effects are not always associated with COX-2 inhibition [10]. However, chronic intake of selective COX-2 inhibitors revealed serious side effects, including increased risk of myocardial infarction [11,12], renal dysfunction [13], or gastrointestinal ulcers [14]. These deleterious effects have prompted the use of alternative therapeutic protocols using reduced doses of COX-2 inhibitors to allow prolonged administration of these compounds while obtaining similar anti-tumor effects. In this context, combination of natural and synthetic anti-inflammatory drugs was suggested as an improved anti-tumor strategy compared to administration of single treatments [15,16].

Many natural compounds were identified as having anti-inflammatory effects [17] and some of these compounds inhibit expression of COX-2 or other pro-inflammatory protein at transcriptional or post-transcriptional levels [18]. Curcumin, a polyphenol from *Curcuma longa*, possesses such properties and is

Abbreviations: IL-1β, interleukin-1β; NFκB, nuclear factor-kappa B; TNFα, tumor necrosis factor α; COX, cyclooxygenase; DMC, 2,5-dimethyl-celecoxib.

Conflicts of interest: none.

Grant sponsor: Action Lions "Vaincre le Cancer"; Grant sponsor: "Recherche Cancer et Sang" Foundation; Grant sponsor: "Recherches Scientifiques Luxembourg" association; Grant sponsor: "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association; Grant sponsor: Action Lions "Vaincre le Cancer" association; Grant sponsor: Télévie Luxembourg; Grant sponsor: National Research Foundation (NRF); Grant sponsor: MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC); Grant number: 2012-0001184

*Correspondence to: Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 151-742, Korea.

Received 23 October 2013; Revised 2 April 2014; Accepted 2 April 2014

DOI 10.1002/mc.22169

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2014 WILEY PERIODICALS, INC.

widely used in traditional Chinese or Ayurvedic medicines [19–23]. Curcumin has beneficial effects in cancer chemoprevention and cancer treatment [24,25] through the inhibition of cell cycle progression mainly at G2/M transition followed by induction of apoptosis [26–28]. From our previous studies, it appeared that curcumin mediated this effect through several mechanisms, including NF-κB inhibition [29], induction of heat shock response [30], inhibition of Janus kinase/signal transducer and activator of Transcription (JAK/STAT) pathway [31], or by down-regulation of glutathione *S*-transferase (GST) P1 in chronic myeloid leukemia K562 cells [32]. Furthermore, curcumin treatment inhibits Wnt/β-catenin signaling in PC3 and LNCAP prostate cancer cells [33,34]. Altogether, these studies suggest multifactorial growth inhibitory effects of curcumin.

Recently, it was shown that curcumin could potentiate the pro-apoptotic or anti-proliferative effects of other anti-inflammatory drugs, such as COX-2 inhibitors, in several cell types [15,35]. The mechanisms implicated in this sensitization remain poorly elucidated. Besides the ability of curcumin to control COX-2 expression [15,35], further modulatory events may be implicated, such as the inhibition of NF-κB signaling [26] and the expression of its downstream targets, such as anti-apoptotic Bcl-2 or Bcl-xL proteins [36]. Although the effect of combination treatment of curcumin with COX-2 inhibitors has been extensively studied in most solid tumors, only scarce information are available on the effects on hematologic malignancies.

Previously, we observed that the COX-2 inhibitor celecoxib could inhibit the proliferation of hematologic cancer cells leading to an accumulation of cells in G0/G1, independently of COX-2. This effect was due to an impairment of G1/S transition and was accompanied by modulation of cell cycle regulators implicated in this step of the cell cycle including down-regulation of PCNA (proliferating cell nuclear antigen), cyclin D1, c-Myc and up-regulation of p27 [37].

Here, we investigate the effects of a combination treatment of celecoxib with curcumin on a panel of hematopoietic cancer cell lines. As expected, curcumin treatment alone leads to accumulation in G2/M, reduces proliferation and triggers apoptosis in all hematologic tumor cell types; however, celecoxib pretreatment confers resistance against curcumin-induced apoptosis in the selected acute myeloid leukemia U937 cell model.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Reagents

U937 (human histiocytic lymphoma), Jurkat (acute lymphoid leukemic T cells), K562 (chronic myeloid leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma), and Hel (human megakaryocytic acute myeloid leukemia) cell lines were obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Bio-Whittaker) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS; Lonza, Verviers, Belgium), 1% (v/v) antibiotic–antimycotic solution (Lonza) and 2 mM L-glutamine (Lonza) in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2. The experiments were carried out using cells in the logarithmic phase of growth and with culture medium containing 10% FCS. Celecoxib was purchased from Merck (Leuven, Belgium). Curcumin was provided by Sigma–Aldrich (Bornem, Belgium) and dissolved to 20 mM in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO). 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC) was purchased from Sigma–Aldrich.

Cell Proliferation Assay

Viable cells per milliliter were estimated by counting trypan blue (Lonza)-positive and negative cells. At time 0, cells were seeded at 200 000 cells/mL. The results were confirmed using a Cedex cell counter (Innovatis AG, Howald, Luxembourg).

Cell Cycle Analysis

Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences) following DNA staining with propidium iodide (1 μg/mL, Sigma–Aldrich) and RNAse A (100 μg/mL; Roche, Luxembourg, Luxembourg) in PBS. Events were recorded (10 000 events/sample) using CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA) and data were analyzed with FlowJo 8.8.7 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Bromodeoxyuridine (BrdU) Incorporation Assay

The BrdU incorporation assay was performed according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Briefly, the cells were incubated with 10 μM BrdU ± celecoxib (40 μM) for 24 h. After 24 h, cells were washed in PBS-1X, fixed and permeabilized. Then cells were treated with DNAse to expose incorporated BrDU. Next, cells were labeled with a fluorescent FITC-conjugated antibody against BrdU epitopes for 20 min at room temperature. The amount of BrdU positive cells was estimated by fluorescence microscopy (Olympus, Hamburg, Germany).

May-Grünwald Giemsa histochemical analysis

Cells (2×10^5) were washed twice with PBS, resuspended in PBS and fixed on a glass slide using the cytocentrifuge system (StatSpin, Aartselaar, Belgium). Slides were sequentially incubated in a pure modified May-Grünwald eosin-methylene blue solution (Merck) for 5 minutes in May-Grünwald solution diluted in water (1:5, v/v) and, finally, in Giemsa solution (Merck) diluted in water (1:20, v/v) for 20 min. Slides were washed and observed with an optical microscope (Leica, DM 2000, Lecuit, Luxembourg).

Immunofluorescence Analysis of Histone H3 Phosphorylation

U937 cells were fixed and permeabilized as previously described [37] and immunostained with an antibody recognizing phosphorylated Histone H3 (serine 10) (BD Biosciences) (1:50). After 1 h of incubation at room temperature, cells were washed twice in PBS and incubated with a fluorophore-conjugated anti-mouse secondary antibody (Alexa Fluor 568, Molecular Probes/Invitrogen, Merelbeke, Belgium) for 1 h at room temperature. After two washes with PBS, the cells were analyzed by flow cytometry as described above.

Analysis and Quantification of Apoptosis

The percentage of apoptotic cells was evaluated by counting the number of cells displaying apoptotic features, such as fragmented and condensed [38]. At least 100 cells in at least three random fields were counted by fluorescence microscopy (Leica-DM IRB microscope) after staining with the DNA-specific dye Hoechst 33342 (1 μg/mL, Sigma).

Apoptosis was also estimated as the percentage of cells manifesting loss of mitochondrial membrane potential as previously described [39]. Briefly, 1×10^6 cells were incubated for 20 min at 37°C with 50 nM MitoTracker® Red (MTR, Molecular Probes/Invitrogen). Fluorescence intensity was analyzed by FACS. Events were recorded (10 000 events/sample) using the CellQuest software. Data were further analyzed with the FlowJo 8.8.7 software.

Western Blot Analysis

Protein expression was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE; 10%). 20–40 μg of total protein extract was transferred to PVDF membranes. Then, membranes were blocked for 1 h with 5% non-fat milk in PBS-Tween and then incubated with 0.5–1 μg/mL of the following primary antibodies: overnight for anti-caspase-3, anti-p27, anti-cyclin D1, anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-bio, Boechout, Belgium), anti-caspase-8, anti-caspase-9 (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), and 1 h for anti-β-actin (Sigma–Aldrich). After five washes with PBS-Tween, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. All antibodies were diluted in a PBS-1% Tween solution containing 5% of bovine serum albumin (BSA) or 5% of milk. The protein bands were revealed using the ECL Plus Western Blotting Detection System Kit (GE Healthcare, Rosendaal, The Netherlands). β-actin was used as a loading control. The densitometric analysis of the Western blots was performed with ImageJ 1.43u software (http://rsbweb.nih.gov/ij/; USA), using β-actin for normalization.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Student's *t*-test for unpaired data. *P*-values < 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***) were considered significant.

RESULTS

Curcumin Induces Apoptosis in Hematopoietic Cancer Cell Lines

Hel, Jurkat, K562, Raji, and U937 cells were treated for 24 h with different concentrations of curcumin (2–20 μM) to induce apoptosis to various extents (Figure 1A,B). Hel and U937 were the most sensitive cell lines ($73 \pm 13\%$ and $78.00 \pm 6.24\%$, respectively, at 20 μM) while Raji and K562 cells were the least sensitive to the treatment ($50.60 \pm 19.65\%$ and $45.30 \pm 13.28\%$, respectively, at 40 μM). In U937 cells, induction of apoptosis was confirmed by caspase-3 cleavage at concentrations ≥ 5 μM (Figure 1C). Similarly, we found also that curcumin induces the cleavage of caspase-8 and caspase-9 (Figure 1D). For further mechanistic studies, we selected U937 as a curcumin-sensitive cell line.

Curcumin Induces an Accumulation of Cells in the G2/M

In this study, curcumin induced apoptosis in U937 cells with a timing (24 h) compatible with an alteration of cell cycle progression. Analysis of propidium iodide-stained U937 cells revealed an accumulation of cells in G2/M upon exposure to 10 μM curcumin ($+9.64 \pm 1.58\%$) (Figure 2A). At 20 μM curcumin, number of cells in sub-G1 increased, while the number of cells in all other cell cycle phases decreased, and suggested the induction of apoptosis (Figure 1). May-Grünwald Giemsa (MGG) staining (Figure 2B) revealed that the accumulation of cells in G2/M correlates with the increase of mitotic cells ($+17.33 \pm 5.13\%$) with mainly prophase-like features, confirmed by the analysis of histone H3 phosphorylation (serine 10) by FACS and fluorescence microscopy [40] (Figure 2C).

Next, we performed a more stringent kinetic analysis of curcumin-induced apoptosis compared with cell cycle alterations (from 4 to 24 h). Curcumin (20 μM) induced significant apoptosis as early as 6 h post-treatment (Figure 3A). Estimation of the mitotic index at early time points (4–8 h) by MGG highlighted a significant accumulation of mitotic cells (mainly in prophase) already present after 4 h for all tested concentrations of curcumin (Figure 3B). Results were confirmed by the analysis of histone H3 phosphorylation on serine 10 (at 20 μM, $11.6 \pm 3.13\%$ phospho-H3-positive cells) (Figure 3C). Such modifications were detected prior to a significant accumulation of the cells in the G2/M phase as assessed by PI staining (Figure 3D,E), implying that curcumin had an effect on cells during ongoing mitosis. Moreover, accumulation of mitotic cells was more pronounced

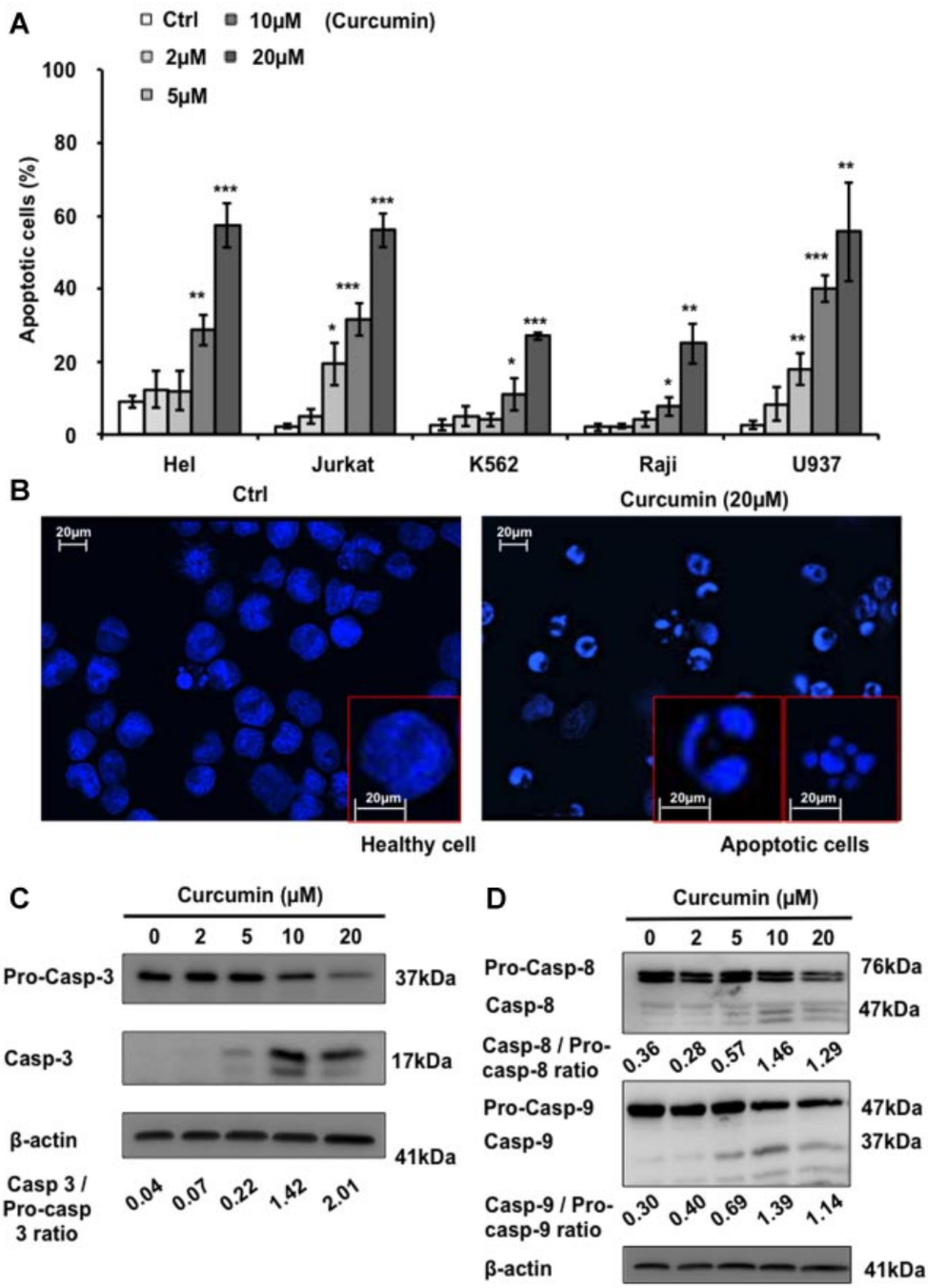


Figure 1. Curcumin induces apoptosis in different hematologic cancer cell lines. (A) Hel, Jurkat, K562, Raji, and U937 cells were seeded at 2×10^5 cells/mL and then treated with 2, 5, 10, or 20 μM of curcumin for 24 h. The percentage of apoptotic cells was estimated by analysis of nuclear morphology. The images corresponding to the Hoechst-stained nuclei of untreated (Ctrl, left) and treated (20 μM of curcumin, right) U937 cells are represented in (B) The apoptotic effect on U937 cells after 24 h of treatment with celecoxib was confirmed by the analysis of (C) caspase-3 and (D) caspase-8 and -9 cleavage by Western blot analysis. The experiments are representative of three independent experiments (±SD). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ compared with controls.

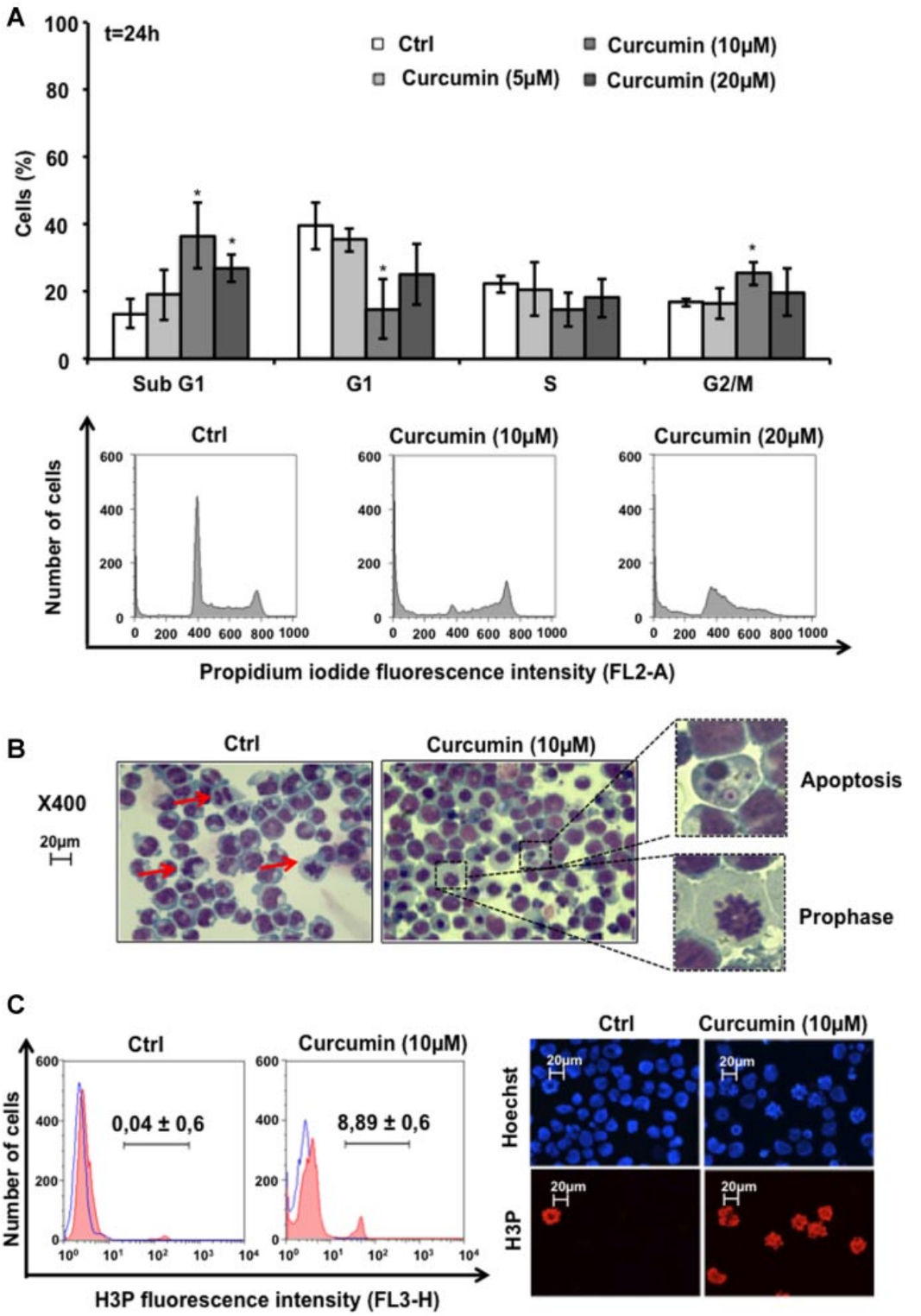


Figure 2. Curcumin induces an accumulation of cells in the G2/M phase of cell cycle. (A) The effect of curcumin on the cell cycle distribution of U937 cells after 24 h was analyzed by propidium iodide staining by flow cytometry. (B) Analysis of mitosis by May-Grünwald Giemsa (MGG) staining performed on U937 cells treated with curcumin (10 µM; 24 h). (C) Detection of histone H3 phosphorylation (serine 10) assessed by flow cytometry and in situ fluorescence analysis. The data represent the mean of three independent experiments (±SD). $^{*}P < 0.05$ compared with controls.

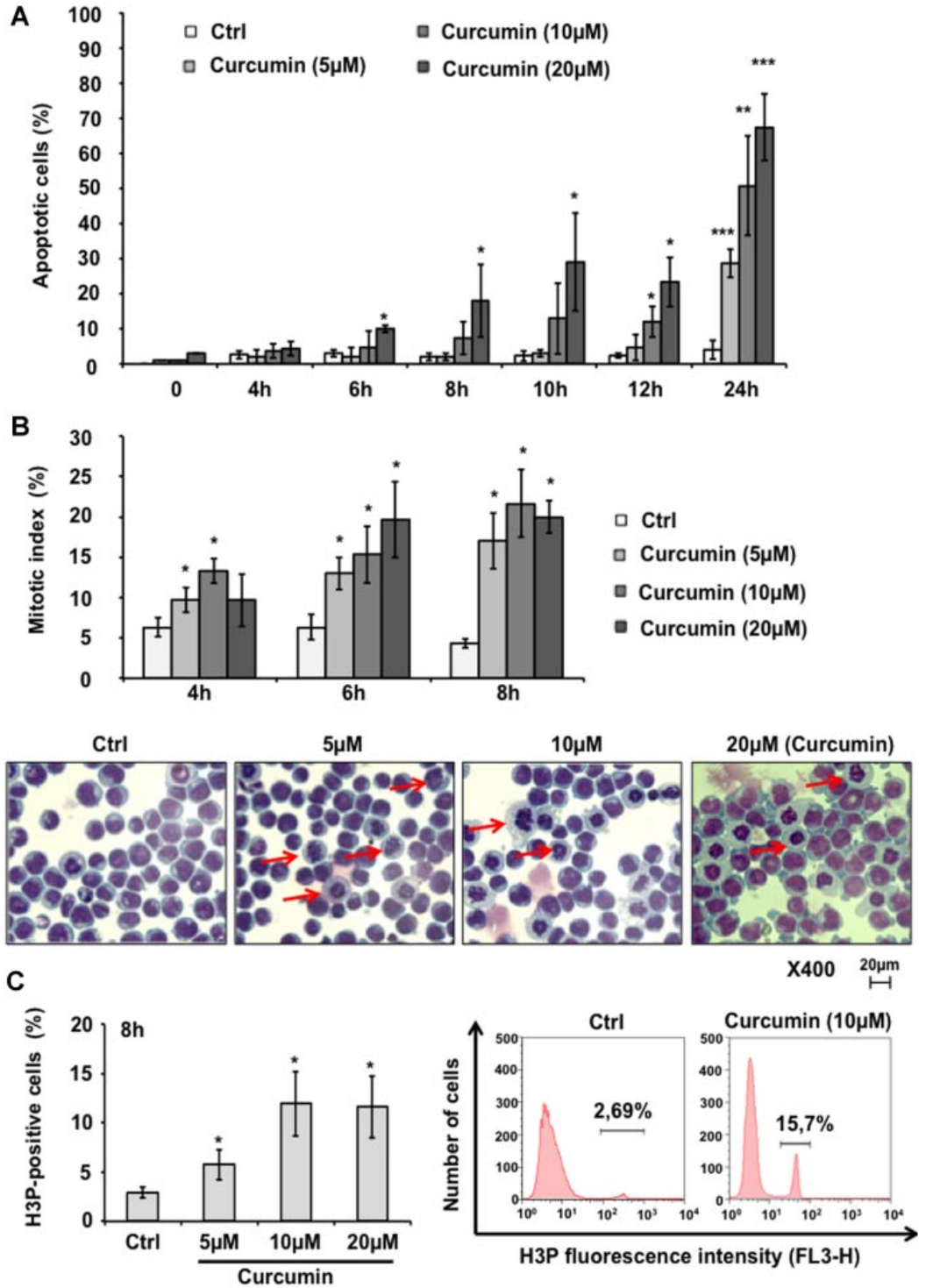


Figure 3. Curcumin induces mitotic alterations prior to apoptosis induction. (A) U937 cells were treated with different doses of curcumin up to 24 h, then at the indicated times, apoptosis was evaluated by nuclear morphology. (B) The percentage of mitotic cells was evaluated at 4, 6, and 8 h treatment with curcumin by MGG staining. (C) At the same time, immunostaining for phospho-histone H3 was performed followed by FACS analysis. Flow cytometric profiles (D) and their quantification (E) of U937 cells upon 4, 6, and 8 h treatment with the indicated concentrations of curcumin (propidium iodide staining). The data represent the mean of three independent experiments (±SD). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ compared with controls.

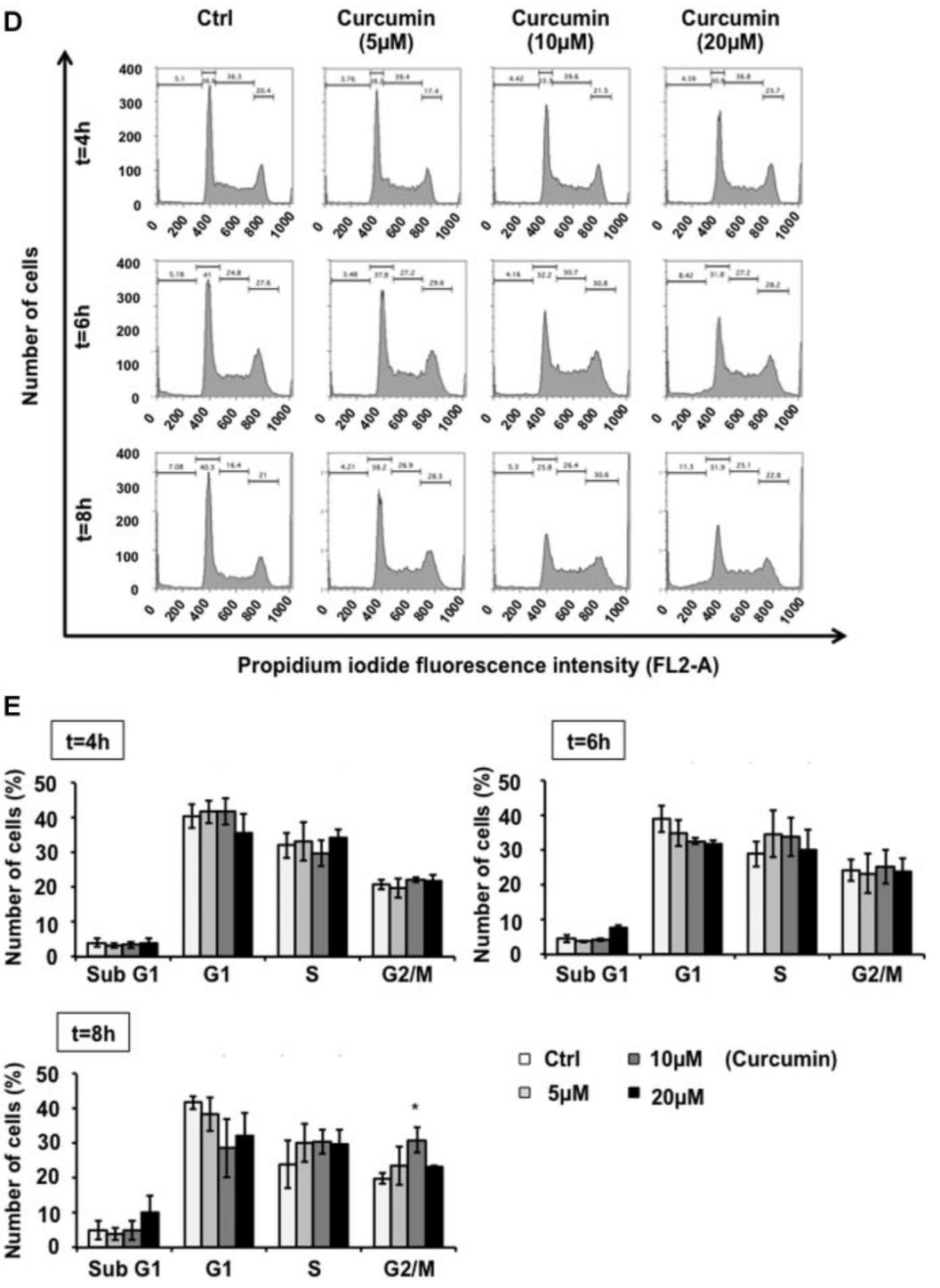


Figure 3. (*Continued*)

than after 24 h when apoptosis was already induced. These findings clearly indicate that curcumin induces early G2/M accumulation by perturbing mitotic progression and that this event occurs prior to apoptosis induction.

Effects of Celecoxib/Curcumin Combination Treatment of U937 Cells

We previously showed that celecoxib induces accumulation of U937 cells in the G0/G1 cell cycle phase [37], whereas at higher concentrations (>40 μM), celecoxib induces apoptosis as observed by accumulation of cells in the sub-G1 phase (Figure 4A,B). Here, we explored the effect of combinations of celecoxib and curcumin on induction of previously observed apoptosis achieved with individual drugs. To address this issue, we pretreated U937 cells for 24 h with non-apoptogenic concentrations of celecoxib (10–40 μM) [37] followed by treatment with 10 μM curcumin. Figure 4C–E shows the effect of this combination on apoptosis, as estimated by nuclear fragmentation, caspase-3, -8, and -9 cleavage and loss of mitochondrial membrane potential. Pretreatment with celecoxib conferred resistance to curcumin-induced apoptosis in a dose-dependent manner. At the highest dose of celecoxib (40 μM), a partial prevention of caspase-3 cleavage could be observed (Figure 4D,). We found that celecoxib prevents cucumin-induced apoptosis at earlier step along the apoptotic pathway, as evidenced

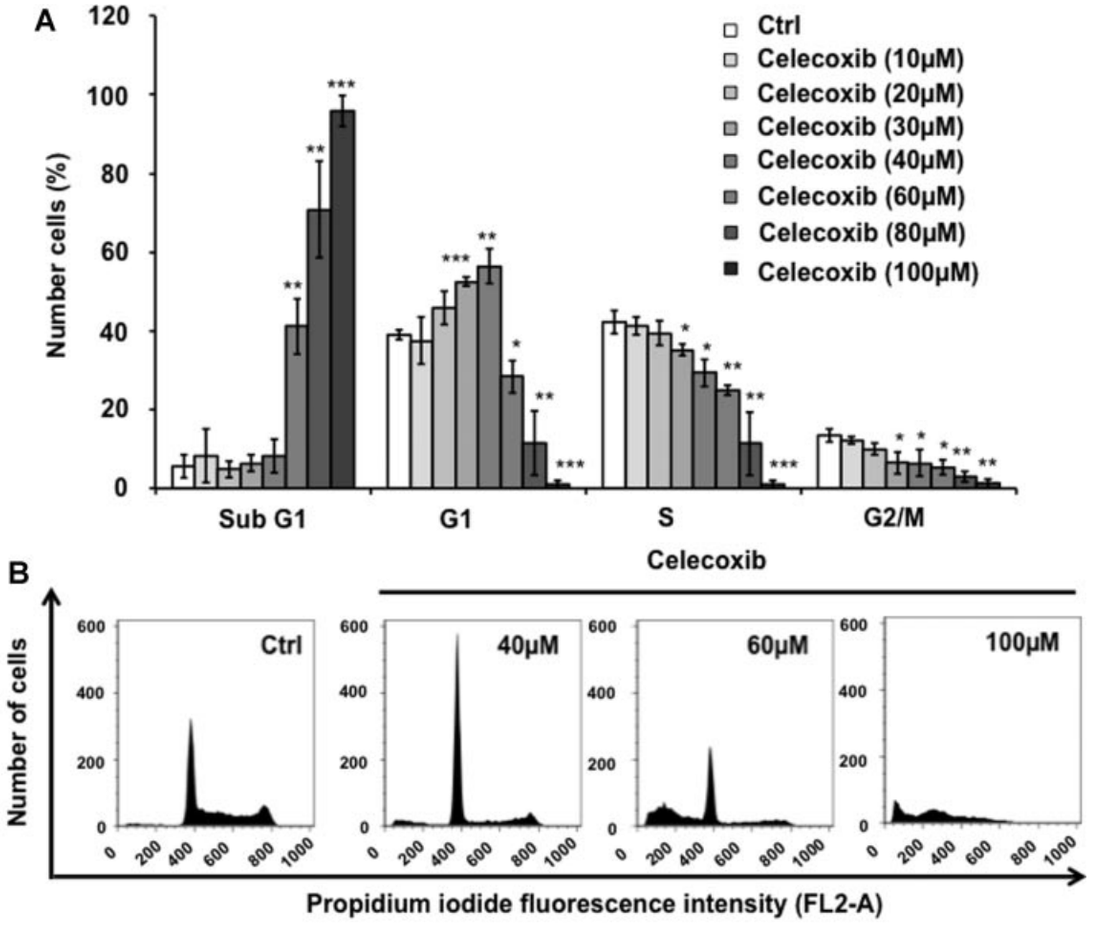


Figure 4. Effect of celecoxib pretreatment or co-treatment on curcumin-induced apoptosis in U937 cells. U937 cells were cultivated in the presence of celecoxib (10–40 μM). After 24 h treatment, the cells were treated with or without 10 μM of curcumin for 24 h. (A) Effect of celecoxib on cell cycle arrest (A: propidium iodide staining; FACS) and apoptosis (B; Hoechst; fluorescence microscope) after 24 h treatment. The data represent the mean of three independent experiments (±SD). $^{*}P < 0.05$ compared with curcumin alone. (C) Effect of celecoxib, curcumin (curcu), or celecoxib/curcumin combination on apoptosis as analyzed by nuclear apoptotic fragmentation (bottom panels). The effect on apoptosis was confirmed by the analysis of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 cleavage by Western blot (D). (E) The effect of this combination on apoptotic pathway was also analyzed by the analysis of mitochondrial membrane potential. (F) U937 cells were treated for 24 h with celecoxib (10–40 μM) and then incubated with 10 μM of curcumin for 48 h; alternatively, cells were co-treated for 24 h (G). Apoptosis was estimated by nuclear apoptotic fragmentation H. U937 cells were treated for 24 h with 2,5-dimethyl-celecoxib (10 μM) and then incubated with 10 μM of curcumin for 24 h. Apoptosis was estimated by nuclear apoptotic fragmentation. The data represent the mean of three independent experiments (±SD). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ compared with controls.

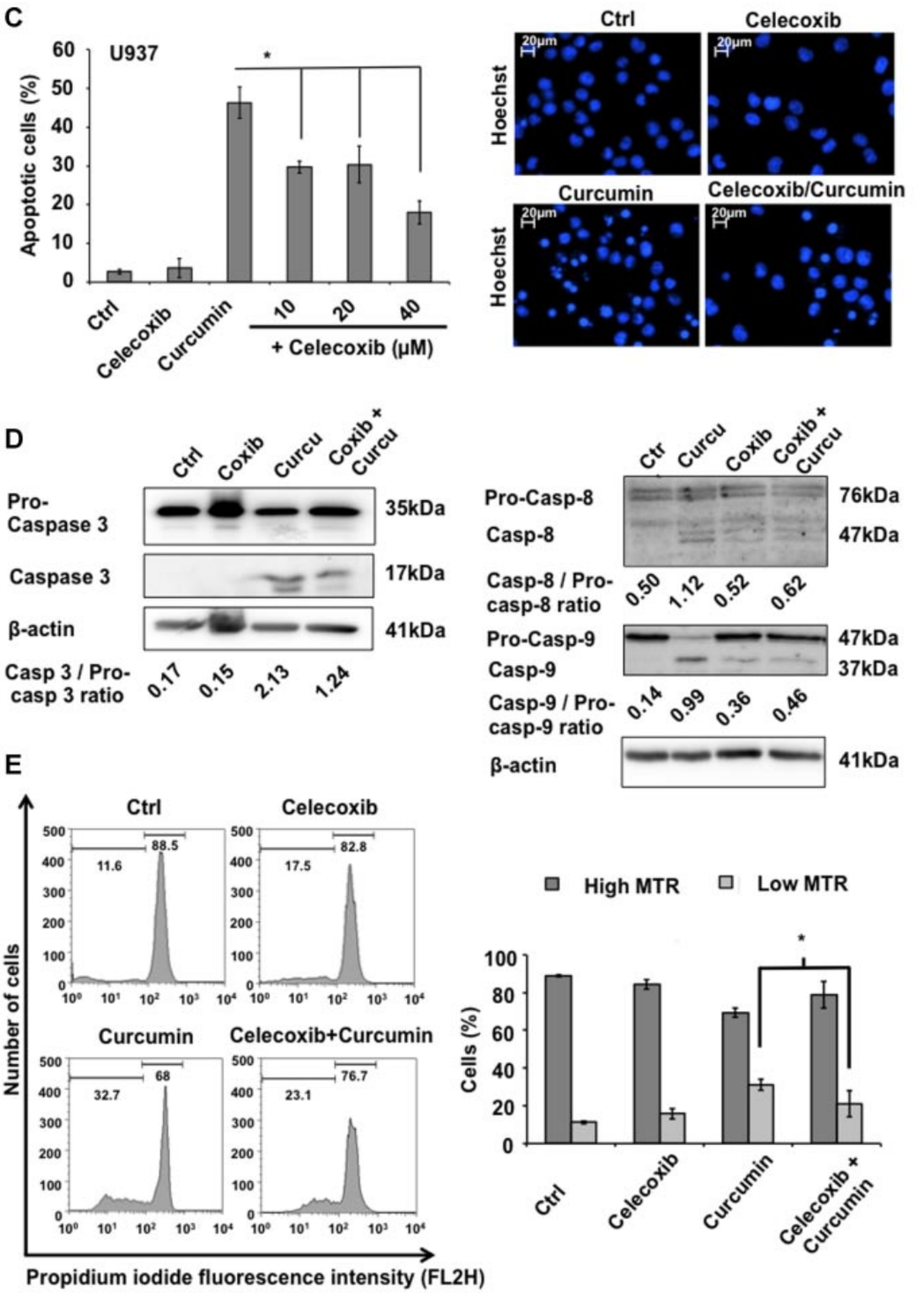


Figure 4. (*Continued*)

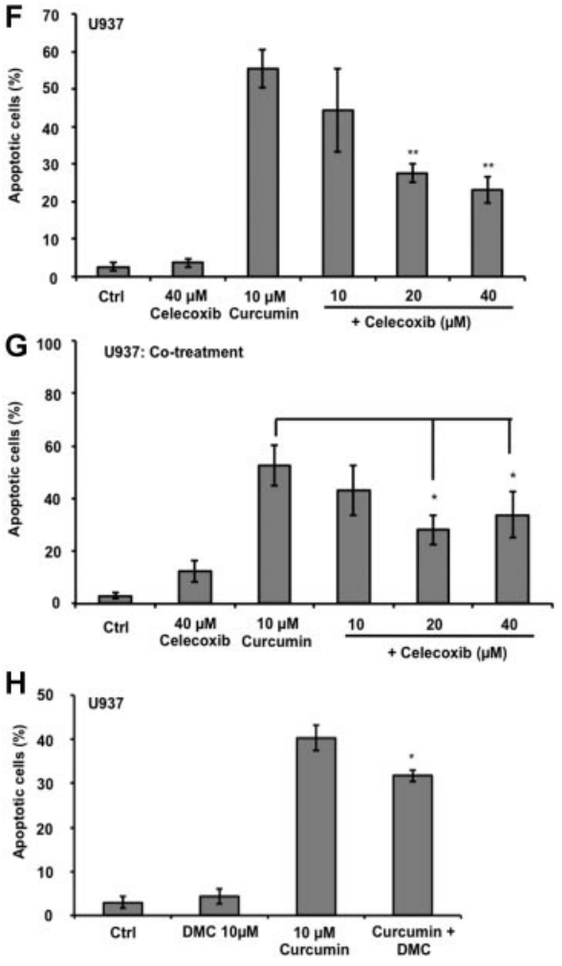


Figure 4. (*Continued*)

by the prevention of caspase-8 and caspase-9 cleavage (Figure 4D, right panel). Moreover, the percentage of protection as measured by mitochondrial membrane potential reached $28.33 \pm 6.81\%$, which is similar to the estimated percentage of accumulation of U937 cells in G0/G1 upon celecoxib treatment ($20.97 \pm 0.55\%$) (Figure 4E). The percentage of protection further increased at longer treatment times ($58.26 \pm 6.61\%$ at 48 h, Figure 4F). Administration of the two compounds concurrently (co-treatment) induced a similar but weaker modulatory effect (Figure 4G). We previously demonstrated that celecoxib could prevent apoptosis induced by different chemotherapeutic agent independently of COX-2 expression [39]. In order to assess, whether the prevention of curcumin-induced apoptosis is a COX-2-dependent effect, we treated U937 cells with 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC), an analog of celecoxib, which lacks COX-2 inhibitory activity [41]. We might use a maximal non-toxic concentration of 10 μM. We found that DMC pretreatment protected against curcumin-induced apoptosis in line with what can be observed with celecoxib at the same concentration (Figure 4H). This effect suggests that celecoxib prevents curcumin-induced apoptosis in a COX-2 independent manner.

As the effect of curcumin on apoptosis is preceded by an accumulation of cells in mitosis, we also analyzed the effect of a combination of the compound on cell cycle distribution (Figure 5A). Following celecoxib or curcumin treatment alone, cells accumulated in G0/G1 or in G2/M, respectively, as described previously. In cells pretreated with celecoxib, however, the curcumin-induced accumulation in G2/M was prevented (Figure 5A). Similarly, accumulation of cells in prophase (Figure 5B) as well as phosphorylation of phospho-histone H3 (Figure 5C) was abrogated, consistent with the observation on cell cycle distribution. Our findings indicate that celecoxib pretreatment counteracts curcumin-induced mitotic accumulation and substantiates a causative role for the mitotic block in curcumin-induced apoptosis.

To further investigate the effect of a co-treatment of celecoxib and curcumin, we pretreated U937 cells for 24 h with a sub-apoptogenic concentration of curcumin (2 μM; see Figure 1) followed by a treatment with celecoxib (10–40 μM) (Figure 6). The effect on cell proliferation and apoptosis was investigated 48 h after the addition of celecoxib. Curcumin alone did not affect the cells. Cell proliferation was mildly affected only when celecoxib was administrated at 20 and 30 μM without significant modulation of apoptosis (Figure 6).

Effect of Celecoxib on Regulators of G1/S Transition and Entry into Mitosis

We previously observed that the accumulation of U937 cells in G0/G1 is a consequence of an impairment of the G1/S transition [37]. Here, we analyzed the expression of three important modulators of the G1/S transition, PCNA, p27, and cyclin D1 (Figure 7A). Our findings show that upon celecoxib treatment an increase of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 could be observed from 20 μM after 24 h. This result suggests up-regulation of p27 as part of the modulatory effect induced by celecoxib on cell cycle. Our data are supported by a reduction of the number of cells in S phase (BrdU positive cells) observed upon celecoxib treatment (Figure 7B), in line with cell cycle analysis (Figure 4A).

DISCUSSION

Curcumin and curcumin analogues have been extensively studied in cancer cell models [21,24,31,33,42–44]. Previous studies have shown that curcumin induces tumor regression through its ability to induce apoptosis, and inhibit cell proliferation and tumor invasiveness [19,32,45]. In this study,

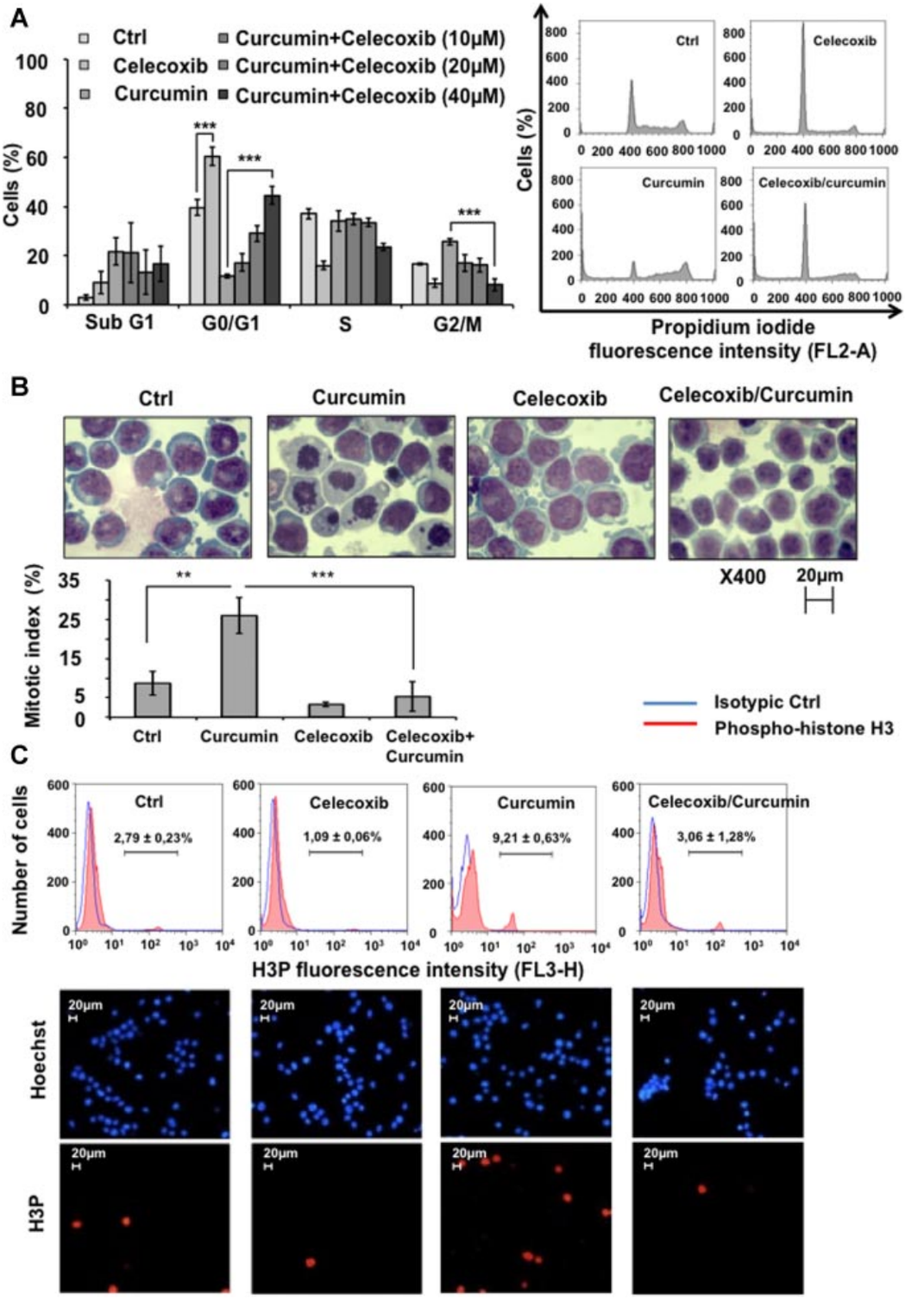


Figure 5. Effect of celecoxib pretreatment on curcumin-induced cell cycle arrest. (A) U937 cells were pre-treated for 24 h with celecoxib (10–40 μM) and then with 10 μM of curcumin for up to 24 h. The effect of celecoxib, curcumin, or celecoxib/curcumin combination on cell cycle distribution was analyzed by propidium iodide staining and FACS. (B, C) The effect of combined treatment on mitosis in U937 cells was also investigated by MGG staining, and analysis of phospho-histone H3 by FACS and fluorescence microscopy. The data represent the mean of three independent experiments (mean ± SD). For phospho-histone H3 analysis, a significant difference ($^{***}P < 0.001$) was observed between the control and curcumin treatment alone groups and between curcumin alone and celecoxib/curcumin groups ($^{***}P < 0.001$).

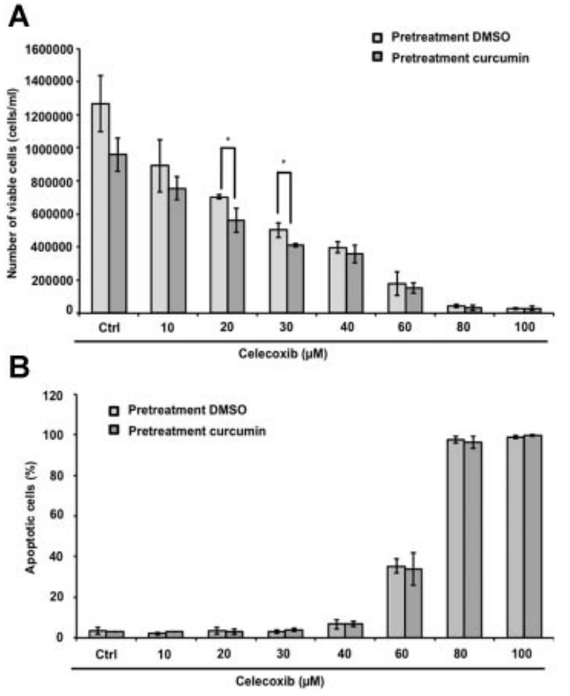


Figure 6. Effect of curcumin pretreatment on celecoxib-induced cell growth inhibition. U937 cells were cultured in the presence of curcumin (2 μM). After 24 h, the cells were treated or not with 10–40 μM of celecoxib for 48 h. The effect of celecoxib, curcumin or celecoxib/curcumin combination on cell growth was analyzed by the Trypan blue exclusion assay (A). The effect on apoptosis was analyzed by nuclear morphology (B). The data represent the mean of three independent experiments (±SD).

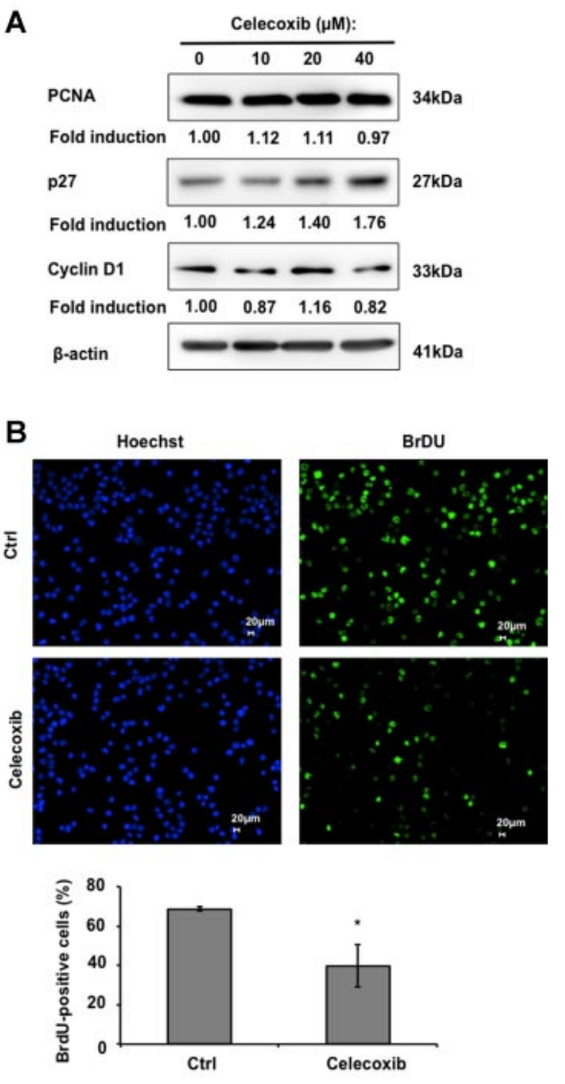


Figure 7. Effect of celecoxib on G1/S transition. (A) U937 cells were treated for 24 h with celecoxib (10–40 μM). Then, cells were harvested for western blot analysis of the expression of PCNA, p27 and cyclin D1. (B) Percentage of BrdU positive cells was evaluated by fluorescence microscopy on U937 cells treated 24 h with celecoxib (40 μM). The data represent the mean of three independent experiments (±SD). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ compared with controls.

curcumin treatment induced apoptosis in different hematologic cell lines. U937 cells appeared most sensitive to curcumin treatment and were used for further investigation. Following curcumin treatment, we observed accumulation of U937 cells in prophase and G2/M cell cycle phase. Accumulation of cells in mitosis occurred before the induction of apoptosis and disappeared concomitantly with the accumulation of apoptotic cells. This suggests that the mitotic arrest is causative of cell death. Interestingly, despite a detectable increase in the number of mitotic cells after 4–6 h of curcumin treatment, no accumulation of cells in the G2/M phase was observed at the same time points (Figure 3A,B). Results suggest that curcumin may act rapidly on cells committed to mitosis in a timeframe, however, that is not long enough for a consistent number of cells to reach the step of mitosis affected by curcumin. For example, accumulation in G2/M was observed only after 8 h of treatment.

Previous studies have shown that the accumulation in G2/M and the pro-apoptotic effects of curcumin are conserved in many cell types associated with the modulation of cell cycle molecules that play an important role in the G2/M transition, such as cyclin B1 [46]. Moreover, curcumin can inhibit proliferative/survival pathways such as Wnt/β-catenin [47] or NF-κB [26,29] or detoxification enzymes such as GSTP1 [32,48]. In this study, there was an accumulation of mitotic cells specifically in prophase, suggesting a modulation of chromosome segregation. Curcumin induces mitotic spindle defects in bladder cancer cell lines [49], leading to an inhibition of the G2/M transition. In this model, curcumin inhibits the activity and expression of Aurora kinase A, which is important for chromosome segregation [50]. Interestingly, Aurora kinase A directly phosphorylates histone H3 on serine 10 [51], which is important for the induction of early prophase and permits the

completion of cytokinesis [52]. In this previous study, inhibition of histone H3 phosphorylation was observed. In contrast, we observed an increased histone H3 phosphorylation in U937 cells treated with curcumin suggesting a role for other proteins or downstream events implicated in the prophase/metaphase transition. For example, in other studies, the accumulation of cells in G2/M induced by curcumin was associated with an induction of mitotic catastrophe [53], which corresponds to an alteration of mitosis, which can lead to apoptosis. This phenomenon implicates proteins important for mitotic checkpoints [54]. Recently, the induction of mitotic catastrophe by curcumin was reported in a model of chronic myeloid leukemia [55], where an alteration of the chromosomal passenger complex was observed. Our findings, together with published data, suggest that curcumin induces an alteration in mitotic progression that leads to apoptosis induction.

The beneficial effects of COX-2 inhibitors have been intensively highlighted in recent years. The ability of these compounds to slow the cell cycle, induce apoptosis or inhibit tumor progression has been described for many cancer cell types, including solid tumors (colon, breast, and lung cancer) and hematologic malignancies [8]. These beneficial effects encouraged efforts to combine these molecules with existing therapies, such as chemotherapy, radiotherapy or photodynamic therapy [8] to increase their efficacy [8], and demonstrated synergistic/additive effects in several cell models. However, the side effects associated with prolonged administration of these inhibitors limits their use in the clinics. As an alternative approach, it has been recently proposed that a combination of natural and synthetic anti-inflammatory drugs might induce more efficacious anti-tumor properties at doses lower than those of the individual compounds. In this context, the combination of curcumin and COX-2 inhibitors displays better anti-tumor effects than each compound singly [56–58]. However, most published data concerns solid tumors but not hematological malignancies. Here, we investigated the effect of curcumin and celecoxib combination treatment in a leukemic cell line. The pretreatment of U937 cells with celecoxib before curcumin or co-treatment with celecoxib/curcumin rendered the cells resistant to curcumin-induced apoptosis. We also observed that celecoxib prevented the curcumin-induced accumulation of cells in the G2/M cell cycle phase. This effect might explain the resistance to curcumin-induced apoptosis. Recently, we demonstrated that an accumulation of cells in the G0/G1 cell cycle phase followed treatment of U937 cells with celecoxib [37]. This effect was associated with a reduced number of cells in the other phases of the cell cycle and was not followed by an induction of apoptosis at concentrations $<40\,\mu M$. Moreover, celecoxib increased the number of Ki-67-negative cells, suggesting that cells enter a quiescent state [37]. Thus, our hypothesis suggests that upon celecoxib treatment, the number of cells reaching mitosis is reduced with a resultant attenuation of the anti-cancer effects of curcumin. The effect of celecoxib on cell cycle can be explained by several mechanisms, including changes in the expression of several cell cycle regulators acting mainly in the G1/S transition, such as p21, p27, retinoblastoma protein and c-Myc [8]. Our findings demonstrated an induction of p27 protein expression. Data are supported by a previous study, where the ability of celecoxib to affect the G1/S transition in U937 cells was correlated to a reduction of c-Myc expression and an induction of p27 [37]. In addition, this study revealed that despite similar effects observed with other COX-2 inhibitors (Nimesulide and NS-398), their ability to affect cell cycle was COX-2-independent. In this study, the pretreatment of U937 cells with DMC (an analog of celecoxib lacking COX-2 inhibitory property) protected also cells from curcumin-induced apoptosis, thus suggesting a COX-2 independent effect. Overall, previous and present data suggest that celecoxib counteracts curcumin-induced apoptosis through an inhibition of cell proliferation and an accumulation of the cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. A similar effect might be observed with curcumin derivatives, since some of them share the same ability to affect the G2/M transition of cell cycle, such as dehydrozingerone from the rhizome of ginger [59] or bis-1,7-2(hydroxyphenil)-hepta-1,6diene-3,5diore (BDMC-A) [60]. In addition, a similar impact of COX-2 inhibitors, on the ability of other polyphenols such as Ginnalins A-C [61] or diallyl tetrasulfide from garlic [62] to affect cell cycle at the G2/M transition, might be also observed.

In another study, we demonstrated that treatment of U937 cells with COX-2 inhibitors (nimesulide, NS-398, and celecoxib) leads to resistance against chemotherapy-induced apoptosis [39]. The inhibition of apoptosis occurred during the very early steps of apoptotic signaling, prior to apoptotic commitment. Therefore, the resistance to curcumin-induced apoptosis could also be due to activation of detoxification enzymes or multidrug channels. Interestingly, curcumin induced DNA damage in a colorectal cancer cell model (HCT116) independent of the activation of ATM or ATR kinases [63]. In contrast, in a pancreatic cell model curcumin mediated G2/M arrest by activating ATM or ATR kinases [64], showing a differential effect depending on the cell context. For this reason, the implication of these kinases in our system will be considered in further studies.

In summary, we showed that celecoxib and curcumin, two well-known anti-inflammatory compounds, display anti-tumor effects by reducing cell proliferation, affecting cell cycle progression and inducing apoptosis. However, the combination of these molecules prevents the anti-tumor effects of curcumin in U937 cells when celecoxib is

administrated as a pretreatment or as a co-treatment. We demonstrated that these drugs act differently on cell cycle progression and this difference may explain why pretreatment with celecoxib leads to curcumin resistance. Therefore, although the two molecules used singly display attractive anti-tumor properties, the combination of these molecules should be considered with caution.

ACKNOWLEDGMENTS

C.S. was recipient of doctoral Télévie grants. C.C. is supported by a "Waxweiler grant for cancer prevention research" from the Action Lions "Vaincre le Cancer". Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" Foundation, by the "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, by "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action Lions "Vaincre le Cancer" association and by Télévie Luxembourg. M.D. is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [grant number 2012-0001184].

REFERENCES

1. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? Lancet 2001;357:539–545.
2. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 2002;420:860–867.
3. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: The enemy within. Cancer Cell 2004;6:203–208.
4. Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Mor G. Inflammation, cancer and chemoresistance: Taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. Am J Reprod Immunol 2007;57:93–107.
5. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. Faseb J 1998;12:1063–1073.
6. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. Genome Biol 2004;5:241.
7. Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:1654–1661.
8. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. Int J Cell Biol 2010;2010:215158.
9. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. J Cell Physiol 2002;190:279–286.
10. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. Faseb J 2001;15:2057–2072.
11. Steffel J, Luscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC. Cyclooxygenase-2 inhibition and coagulation. J Cardiovasc Pharmacol 2006;47: S15–S20.
12. van Staa TP, Smeeth L, Persson I, Parkinson J, Leufkens HG. What is the harm-benefit ratio of Cox-2 inhibitors? Int J Epidemiol 2008;37:405–413.
13. Whelton A, Fort JG, Puma JA, Normandin D, Bello AE, Verburg KM. Cyclooxygenase-2–specific inhibitors and cardiorenal function: A randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients. Am J Ther 2001;8:85–95.
14. Mat Saad, AZ, Collins N, Lobo MM, O'Connor HJ. Proton pump inhibitors: A survey of prescribing in an Irish general hospital. Int J Clin Pract 2005;59:31–34.
15. Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, et al. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. Clin Cancer Res 2005;11:6738–6744.
16. Adhami VM, Malik A, Zaman N, et al. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo. Clin Cancer Res 2007;13:1611–1619.
17. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer 2003;3:768–780.
18. Cerella C, Sobolewski C, Dicato M, Diederich M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: A promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. Biochem Pharmacol 2010; 80:1801–1815.
19. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Lett 2005;223: 181–190.
20. Teiten MH, Eifes S, Reuter S, Duvoix A, Dicato M, Diederich M. Gene expression profiling related to anti-inflammatory properties of curcumin in K562 leukemia cells. Ann NY Acad Sci 2009;1171:391–398.
21. Teiten MH, Reuter S, Schmucker S, Dicato M, Diederich M. Induction of heat shock response by curcumin in human leukemia cells. Cancer Lett 2009;279:145–154.
22. Kelkel M, Jacob C, Dicato M, Diederich M. Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. Molecules 2010; 15:7035–7074.
23. Teiten MH, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Curcumin-the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. Toxins (Basel) 2010;2:128–162.
24. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. Biochem Pharmacol 2008;76:1340–1351.
25. Reuter S, Schnekenburger M, Cristofanon S, et al. Tumor necrosis factor alpha induces gamma-glutamyltransferase expression via nuclear factor-kappaB in cooperation with Sp1. Biochem Pharmacol 2009;77:397–411.
26. Marin YE, Wall BA, Wang S, et al. Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-kappaB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells. Melanoma Res 2007;17:274–283.
27. Singh M, Singh N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. Mol Cell Biochem 2009;325:107–119.
28. Kim KC, Lee C. Curcumin induces downregulation of E2F4 expression and apoptotic cell death in HCT116 human colon cancer cells; involvement of reactive oxygen species. Korean J Physiol Pharmacol 2010;14:391–397.
29. Reuter S, Charlet J, Juncker T, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. Ann NY Acad Sci 2009;1171:436–447.
30. Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, et al. TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin. Biochem Pharmacol 2006;72:928–940.
31. Blasius R, Reuter S, Henry E, Dicato M, Diederich M. Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells. Biochem Pharmacol 2006; 72:1547–1554.
32. Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, et al. Induction of apoptosis by curcumin: Mediation by glutathione S-transferase P1-1 in hibition. Biochem Pharmacol 2003;66:1475–1483.
33. Teiten MH, Gaascht F, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. Genes Nutr 2010;5:61–74.
34. Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Targeting the wingless signaling pathway with natural compounds as

chemopreventive or chemotherapeutic agents. Curr Pharm Biotechnol 2011;13:245–254.
35. Giladi N, Kazanov D, Shpitz B, Aroch I, Kraus S, Arber N. Curcumin potentiates the pro-apoptotic effects of sulindac sulfone in colorectal cancer. Expert Opin Investig Drugs 2010; 19:S117–S124.
36. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. Mol Cancer 2011; 10:12.
37. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Diederich M. Cox-2 inhibitors induce early c-Myc downregulation and lead to expression of differentiation markers in leukemia cells. Cell Cycle 2011;10:2978–2993.
38. Juncker T, Cerella C, Teiten MH, et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. Biochem Pharmacol 2011;81:13–23.
39. Cerella C, Sobolewski C, Chateauvieux S, et al. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. Biochem Pharmacol 2011;82:1277–1290.
40. Cerella C, Dicato M, Jacob C, Diederich M. Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds. Anticancer Agents Med Chem 2011;11:267–271.
41. Schonthal AH. Antitumor properties of dimethyl-celecoxib, a derivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2: Implications for glioma therapy. Neurosurg Focus 2006;20: E21.
42. Blasius R, Dicato M, Diederich M. Effect of curcumin treatment on protein phosphorylation in K562 cells. Ann NY Acad Sci 2007;1095:377–387.
43. Yadav B, Taurin S, Rosengren RJ, et al. Synthesis and cytotoxic potential of heterocyclic cyclohexanone analogues of curcumin. Bioorg Med Chem 2010;18:6701–6707.
44. Azmi AS, Ali S, Banerjee S, et al. Network modeling of CDF treated pancreatic cancer cells reveals a novel c-myc-p73 dependent apoptotic mechanism. Am J Transl Res 2011;3: 374–382.
45. Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M, et al. Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. Ann NY Acad Sci 2003;1010:389–392.
46. Lee DS, Lee MK, Kim JH. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. Anticancer Res 2009;29:5039–5044.
47. Teiten MH, Gaascht F, Cronauer M, Henry E, Dicato M, Diederich M. Anti-proliferative potential of curcumin in androgen-dependent prostate cancer cells occurs through modulation of the Wingless signaling pathway. Int J Oncol 2011;38:603–611.
48. Blasius R, Duvoix A, Morceau F, et al. Curcumin stability and its effect on glutathione S-transferase P1-1 mRNA expression in K562 cells. Ann NY Acad Sci 2004;1030:442–448.
49. Liu HS, Ke CS, Cheng HC, Huang CY, Su CL. Curcumin-induced mitotic spindle defect and cell cycle arrest in human bladder cancer cells is partly through inhibition of Aurora-A. Mol Pharmacol 2011;80:638–646.
50. Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: Role in cell transformation and tumorigenesis. Cancer Metastasis Rev 2003;22:451–464.
51. Perez Fidalgo JA, Roda D, Rosello S, Rodriguez-Braun E, Cervantes A, Aurora kinase inhibitors: A new class of drugs targeting the regulatory mitotic system. Clin Transl Oncol 2009;11:787–798.
52. Song L, Li D, Liu R, Zhou H, Chen J, Huang X. Ser-10 phosphorylated histone H3 is involved in cytokinesis as a chromosomal passenger. Cell Biol Int 2007;31:1184–1190.
53. Dempe JS, Pfeiffer E, Grimm AS, Metzler M. Metabolism of curcumin and induction of mitotic catastrophe in human cancer cells. Mol Nutr Food Res 2008;52:1074–1081.
54. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: A mechanism for avoiding genomic instability. Nat Rev Mol Cell Biol 2011;12:385–392.
55. Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, et al. Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. Mol Cancer Res 2006;4:457–469.
56. Lev-Ari S, Zinger H, Kazanov D, et al. Curcumin synergistically potentiates the growth inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in pancreatic adenocarcinoma cells. Biomed Pharmacother 2005;59:S276–S280.
57. Shpitz B, Giladi N, Sagiv E, et al. Celecoxib and curcumin additively inhibit the growth of colorectal cancer in a rat model. Digestion 2006;74:140–144.
58. Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. Nutr Cancer 2010;62:919–930.
59. Yogosawa S, Yamada Y, Yasuda S, Sun Q, Takizawa K, Sakai T. Dehydrozingerone, a structural analogue of curcumin, induces cell-cycle arrest at the G2/M phase and accumulates intracellular ROS in HT-29 human colon cancer cells. J Nat Prod 2012;75:2088–2093.
60. Kumaravel M, Sankar P, Rukkumani R. Antiproliferative effect of an analog of curcumin bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione in human breast cancer cells. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012;16:1900–1907.
61. Gonzalez-Sarrias A, Ma H, Edmonds ME, Seeram NP. Maple polyphenols, ginnalins A-C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. Food Chem 2013;136:636–642.
62. Kelkel M, Cerella C, Mack F, et al. ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis. Carcinogenesis 2012;33:2162–2171.
63. Lu JJ, Cai YJ, Ding J. Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells. Mol Cell Biochem 2011;354:247–252.
64. Sahu RP, Batra S, Srivastava SK. Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. Br J Cancer 2009;100:1425–1433.

Biochemical Pharmacology 82 (2011) 1253–1255

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Editorial

Integrated cellular pathology—Systems biology of human diseases

Systems biology is an evolving field of multidisciplinary science that enables the characterization of the interactions between the various components of complex biological systems (e.g., cell cycle, proliferation, differentiation, death regulator, etc.) to provide the means to study cellular process in a holistic and integrated manner. This approach involves a variety of 'omics' disciplines including genomics, epigenomics, proteomics, metabolomics and signalomics that can be integrated using computational simulations to elaborate on mathematically predictive models of the molecular interaction networks occurring within the various systems.

The 9th international meeting in the field of signal transduction and gene expression, "Cell Signalomics 2011 – Integrated cellular pathology – Systems biology of human disease", took place January 26–29th at the New European Conference Center in Luxembourg. This meeting gathered 350 participants and outstanding speakers who shared their most recent findings. Fundamental mechanisms related to cell death, epigenetics, immunology, transcriptional control, proteomics and signaling networks involved in human disease states as well as translational applications were discussed during the meeting.

The interface between experimental biology and computational biology was highlighted as a means to enhance knowledge related to systems biology and the mechanisms of disease pathology. Systems biology approaches have already proved useful in diabetes, multiple types of cancer and AIDS. Nonetheless, experimental biology remains a key pillar in biomedical release and this was elegantly demonstrated in the keynote session. Indeed, the first presentation by Professor Mario Capecchi reinforced the critical role of animal models to study and understand the molecular and cellular mechanisms involved in human disease states. In providing examples of genetically modified mice, Professor Capecchi highlighted the link between gene mutations, neuropsychiatric disorders and behavioral phenotypes. As illustrated by the correlation between the *Hoxb*-8 gene mutation in mice and excessive and unrestrained grooming.

Several presentations focused on the process of cell death, specifically apoptosis and autophagy, and also highlighted aspects of cell differentiation. A common approach to initiate cancer cell death is the activation of apoptotic pathways, a process frequently altered in cancer cells. Advancements in knowledge in this field provide the means to identify new approaches to anticancer drug development such as targeting of the *Frizzled* pathway and CD95 signaling. Drug-induced apoptosis can, however, lead to severe side effects in cancer patients. One example, illustrated by Dr. Stefania Gonfloni, is the infertility resulting from apoptosis in oocytes, an effect observed after cisplatin-induced DNA damage. This was linked to an increase in *Abl* proto-oncogene expression by p63, which codes for the tyrosine kinase, *Bcr-Abl*. Imatinib, an inhibitor of *Bcr-Abl* is used for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). Imatinib can counteract cisplatin-induced oocyte apoptosis, which preserves fertility, suggesting its use as fertoprotective adjuvants for female patients treated with chemotherapeutics.

The control of apoptosis is also critical in AIDS. The presentation by Dr. Marie-Lise Gougeon concerned the ability of the HIV-1 retrovirus to subvert dendritic cell (DC) signaling pathways to promote viral replication and dissemination. The idea behind this study was that the DCs infected by HIV are resistant to TRAIL-induced apoptosis mediated by natural killer cells (NKs), an antiviral strategy developed by the immune system to rapidly eliminate infected DCs that act as HIV reservoirs. The high-mobility group box 1 (HMGB1) protein, located on NK–DC synapses, was identified as an essential effector of DC resistance to NK-dependent apoptosis. Indeed, HMGB1 is responsible for the up-regulation of the apoptosis inhibitors c-Flip and c-IAP2. Therefore, Dr. Marie-Lise Gougeon, as a strategy to eliminate viral persistence in DCs suggested targeting HMGB1. Other proteins related to the immune system are also important in apoptosis control. For example, SHIP-1 inhibits CD95-induced apoptosis in a T-cell leukemia cell type. Using a yeast two hybrid screening and hORFeome v5.1, a central resource of cloned human open reading frames (ORFs), Miss Claude Condé from Dr. Jacques Piette's Laboratory demonstrated that SHIP-1 interacts with the anti-apoptotic proteins, cIAP-1 and XIAP.

Inflammation plays a critical role in apoptosis and therefore in cancer. Cyclooxygenase-2 (COX-2), an enzyme induced by pro-inflammatory stimuli (e.g., TNFα, IL-1β), is responsible for the metabolism of arachidonic acid and leads to the production of prostaglandins. Pr. Young-Joon Surh showed that prostaglandin 15d-PGJ_2 has anti-inflammatory and cytoprotective activity by inhibiting NF-κB and redox-sensitive transcription factors as well as their regulators, AP-1, Nrf2-Keap1, STAT3 and p53. 15d-PGJ_2 can rescue cancer cells from peroxynitrite- and hydrogen peroxide-induced apoptosis by upregulating Nrf2. Moreover, Pr. Surh reported that 15d-PGJ_2 is also implicated in carcinogenesis by stimulating angiogenesis through the induction of vascular endothelium growth factor. Nowadays, according to the role of COX-2 in carcinogenesis, many COX-2 specific inhibitors as well as Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) have been developed to prevent tumor progression.

Autophagy is another form of cell death. It is a catabolic process characterized by the engulfment of intracellular components inside double membrane vesicles, autophagosomes. Induction of autophagy has been suggested as a novel strategy to treat diseases. However, recent data suggest that autophagy could be considered more as a survival pathway developed by cells to overcome environmental stressors like starvation or oxidation. Pr. Guido Kroemer reported that spermidine- and resveratrol-mediated

0006-2952/$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcp.2011.05.032

prevention of acetylation of many autophagy related proteins can activate these and prolong life span in *C. elegans*. According to Dr. Eileen White, autophagy has also been implicated in cancer chemoresistance. Aggressive cancers bearing activating mutations in the proto-oncogene *Ras* have high basal levels of autophagy with the latter seemingly being required to maintain mitochondrial metabolism and tumorigenesis.

The correlation between the potential protective effects of autophagy and drug resistance in cancer cells was highlighted in studies by Pr. Anna Ivana Scovassi. The presentation demonstrated that 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in HeLa, HCT116 and SW613-B3 cancer cell lines occurred concomitantly with the expression of autophagy-related markers. Similarly, the alkaloid berberine and its analogs also led to the expression of both apoptosis and autophagy markers in the same cells. These results should contribute to the understanding of the cross talk between autophagy and apoptosis in cancer cells.

The session related to epigenetic has been introduced by Dr. François Fuks who underlined the relevance of epigenetic in cancer. As it is known that cancers are associated with a global DNA methylation leading to silencing of tumor suppressor genes, understanding the pathways implicated in such mechanisms should bring novel strategies for cancer treatment. In this context, Dr. Fuks showed that the kinase CK2 can phosphorylate DNA methyltransferase 3a (DNMT3a), leading to an inhibition of its enzymatic activity and thus an inhibition of global DNA methylation. Phosphorylation also inhibits the nuclear translocation of DNMT3a. The second part of the presentation focused on the innovative infinium technology that allows the study of gene methylation. This method based on genome-wide DNA methylation array technology should permit to identify new cellular subgroups in cancer tissues. On the other hand, epigenetic events can affect cell differentiation. Pr. Gerry Melino showed that induction of miR-34a by a carboxy-terminal spliced variant of the tumor suppressor p73 (TAp73) during synaptogenesis leads to a decrease in the number of synapses via effects on synaptotagmin or syntaxin-1A.

Furthermore, the level of histone deacetylase (HDAC) is strongly increased in several cancers. Mr. Michael Bots from Pr. Ricky Johnstone's team, reported the beneficial effects of the HDAC inhibitors, vorinostat and panobinostat, in comparison to chemotherapy in a murin model. As an example, leukemic cells defective in p53, were resistant to chemotherapy but sensitive to HDAC inhibitors. Moreover, HDAC inhibitors treatment displayed less side effects compared to chemotherapy. Together, these findings underlined the importance of modulating epigenetic in treating cancer, as another alternative to chemotherapy. Valproic acid (VPA), the well-known anti-epileptic drug, is also an HDAC inhibitor and has potential anticancer properties. It can inhibit erythroid differentiation as described by Dr. Sébastien Chateauvieux. VPA down-regulated the expression of key transcription factors and erythroid specific genes (e.g., GATA-1, EPO-R, γ-globin) while increasing expression of PU-1, an inhibitor of erythroid differentiation. Conversely, PU-1 activation facilitated myeloid and lymphoid differentiation of hematopoietic stem-progenitor cells suggesting a potential side effect in VPA treatment of cancer patients.

A major challenge in cancer therapy is to develop newer approaches that specifically target cancer cells having minimal effects on normal cells. Dr. Evan T. Keller discussed the use of small RNA or DNA oligonucleotides and aptamers, as therapeutics for the treatment of cancer. Using SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) an anti-invasive aptamer has been developed that can inhibit highly invasive prostate cancer and osteosarcoma cell lines *in vitro* as well as *in vivo*.

Studies focused on understanding neurodegenerative disease especially Alzheimer's disease (AD) represented an important part of the meeting. Amyloid-β plaques are thought to be associated with neuronal death in the cerebral cortex and the hippocampus, an effect that may involve the neurotrophin receptor (p75NTR). Pr. Xin-Fu Zhou showed that deletion of p75NTR in transgenic mice leads to a reduction of amyloid-β production together with an increase in the aggregation of these peptides suggesting that reducing p75NTR may exacerbate AD. As presented by Miss Sophie Losciuto from Pr. Paul Heuschling's laboratory, inflammation may also play a critical role in AD by enhancing neuronal death. Agonists of LXR, a nuclear receptor that can repress pro-inflammatory responses in microglia, down-regulate astrocyte activation via actions on microglia. Thus, indirect activation of astrocytes by LXR agonists can preserve neuronal viability.

The use of natural products for the treatment of AD was also discussed at the meeting. As shown by Miss Chan Lee, the flavone Luteolin, from *Perilla* leaves, can inhibit amyloid-β-mediated oxidative stress induced cell death. Pr. Vittorio Calabrese showed that dietary antioxidants, e.g., polyphenols and L-carnitine, are neuroprotective via the activation of hormetic effectors including vitagenes, a group of genes involved in preserving cellular homeostasis during stressful conditions.

The importance of computational biology in cancer research was underlined through The Cancer Genome Atlas (TCGA) project. Dr. Ilya Shmulevich presented data on integrated analyses of TCGA-derived high throughput experimental data sets that are designed to identify mechanisms for the regulation of gene expression, to differentiate the transcriptional profiles of different cancer cell types and to identify molecules that target members of the identified networks as potential starting points for therapeutics. Comparison of cancer-associated features of several cancer types is also feasible using the TCGA.

Understanding systems biology is fundamental in elucidating mechanisms of pathophysiology and in identifying novel therapeutic approaches to treat human disease states. The meeting in Luxembourg provided an excellent overview of the status of cutting-edge research in diseases like cancer, neurodegeneration and AIDS. As such diseases are multifactorial in their etiology, combination therapy seems an inevitable to address complex pathologies. Clarification of the mechanisms implicated in the side effects of existing therapies will be important in selecting the best targets and best compounds to treat patients.

Next meetings

Redox regulation – Natural compounds as regulators of inflammation signaling

(A RedCat – satellite meeting to Natural Compounds 2012) – January 24–26, 2012

Natural compounds 2012 – Regulators of cell signaling pathways and novel therapeutic tools – January 26–28, 2012

Under the patronage of Corena, a network aiming to create an internationally competitive cluster within the Greater Region (Saarland, Lorraine, Luxembourg, Wallonia, Rheinland-Pfalz). Corena is co-funded by European Regional development fund within the INTERREG IVA Greater Region program. The European Union invests in your future.

Meeting information: http://www.transduction-meeting.lu

Acknowledgements

We would like to thank "Recherches Scientifiques Luxembourg asbl" who organized the meeting. The Fonds National de la Recherche, Luxembourg, Kuwait Petroleum SA, The City of Luxembourg, The Fondation de Recherche "Cancer et Sang",

Computer Home and Canon are thanked for additional support. Finally all members of the organization team are thanked for their great organization.

Cyril Sobolewski
Elodie Viry
Noémie Legrand
Florian Muller
Franck Morceau
Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

*Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060
E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

Available online 16 June 2011

RESUME

Les glycosides cardiaques (GCs) sont utilisés en clinique pour traiter des maladies cardiaques. Récemment de nombreuses études ont également démontré leur potentiel anti-cancéreux. Bien qu'il soit connu que le pompe (Na^+/K^+)-ATPase (NKA) soit une cible des GCs, la voie par laquelle ces composés induisent leurs effets anti-cancéreux est peu décrite. L'UNBS1450 est un cardénolide hémi-synthétique dérivé du 2''-oxovoruscharine extrait de la plante *Calotropis procera.* Précédemment nous avons démontré que ce composé induisait une dégradation précoce de Mcl-1, sans effet sur Bcl-2, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Notre hypothèse est que Mcl-1 est une cible ubiquitaire centrale dans les effets induits par les GCs.

Dans la première partie de cette étude, notre analyse des effets de différents GCs sur différentes lignées cellulaires cancéreuses confirme que Mcl-1 est une cible précoce et ubiquitaire des GCs. De plus, nous montrons que Mcl-1 et la seule protéine anti-apoptotique majeure rapidement et ubiquitairement diminuée. Nous avons observé que cette diminution est liée à un mécanisme impliquant la stabilité protéique et le protéasome. En surexprimant une protéine Mcl-1 non-ubiquitinable ou en inhibant le protéasome, nous avons inhibé l'apoptose induite par l'UNBS1450.

Dans la seconde partie, nous avons étudié le lien entre les effets modulatoires de GCs et leur interaction avec NKA. Nous avons montré que la voie ionique n'est pas impliquée, au contraire de la voie non-ionique, qui semble impliquer Src, du moins pour l'UNBS1450. La déplétion du cholestérol, modifiant l'interaction Src/NKA, tout comme un inhibiteur de Src, inhibent les effets de l'UNBS1450. Ces effets ne sont pas observés pour l'ouabaïne ou de fortes concentrations de l'UNBS1450, supposant que ce dernier induit ses effets induisant une autre voie, impliquée à faibles concentrations.

Dans la troisième partie nous avons analysé les effets de l'UNBS1450 sur c-Myc, et avons montré que cette protéine est aussi diminuée par le traitement, mais au contraire de Mcl-1, son ARNm diminue dans la lignée U937. Se basant sur ces deux protéines et l'induction de l'apoptose, nous avons démontré qu'il faut 8 h pour que l'UNBS1450 induise ses effets de façon irréversible *in vitro*.

Finalement, les premières études épidémiologiques avaient montré une corrélation inverse entre la prise chronique de GCs et le développement de tumeurs malignes dans les cancers du sein. Dans cette partie nous avons testé l'UNBS1450 sur les lignées MCDA-MB-231, MCF-7 et Vcrems et nous y avons démontré un blocage en phase G2. Ces résultats sont encourageants pour de futures études.

L'ensemble de ces résultats démontre le potentiel anti-prolifératif et cytotoxique des GCs, particulièrement l'UNBS1450 sur des cancers de différentes origines. De plus, nous avons identifié Mcl-1 comme une cible ubiquitaire des GCs, avec un rôle-clé dans l'induction de l'apoptose. Cette protéine semble avoir un rôle d'indicateur dans les effets anti-cancéreux des GCs, qui reste cependant à être précisé.

Mots Clefs : Glycoside cardiaques ; UNBS1450 ; Mcl-1 ; Apoptose ; Cancer

ABSTRACT

Cardiac glycosides (CGs) are clinically used against cardiovascular diseases but they also display anti-cancer activities. Despite the well-established cellular target, the sodium/potassium (Na^+/K^+)-ATPase (NKA), the downstream mechanisms responsible for these anti-cancer effects are still poorly elucidated. UNBS1540 is a hemi-synthetic cardenolide derived from 2″-oxovorusharin extracted from *Calotropis procera*. We previously described the ability of this compound to induce an early down-regulation of Mcl-1 without affecting Bcl-2 levels, at nanomolar concentration. Here we hypothesize Mcl-1 as an ubiquitous key factor modulated by CGs.

The first part of this study validated Mcl-1 as a general and early target of CGs, by studying the modulatory effects of different CGs on Mcl-1 and apoptosis in a panel of human cancer cell lines. Our results show that: Mcl-1 is the only major anti-apoptotic Bcl-2 family member that is rapidly and ubiquitously down-regulated. We show the involvement of a mechanism modulating protein stability and requiring the proteasome in the early CG-induced Mcl-1 down-regulation. Strategies preventing UNBS1450-induced Mcl-1 down-regulation, i.e., by overexpression of a mutated non-ubiquitinable Mcl-1 isoform or the use of a proteasome inhibitor, inhibited the compound′s ability to induce apoptosis.

In the second part, we investigated the link between the modulatory effects of CGs and their known interaction with NKA. We provide evidence that the canonical ionic pathway is not implicated in this modulation. In contrast, our findings suggest the involvement of the non-ionic signalosome activity of the pump with the potential involvement of Src, at least for UNBS1450. The depletion of cholesterol, inhibiting the interaction between NKA and Src, as well as a pan-inhibitor of Src abrogated the effects of UNBS1450. These effects were not observed with ouabain. These differential behaviors point at different signaling pathways triggered by these two compounds with UNBS1450, active at lower concentrations than ouabain.

In a third part, we analyzed the inhibition of UNBS1450 on c-Myc mRNA levels in U937 cells. Taking c-Myc, Mcl-1 and apoptosis as major indicators of the anti-cancer activity of UNBS1450, we explored *in vitro* the minimum time of continuous incubation with UNBS1450 required to trigger its anti-cancer effects. We found that times of incubation beyond 8 hours were required to irreversibly induce these modulations.

Early epidemiological studies identified an inverse correlation between the chronic administration of CGs and the incidence of breast cancer. In the final part, we tested any potential of UNBS1450 on human breast cancer cell models (MCF-7, MDA-MB-231, Vcrems). We observed a general ability of this compound to inhibit cell proliferation with an accumulation of the cells in the G2 phase of the cell cycle. These results encourage future investigations on the mechanisms implicated.

Altogether our results point at a potent anti-proliferative and/or cytocidal activity of CGs and especially UNBS1450 on human cancer cell models with different origins. We identified Mcl-1 as a ubiquitous factor, down-regulated by CGs, whose modulation is essential to achieve cell death. Moreover, we suspect this modulation as an indicator of other anti-cancer activities of CGs, so far still to be characterized and potentially contributing to the heterogeneous biological effects ascribed to them.

Key words: Cardiac glycosides; UNBS1450; Mcl-1; Apoptosis; Cancer