



HAL
open science

Effets anticancéreux de UNBS1450 : cas de hémopathies malignes

Tom Juncker

► **To cite this version:**

Tom Juncker. Effets anticancéreux de UNBS1450 : cas de hémopathies malignes. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10127 . tel-01746370

HAL Id: tel-01746370

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746370>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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 (ED 266 - Biologie, Santé, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

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

par **Tom JUNCKER**

Effets anticancéreux de UNBS1450 :

Cas des hémopathies malignes

Soutenance publique prévue pour le 12 Novembre 2010

Président du jury : M. Athanase VISVIKIS

Rapporteurs :	M. Jacques PIETTE	Professeur, Université de Liège, Liège
	Mme. Lina GHIBELLI	Professeur, Università di Roma Tor Vergata, Rome
Examineurs :	Mme. Denyse BAGREL	Professeur, Université Paul Verlaine, Metz
	M. Mario DICATO	Professeur, Centre Hospitalier, Luxembourg
	M. Marc DIEDERICH	Docteur, Hôpital Kirchberg, Luxembourg
	M. Athanase VISVIKIS	Professeur, Université de Nancy I, Nancy
	M. Steve WEITMAN	Executive Management, Unibioscreen, Brussels

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)

Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg – L-2540 Luxembourg

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 :

du Fonds National de la Recherche, Luxembourg
(Aide à la Formation Recherche)

du « Télévie Luxembourg »

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

de l'Association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »

de l'Association « Action Lions “Vaincre le Cancer” »

et

de l'Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner »

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

Remerciements

Après ces 3 années de thèse, j'en viens à remercier les gens qui m'ont soutenu durant ces études et évidemment ceux qui ont participé à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier le Docteur Marc Diederich, sans lequel ce travail n'aurait pas été possible. Je le remercie de m'avoir accepté dans son laboratoire, de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse, d'avoir veillé à ce que le meilleur matériel de travail possible soit mis à disposition, et surtout d'avoir toujours été à mon écoute lors des moments les plus difficiles.

Je remercie le Professeur Mario Dicato, le président de la Fondation Recherche Cancer et Sang, de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail au sein de sa fondation.

Ensuite, je veux remercier de tout cœur toute l'équipe du laboratoire, notamment Claudia, Marie-Hélène, Michael, Jenny, Estelle, Marc, François, Franck et Cindy ainsi que les autres personnes du laboratoire et celles qui l'étaient, notamment Isabelle et Simone, pour leur encouragement, les discussions scientifiques et les moments moins scientifiques que nous avons passés ensemble.

Je remercie en particulier Claudia d'avoir été là, à tout moment et de m'avoir donné des conseils précieux.

Il faut dire que sans les nombreux mots de soutien et d'encouragement de ma copine Jenny, de mes parents et de mes amis, ce travail de thèse aurait été hors de portée !

Merci

RESUME

Les stéroïdes cardiaques sont utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies, y compris des insuffisances cardiaques et de cancer. Le but de ce travail était d'étudier l'activité anti-leucémique de UNBS1450, un cardénolide semi-synthétique appartenant à la famille des glycosides stéroïdes cardiaques, et qui a été démontré d'être doué d'un puissant potentiel inducteur d'autophagie dans les cellules cancéreuses issues de tumeurs solides. Par cette étude, nous démontrons pour la première fois que des concentrations nanomolaires de UNBS1450 exercent un effet pro-apoptotique sur des cellules leucémiques humaines. Par conséquent, nous avons élucidé les mécanismes moléculaires impliqués : nos résultats mettent en évidence une inhibition de la transactivation de NF- κ B et une induction de l'apoptose par clivages des pro-caspases 8,9 et 3/7, en réprimant l'expression de Mcl-1 anti-apoptotique et en recrutant Bak et Bax, deux protéines pro-apoptotiques, aboutissant ainsi à une mort cellulaire apoptotique.

MOTS CLES

UNBS1450, NF- κ B, apoptose, cardénolide, cancer

Anticancer effects of UNBS1450 :
A study on hematological malignancies

ABSTRACT

Cardiac steroids are used to treat various diseases including congestive heart failure and cancer. The aim of this study was to investigate the anti-leukemic activity of UNBS1450, a hemi-synthetic cardenolide belonging to the cardiac steroid glycoside family, known to be a potent autophagy inducer in solid tumor cells. Interestingly, we hereby report for the first time that at low nanomolar concentrations, UNBS1450 induces apoptotic cell death in human leukemia cell lines. Subsequently, we have investigated the molecular mechanisms induced : Our results show that UNBS1450 inhibits NF- κ B transactivation and triggers apoptosis by cleavage of pro-caspases 8, 9 and 3/7, by decreasing the expression of anti-apoptotic Mcl-1 and by recruiting pro-apoptotic Bak and Bax eventually resulting in cell death.

KEYWORDS

UNBS1450; NF- κ B; apoptosis; cardenolide; cancer

Publications liées à cette thèse

Travail original

UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells.

Tom Juncker^{*}, Claudia Cerella^{*}, Marie-Hélène Teiten, Franck Morceau, Marc Schumacher, Jenny Ghelfi, Estelle Henry, Mario Dicato and Marc Diederich. *Biochem Pharmacol.* ACCEPTEE

Revue

UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in prolifération and cell death.

Tom Juncker, Marc Schumacher, Mario Dicato and Marc Diederich. *Biochem Pharmacol.* 2009 Jul 1;78(1):1-10.

Autres publications

Le candidat a participé aux publications suivantes :

Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells.

Reuter S, Charlet J, **Juncker T**, Teiten MH, Dicato M, Diederich M.

Ann N Y Acad Sci. 2009 Aug;1171:436-47.

Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes.

Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, **Juncker T**, Frenzel L, Gottenberg JE, Sibia J, Pfeffer S, Wachsmann D.

J Immunol. 2009 Apr 15;182(8):5088-97.

Editorial

Marc Schumacher, **Tom Juncker**, Michael Schnekenburger, François Gaascht, Marc Diederich

Natural compounds as inflammation inhibitors.

Genes & Nutrition, SOUMIS

Activités scientifiques

Présentations orales :

- ✚ Apoptosis induction by UNBS1450 in different human leukemia cell lines
Rencontre scientifique, Unibioscreen, Bruxelles, Belgique (24 Septembre 2009)

- ✚ Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation
Présentation du type « Journal Club », Université du Luxembourg – Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg (15 Décembre 2009)

- ✚ UNBS1450 induces apoptotic cell death in human leukemia
Rencontre scientifique, Université du Luxembourg – Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg (15 Décembre 2009)

- ✚ The effects of UNBS1450 on NF- κ B and apoptosis in chronic myeloid and T-cell leukemia cell lines
Rencontre scientifique, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg, Luxembourg (22 Février 2010)

- ✚ The effect of UNBS1450 on NF- κ B and apoptosis in human leukemia
Rencontre scientifique, Unibioscreen, Leiden, Pays Bas (24 Août 2010)

Communications par affiche :

- ✚ Le cancer, c'est quoi ?
Tom Juncker, Mario Dicato et Marc Diederich
Rencontre scientifique européenne « Researchers' Night, Luxembourg » (26 septembre 2008)

- ✚ Les effets modulateurs de UNBS1450 sur la prolifération cellulaire et l'activité NF- κ B dans les cellules leucémiques K562 et U937

Tom Juncker, Claudia Cerella, Marie-Hélène Teiten, Marc Schumacher, Jenny Ghelfi, Estelle Henry, Mario Dicato et Marc Diederich

Congrès annuel de la SFBBM (Société française de Biochimie et de Biologie Moléculaire) et 36^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Nancy, France (25-29 Août 2009)

- ✚ Les effets modulateurs de UNBS1450 sur la prolifération cellulaire et l'activité NF-κB dans les cellules leucémiques K562 et U937

Tom Juncker, Claudia Cerella, Marie-Hélène Teiten, Marc Schumacher, Jenny Ghelfi, Estelle Henry, Mario Dicato et Marc Diederich

UGR/UNISALL Young Researchers' Day « Ethics and Philosophy of Science », Université du Saarland, Saarbrücken, Allemagne (19-20 Mars 2010)

- ✚ UNBS1450 induces apoptotic cell death in human leukemia cells

Tom Juncker, Claudia Cerella, Marie-Hélène Teiten, Marc Schumacher, Jenny Ghelfi, Estelle Henry, Mario Dicato et Marc Diederich

Séminaire de CORENA network, « One day seminar on health promoting compounds in plants », Centre de Recherche Publique Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg (7 Mai 2010)

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
1.1. LES MALADIES HEMATOLOGIQUES MALIGNES	2
1.2. CHIMIOETHERAPIE UTILISEE DANS LE TRAITEMENT DES LEUCEMIES ET LYMPHOMES	8
1.3. PREVENIR ET TRAITER LEUCEMIES ET LYMPHOMES PAR LES GLYCOSIDES STEROÏDES CARDIAQUES	16
<i>1.3.1. Les glycosides stéroïdes cardiaques et leurs sources</i>	16
<i>1.3.2. Mécanismes d'action des stéroïdes glycosidiques cardiaques.</i>	23
<i>1.3.3. De nouvelles applications thérapeutiques pour les stéroïdes glycosidiques cardiaques</i>	32
1.4. UNBS1450 : UN NOUVEAU STEROÏDE GLYCOSIDIQUE CARDENOLIDE SEMI-SYNTHETIQUE	33
1.5. LA MORT CELLULAIRE PAR VOIE APOPTOTIQUE, UNE THERAPIE DE CHOIX EN CANCEROLOGIE	37
<i>1.5.1. Introduction à la notion d'apoptose</i>	37
<i>1.5.2. Les voies de signalisations apoptotiques</i>	37
<i>1.5.3. Apoptose et cancérogenèse</i>	40
<i>1.5.4. Une induction de l'apoptose en chimiothérapie</i>	43
1.6. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF-κB : SA VOIE DE SIGNALISATION ET SON IMPORTANCE DANS LE CANCER	51
1.7. INVESTIGATION D'UNE POSSIBLE SENSIBILISATION PAR UNBS1450 DES CELLULES K562 ET U937 A DES AGENTS CYTOSTATIQUES ET CYTOLYTIQUES INTRINSEQUES ET EXTRINSEQUES.	56
1.8. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET LEURS ROLES DANS L'INDUCTION DE L' APOPTOSE PAR UNBS1450	61
<i>1.8.1. Radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène et agents antioxydants</i>	61
<i>1.8.2. La notion de stress oxydant</i>	62
<i>1.8.3. Deux stratégies thérapeutiques anticancéreuses différentes à l'égard d'un stress oxydant</i>	67
<i>1.8.4. Une évaluation d'une possible induction de formation d'ERO par UNBS1450</i>	68
2. OBJECTIFS	70

3. MATERIELS ET METHODES	73
3.1. LIGNEES CELLULAIRES	73
3.2. COMPOSES UTILISES POUR LE TRAITEMENT DES CELLULES	74
3.3. CULTURE CELLULAIRE	75
3.4. EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES	76
3.5. EXTRACTION DES FACTEURS NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES	76
3.6. EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE	76
3.7. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES ET ETUDE DE L'ACTIVITE NF- κ B PAR GENE RAPPORTEUR LUCIFERASE	77
3.8. DOSAGE DE IL-8 PAR UN TEST ELISA EN SANDWICH	78
3.9. ETUDE DE L'ACTIVITE LIANTE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION PAR RETARD DE MIGRATION SUR GEL	78
SONDES NF- κ B	79
SEQUENCE	79
TAILLE (PB)	79
NF- κ B CONSENSUS	79
(s) : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCTCCAGGC-3'	79
23	79
3.10. WESTERN BLOT	81
3.11. ETUDE DE BAK/BAX PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE	84
3.12. ANALYSE DE MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE	86
3.13. EXTRACTION D'ARN TOTAL	86
3.14. RT- PCR	86
3.15. ANALYSE DE GENES RELIES A NF- κ B PAR SUPERARRAY	87
3.16. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	89
4. RESULTATS	90
4.1. EFFET DE UNBS1450 SUR LA VIABILITE DE CELLULES LEUCEMIQUES	90
4.2. UNBS1450 INDUIT UNE MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE DES CELLULES K562 ET U937	91
4.3. UNBS1450 EXERCE UN EFFET CYTOTOXIQUE SPECIFIQUE DES CELLULES TUMORALES	101
4.4. DEFINITION DU MECANISME MOLECULAIRE APOPTOTIQUE MIS EN PLACE PAR UNBS1450	103

4.5. INVESTIGATION DES CONSEQUENCES POSSIBLES D'UNE DEGRADATION UNBS1450-INDUITE DE MCL-1: ANALYSE PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE DE BAX ET DE BAK DANS LES CELLULES LEUCEMIQUES U937	106
4.5.1. Détection et localisation de Bak	106
4.5.2. Détection et localisation de Bax	108
4.6. COMPARAISON DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES ARNm SPECIFIQUES DE LA SOUS-UNITE $\alpha 1$ DE L'ATPASE Na^+/K^+ ENTRE LIGNEES CELLULAIRES LEUCEMIQUES ET CELLULES SANGUINES PERIPHERIQUES SAINES.	111
4.7. UNBS1450 INHIBE SIGNIFICATIVEMENT L'ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NF- κ B INDUITE PAR LE TNF α	113
4.8. ETUDE DE L'IMPACT DE UNBS1450 SUR L'ACTIVITE LIANTE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF- κ B A L'ADN	117
4.9. ETUDE DES EFFETS DE UNBS1450 SUR LA TRANSLOCATION CYTOPLASME-NOYAU DE NF- κ B TNF α -INDUITE	120
4.10. ANALYSE PAR PCR EN TEMPS REEL DES EFFETS DE UNBS1450 SUR L'EXPRESSION CONSTITUTIVE ET TNF α -INDUITE DE GENES IMPLIQUES DANS L'ACTIVATION ET LA REGULATION DE NF- κ B ET SUR DES GENES DONT L'EXPRESSION EST REGULEE PAR NF- κ B.	122
4.11. LES CONSEQUENCES EN AVAL D'UNE REPRESSION DE LA VOIE NF- κ B PAR UNBS1450	132
5. DISCUSSION	137
5.1. DES SUBSTANCES NATURELLES EN TANT QU'AGENTS ANTICANCEREUX CYTOTOXIQUES	137
5.2. UNBS1450 INDUIT UNE MORT CELLULAIRE APOPTOTIQUE DES CELLULES LEUCEMIQUES K562 ET U937 EN ACTIVANT LES CASPASES INITIATRICES ET EFFECTRICES, ET EN REPRIMANT L'EXPRESSION DE MCL-1	138
5.3. REPRESSION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE NF- κ B PAR UNBS1450 ET POSSIBILITE D'UN LIEN ENTRE ACTIVITE NF- κ B REDUITE PAR UNBS1450 ET INDUCTION APOPTOTIQUE	140
5.4. PREVISION D'UN POSSIBLE STRESS OXYDANT INDUIT PAR UNBS1450	141
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	144
6.1. CONCLUSION	144

6.2. PERSPECTIVES	144
7. BIBLIOGRAPHIE	148
ACCEPTED MANUSCRIPTS	177
RESUME	206
MOTS CLES	206
ABSTRACT	207
KEYWORDS	207

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. LES 4 CATEGORIES D'AGENTS UTILISES EN CANCEROTHERAPIE PENDANT LES DERNIERES 50 ANNEES (BAILLY, 2009).....	13
FIGURE 2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES GLYCOSIDES CARDIAQUES (IOANNIS PRASSAS AND ELEFThERIOS P. DIAMANDIS, MODIFIE).....	18
FIGURE 3. ILLUSTRATIONS DES STRUCTURES CHIMIQUES DE CERTAINS CARDENOLIDES.....	19
FIGURE 4. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA POMPE Na^+/K^+ ET DE SON INHIBITION (JUNCKER <i>ET AL.</i> , 2009).....	24
FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS DOMAINES DE LA POMPE SODIQUE (MIJATOVIC, 2007, MODIFIE).....	26
FIGURE 6. L'ATPASE Na^+/K^+ EN TANT QUE TRANSDUCTEUR DE SIGNAL (PRASSAS AND DIAMANDIS, 2008), MODIFIE.....	31
FIGURE 7. CALOTROPIS PROCERA	36
FIGURE 8. ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DES VOIES INTRINSEQUES ET EXTRINSEQUES DE L'APOPTOSE (KHAN <i>ET AL.</i> , 2010, MODIFIE).....	39
FIGURE 9. ILLUSTRATION DES DIFFERENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION CAPABLES D'ENTRER EN INTERACTION AVEC LA REGION PROMOTRICE DU GENE IL-8	53
FIGURE 10. SCHEMA RECAPITULATIF DE LA VOIE DE SIGNALISATION NF- κ B (ADAMS <i>ET AL.</i> , 2002, MODIFIE).....	54
FIGURE 11. LES VOIES DE SIGNALISATION CONDUISANT A UNE ACTIVATION DE NF- κ B (D'APRES PERKINS <i>ET AL.</i> , 2007, MODIFIE).....	55
FIGURE 12. REPRESENTATION CHRONIQUE DES PRINCIPALES DECOUVERTES DANS LE DOMAINE DU TNF α (BALKWILL, 2009), MODIFIE).....	59
FIGURE 13. ILLUSTRATION DE LA DUALITE FONCTIONNELLE DE TNF α (VANDENABEELE <i>ET AL.</i> , 2010 MODIFIE).....	60
FIGURE 14. UNE EXPOSITION CHRONIQUE A DES ERO EST CANCERIGENE (D'APRES FRUEHAUF AND MEYSKENS, 2007, MODIFIE)	69
FIGURE 15. ANALYSE DE L'EFFET DE UNBS1450 SUR LA VIABILITE DES CELLULES K562	95

FIGURE 16. ETUDE DE LA MODALITE DE MORT CELLULAIRE INDUITE PAR UNBS1450 SUR LES CELLULES K562.	97
FIGURE 17. TEST DE VIABILITE DES CELLULES U937.	98
FIGURE 18. ETUDE DE LA MODALITE DE MORT CELLULAIRE INDUITE PAR UNBS1450 SUR LES CELLULES U937.	100
FIGURE 19. EFFET DE UNBS1450 SUR LA VIABILITE DE CELLULES PBMCS.	102
FIGURE 20. ETUDE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DE PROTEINES (A) PRO-APOPTOTIQUES ET (B) ANTI-APOPTOTIQUES.	105
FIGURE 21. EXPRESSION ET LOCALISATION DE BAK DANS LES CELLULES U937 APRES TRAITEMENT PAR UNBS1450 (24 H).	107
FIGURE 22. EXPRESSION ET LOCALISATION DE BAX TOTALE (EN VERT) ET ACTIVEE (EN ROUGE) DANS LES CELLULES U937 APRES TRAITEMENT PAR UNBS1450 (24 H).	110
FIGURE 23. ANALYSE PAR PCR EN TEMPS REEL DES EXPRESSIONS BASALES DES ARNM DE LA POMPE Na^+/K^+ -ATPASE DANS DES PBMCS ET DANS UN ECHANTILLON DE LIGNEES CELLULAIRES LEUCEMIQUES.	112
FIGURE 24. LES EFFETS DE UNBS1450 SUR L'ACTIVATION DE $NF-\kappa B$ PAR $TNF\alpha$	115
FIGURE 25. LES EFFETS DE UNBS1450 SUR L'ACTIVITE CONSTITUTIVE DE $NF-\kappa B$	116
FIGURE 26. ANALYSE DE L'ACTIVITE DE LIAISON DES FACTEURS NUCLEAIRES DES LIGNEES CELLULAIRES LEUCEMIQUES K562 ET JURKAT A LA SONDE $NF-\kappa B$ CONSENSUS.	119
FIGURE 27. ANALYSE DE L'EFFET DE UNBS1450 SUR LA DEGRADATION D' $I\kappa B\alpha$ ET LA TRANSLOCATION DE $NF-\kappa B$	121
FIGURE 28. EFFET DE $TNF\alpha$ SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION $NF-\kappa B$ DANS LES CELLULES K562.	124
FIGURE 29. REPRESENTATION EN 3D DES EFFETS DE $TNF\alpha$ SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION $NF-\kappa B$ DANS LES CELLULES K562.	125
FIGURE 30. COMPARAISON DU PROFIL D'EXPRESSION $TNFA$ -INDUITE + UNBS1450 DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION $NF-KB$	

PAR RAPPORT A LEUR PROFIL D'EXPRESSION CONSTITUTIVE, CONTROLE DANS DES CELLULES K562.....	126
FIGURE 31. REPRESENTATION EN 3D DES EFFETS DE UNBS1450 SUR L'INDUCTION PAR TNF α SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NF-KB PAR RAPPORT A L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DE CES GENES DANS DES CELLULES K562.	127
FIGURE 32. COMPARAISON DU PROFIL D'EXPRESSION TNFA-INDUITE + UNBS1450 DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NF-KB PAR RAPPORT A LEUR PROFIL D'EXPRESSION TNF α -INDUIT DANS DES CELLULES K562.	128
FIGURE 33. REPRESENTATION EN 3D DES EFFETS DE UNBS1450 SUR L'INDUCTION PAR TNF α SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NF-KB PAR RAPPORT A L'EXPRESSION TNF α - INDUITE DE CES GENES DANS DES CELLULES K562.....	129
FIGURE 34. COMPARAISON DU PROFIL D'EXPRESSION UNBS1450-INDUIT DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NF-KB PAR RAPPORTA LEUR PROFIL D'EXPRESSION CONSTITUTIF DANS DES CELLULES K562.	130
FIGURE 35. REPRESENTATION EN 3D DES EFFETS DE UNBS1450 SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION NF-KB PAR RAPPORT A L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DE CES GENES DANS DES CELLULES K562.	131
FIGURE 36. SYNTHÈSE D'IL-8 PAR LES K562, U937 ET JURKAT.	135
FIGURE 37. LES EFFETS DE UNBS1450 SUR LA SYNTHÈSE DE L'IL-8.	136
FIGURE 38. ETUDE D'UN CARACTÈRE OXYDANT DE UNBS1450 CONTRIBUANT A L'INDUCTION APOPTOTIQUE.	143
FIGURE 39. SCHEMA RESUMANT LES RESULTATS OBTENUS SUR LES EFFETS DE UNBS1450 SUR LES CELLULES LEUCEMIQUES K562, U937 ET JURKAT.	145

TABLEAUX

TABLEAU I. LES ATTEINTS MYELOÏDES	4
TABLEAU II. LES ATTEINTES LYMPHOÏDES	6
TABLEAU III. DES AGENTS ANTICANCEREUX RECENTS (FDA)	14
TABLEAU IV. LES PLANTES MAJEURES CONTENANT DES GLYCOSIDES CARDIAQUES STEROÏDES (D'APRES MIJATOVIC ET AL., 2007, MODIFIE)	20
TABLEAU V. CANCERS ET DEREGULATIONS APOPTOTIQUES (D'APRES MITA ET AL., 2006, MODIFIE)	41
TABLEAU VI. QUELQUES EXEMPLES D'AGENTS APOPTOTIQUES EMPLOYES EN CHIMIOOTHERAPIE.	45
TABLEAU VII. LES PRINCIPALES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (SCANDALIOS, 2005).	63
TABLEAU VIII. LES PRINCIPAUX ANTIOXYDANTS ET LEURS FONCTIONS, CLASSEMENT ALPHABETIQUE (LISTE NON EXHAUSTIVE) (GATE ET AL., 1999; MANDL ET AL., 2009; VALKO ET AL., 2007).	64
TABLEAU IX. EXEMPLES DE CONSEQUENCES NEFASTES D'UN STRESS OXYDANT SUR DES LIPIDES, DES PROTEINES ET DE L'ADN (SCANDALIOS, 2005).	66
TABLEAU X. SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE RETARD SUR GEL.	79
TABLEAU XI. ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES POUR LES WESTERN BLOTS.	83
TABLEAU XII. ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES EN IMAGERIE A FLUORESCENCE.	85
TABLEAU XIII. SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES EXPERIENCES D'AMPLIFICATION PAR RT-PCR.	88

LISTE DES ABREVIATIONS

ABL-1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
Ac	anticorps
aCML	atypical chronic myeloid leukemia
ADNc	ADN complémentaire
Akt	serine/threonine protein kinase
AML	acute myeloid leukemia
AP-1	activator protein-1
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APX	ascorbate peroxydase
ARNm	ARN messenger
ATF	activating transcription factor
ATRA	all-trans retinoic acid
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2-antagonist/killer 1
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2 (Bcl-w)	B-cell lymphoma 2
Bcl-3	B-cell lymphoma 3
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra large
Bcl-xS	B-cell lymphoma extra Small
BCR	breakpoint cluster région
Bfl-1 (Bcl-2A1)	Bcl-2 related protein A1
BH3	Bcl-2 homology domain 3
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim (Bcl-2L11)	Bcl-2-like 11
BSA	bovine serum albumin
BSO	buthionine sulfoximine
CCL-2	chemokine ligand 2
CD40 (TNFRSF5)	TNF receptor superfamily member 5
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein

CML	chronic myeloid leukemia
CMML	chronic myelomonocytic leukemia
COX2	cyclooxygénase 2
CS	cardiac steroid
CSF2	colony stimulating factor 2
CXCL	chemokine
CYLD	cylindromatosis
DIABLO	direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI
DISC	death inducing silencing complex
DR	death receptor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ER	endoplasmic reticulum
ERO	espèces réactives de l'oxygène
FADD	Fas-associated death domain
Fas (Tnfrsf6)	TNF receptor superfamily, member 6
FasL	Fas ligand
FLICE	caspase-8
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
GATA-1	globin transcription factor 1
GPX	glutathion peroxydase
GSH	glutathion
GSR	glutathion réductase
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion <i>S</i> -transférase
HIF1 α	hypoxia inducible factor alpha
HLA	human leukocyte antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
Hrk	Harakiri
HRP	peroxydase du raifort (horseradish peroxydase)
IAP (cIAP)	inhibitor of apoptosis

ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IKBKE	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
IKK	I κ B kinase
IL	interleukine
ILP-2	insulin-like peptide 2
IP3	inositol triphosphate
IRAK	IL-1R-associated kinase
I κ B	inhibiteur de kappa B
JMML	juvenile myelomonocytic leukemia
Jnk	Jun N-terminal kinase
LTA	lymphotoxin alpha
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia sequence 1
MDS	myelodysplastic syndromes
MEKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
ML-IAP (Birc7)	baculoviral IAP repeat-containing 7
MPD	myeloproliferative disorder
MTD	maximum tolerated dose
NAC	N-acétylcystéine
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NOXA	NADH oxydase
NSCLC	non small cell lung cancer
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PUMA (Bbc3)	BCL2 binding component 3
RA	refractory anemia

RAEB	refractory anemia with excess blasts
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RARS	refractory anemia with ringed sideroblasts
Ras	rat sarcoma
Rel	reticuloendotheliosis viral oncogene homologue
RIP	ribosome-inactivating protein
RT	reverse transcription
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	superoxyde dismutase
SRC	abréviation pour « sarcoma »
SVF	sérum de veau foetal
TAB	Tak1-binding protein
TAK	TGF-beta activated kinase
TLR	Toll-like receptor
TMB	tétraméthylbenzidine
TNFR	récepteur du TNF α
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF α -related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TNF α -related apoptosis inducing ligand receptor
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
WHO	world health organization
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
γ GCL	gamma-glutamylcystéine ligase

1. INTRODUCTION

La cancérogenèse, c'est-à-dire l'ensemble des processus menant à la formation d'un tissu néoplasique, est composée de trois étapes, à savoir une initiation, une promotion et une progression (Boyd and Barrett, 1990). Chaque étape implique une série de changements épigénétiques et des altérations génétiques affectant des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Armitage, 1985; Link *et al.*, 2010). Une multitude de travaux de recherche ont démontré que chaque étape de la cancérogenèse peut être inhibée par des agents chimiques, que ce soit une retardation, voire une inhibition de l'initiation par l'emploi d'agents antioxydants ou une déviation de la progression cancéreuse par l'application d'agents apoptogéniques (Kelloff *et al.*, 1999).

Apparu au cours des années '70 (Sporn *et al.*, 1976), le terme de chimioprévention fait allusion à une stratégie qui cherche à inverser voire à supprimer le processus de cancérogenèse par l'emploi de divers agents chimiques ainsi définis comme anticancéreux. Ces effets chimiopréventifs peuvent être induits par un grand nombre d'agents chimiques issus de plantes (Johnson *et al.*, 2009).

L'emploi de substances naturelles dans la recherche pharmacologique rencontre actuellement une vraie résurrection. Utilisées dans les médecines traditionnelles à travers le monde entier, des extractions de certaines plantes spécifiques étaient connues comme étant bénéfiques dans le traitement de maladies spécifiques. La fameuse médecine traditionnelle de Chine n'est pas la seule à avoir su tirer profit de la nature. Les cultures de l'Ouest aussi trouvaient des remèdes d'origine naturelle, que l'on parle de la Civilisation Maya qui utilisait diverses plantes de la péninsule du Yucatán pour le traitement de plaies chroniques et de maladies qui aujourd'hui seraient qualifiées de cancers (Mena-Rejon *et al.*, 2009), ou des Indiens d'Amérique qui favorisaient les éponges du genre *Aronia* pour guérir (Kokotkiewicz *et al.*, 2010) : Les tribus des Cherokees, des Muscogees et des Choctaws sont par exemple connues pour avoir eu des connaissances importantes en botanique médicale (Ray, 2009).

Il est évident qu'entre le savoir-faire d'antan et la technologie et les connaissances d'aujourd'hui, le but recherché n'est plus le même : des purifications par HPLC permettent aujourd'hui une identification, une isolation et éventuellement par la suite une reproduction

synthétique de substances naturelles, substances naturelles qu'on espère être anti-inflammatoires ou anticancéreuses et qui pourraient ainsi devenir des outils précieux en recherche fondamentale et, plus tard, dans les traitements thérapeutiques de maladies diverses.

Au sein de notre laboratoire, le Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, des travaux récents démontrent par exemple les potentiels bénéfiques d'hétéronémine, de curcumine et de plusieurs substances naturelles maritimes dans l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B et dans l'induction d'une mort cellulaire par apoptose de cellules malignes, leucémiques en l'occurrence (Folmer *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Schumacher *et al.*, 2010).

Le travail que voici avait comme but d'étendre les connaissances sur les effets anticancéreux d'une substance semi-synthétique appelée UNBS1450, en l'appliquant notamment pour la première fois sur des lignées cellulaires leucémiques humaines.

1.1. Les maladies hématologiques malignes

Par définition, les maladies hématologiques malignes regroupent toutes sortes de cancers qui affectent le sang, la moelle osseuse ou encore les ganglions lymphatiques.

Selon la classification la plus récente de WHO, on distingue plusieurs catégories, à savoir :

- les atteintes myéloïdes (**Tableau I**)
 - o les dysfonctionnements myéloprolifératifs chroniques (MPD)
 - o les atteintes myélodysplasiques/myéloprolifératifs
 - o les syndromes myélodysplasiques (MDS)
 - o les leucémies myéloïdes aiguës (AML)
- les atteintes lymphoïdes (**Tableau II**)

Selon les données statistiques 2009 de "The Leukemia and Lymphoma Society", près de 140000 personnes seront atteintes cette année d'une leucémie de type quelconque aux États-Unis, ce qui ferait une personne toutes les 4 minutes. Parmi tous les néoplasmes qui seront diagnostiqués en 2009, les leucémies atteindront 9,5 % et seront la cause de plus de 6 décès par heure. En prenant en considération tous les types de cancer, les leucémies touchent particulièrement les enfants et les jeunes adultes de moins de 20 ans.

Globalement, le risque de décéder à cause d'une leucémie, d'un lymphome ou d'un myélome a diminué de 1996 à aujourd'hui. Cependant, malgré les progrès spectaculaires dans le domaine thérapeutique, le fort besoin de nouveaux médicaments anticancéreux reste à l'ordre du jour. Des combinaisons thérapeutiques se sont montrées particulièrement efficaces : actuellement, plus de 50 agents anticancéreux sont utilisés, en association ou non, avec la radiothérapie. Certains de ces agents sont des inhibiteurs de la BCR-ABL tyrosine kinase (Gleevec®), des inhibiteurs de désacétylase d'histone (Zolinza®), des agents hypo- ou déméthyleurs (Vidaza®), des immunomodulateurs (Thalomid®), des anticorps monoclonaux ou encore des inhibiteurs du protéasome (Velcade®) (Figure 1).

TABLEAU I. LES ATTEINTS MYELOÏDES

Dysfonctionnements myéloprolifératifs chroniques (MPD)	<ul style="list-style-type: none"> • Leucémie myéloïde chronique (CML) • Leucémie neutrophilique chronique • Leucémie éosinophilique chronique • Myélofibrose idiopathique chronique • Polycytémie vera • Thrombocytémie essentielle
Atteintes myélodysplasiques/myéloprolifératives	<ul style="list-style-type: none"> • Leucémie myéloïde atypique (aCML) • Leucémie myélomonocytaire chronique (CMML) • Leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML)
Syndromes myélodysplasiques (MDS)	<ul style="list-style-type: none"> • Anémie réfractaire <ul style="list-style-type: none"> - avec anneaux sidéroblastiques (RARS) - sans anneaux sidéroblastiques (RA) • Cytopénie réfractaire avec dysplasies multilignées • Anémie réfractaire avec excès blastique (RAEB) • Syndrome 5q- • inclassable
Leucémies myéloïdes aiguës (AML)	<ul style="list-style-type: none"> • AML avec translocations cytogénétiques récurrentes • AML avec t(8 ; 21)(q22 ; q22) AML1/CBFalpha/ETO • Leucémie promyélocytaire aiguë • AML avec t(15 ; 17)(q22 ; q12) et variants PML/RARalpha • AML avec éosinophiles de moelle

	<p>osseuse anormaux inv(16)(p13 ; q22) vagy t(16 ; 16)(p13 ; q22) CBFbeta/MYH1</p> <ul style="list-style-type: none">• AML avec anomalies MLL 11q23• AML avec dysplasies multilignées<ul style="list-style-type: none">- avec historique MDS- sans historique MDS• AML avec syndromes myélodysplasiques, thérapie liée<ul style="list-style-type: none">- agents alkylants- épipodophyllotoxine- autres• AML légèrement différenciée• AML sans maturation• AML avec maturation• Leucémie myélomonocytaire aiguë• Leucémie monocytique aiguë• Leucémie érythroïde aiguë• Leucémie mégacaryocytaire aiguë• Leucémie basophile aiguë• Panmyélose avec myélofibrose aiguë
--	---

TABLEAU II. LES ATTEINTES LYMPHOÏDES

Maladies non hodgkiniennes	
Néoplasies de phénotype B	Néoplasies de phénotype T
<p>Cellules B précurseurs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique <p>Cellules B matures</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucémie lymphocytaire chronique • Leucémie prolymphocytaire • Lymphome lymphoplasmacytique • Lymphome splénique de la zone marginale • Lymphome à cellules du manteau • Leucémie à tricholeucocytes • Lymphome folliculaire • Lymphome B extraganglionnaire des zones marginales des tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses • Lymphome B ganglionnaire des zones marginales • Lymphome B diffus à grandes cellules • Lymphome de Burkitt • Plasmocytome • Myélome plasmocytaire 	<p>Cellules T précurseurs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique <p>Cellules T matures</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucémie lymphocytaire chronique • Leucémie prolymphocytaire • Leucémie à grands lymphocytes granuleux • Syndrome de Sézary • Leucémie à cellules NK • Lymphome T/NK extraganglionnaire, de type nasal • Mycose fongoïde • Lymphome cutané primitif à grandes cellules anaplasiques • Lymphome T sous-cutané, de type panniculite • Lymphome T intestinal, de type entéropathique • Lymphome T gamma/delta hépatosplénique • Lymphome T angio-immunoblastique • Lymphome T périphérique non spécifié • Lymphome T ou nul anaplasique à grandes cellules, de type systémique primitif • Leucémie/lymphome T de l'adulte
Maladies de Hodgkin	

- Maladie de Hodgkin à prédominance lymphocytaire nodulaire
- Maladie de Hodgkin classique
 - sclérosante nodulaire
 - classique riche en lymphocytes
 - à cellularité mixte
 - en déplétion lymphocytaire

1.2. Chimiothérapie utilisée dans le traitement des leucémies et lymphomes

Vu le nombre élevé de sous-types d'atteintes myéloprolifératives, nous nous sommes limités à l'étude de cellules modèles de leucémies myéloïdes chroniques et de lymphomes.

Etablie en 1975 par Lozzio et Lozzio (Lozzio and Lozzio, 1975), la lignée cellulaire K562 est issue à partir de cellules leucémiques myéloïdes chroniques en phase blastique terminale prélevées chez une patiente âgée de 53 ans. Klein *et al.* ont défini ces cellules comme étant rondes et non adhérentes en culture (Klein *et al.*, 1976; Leibovich *et al.*, 1987). Ils ont montré que d'un point de vue protéomique ces cellules K562, porteuses du chromosome Philadelphie, ressemblent à des granulocytes peu différenciés et à des érythrocytes. La fusion des gènes bcr et abl conduit à la formation d'une protéine de fusion BCR-ABL à forte activité tyrosine kinase probablement responsable de la répression de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire. Les cellules U937 furent isolées à partir d'un lymphome histiocytique d'un patient de 37 ans ; ces cellules appartenant à la lignée myéloïde possèdent des propriétés monocytiques.

Les leucémies, myéloïdes et lymphoïdes, nécessitent un traitement thérapeutique immédiat. Aujourd'hui, les traitements courants de leucémies comprennent des approches aussi bien chimio- que radiothérapeutiques, voire une association des deux.

Par définition, la notion de chimiothérapie fait allusion à un usage de molécules, naturelles ou chimiques, avec comme but d'éliminer les cellules cancéreuses de l'organisme. Pendant maintenant presque un demi-siècle, le progrès de la chimiothérapie a été la clé de l'amélioration des conditions et de la durée de survie de patients atteints de cancers hématologiques. Aujourd'hui, le marché pharmaceutique peut compter sur de nombreuses substances chimiques anticancéreuses, applicables *in solo* ou en combinaison, afin d'atteindre le meilleur traitement possible des leucémies. Néanmoins, la chimiothérapie n'est pas sans effets hostiles pour le patient.

L'ultime but est d'éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses, sans nuire aux cellules saines. Dans le cas des leucémies, le ou les agents chimiothérapeutiques utilisés sont soit censés tuer les cellules défectueuses, et ceci à tel point qu'il n'y a plus de signes de dysfonctionnement, ce qui est appelé rémission, soit employés afin d'endommager les cellules

atteintes d'une telle façon que la progression de la maladie est ralentie voir empêchée. La chimiothérapie peut conduire à une rémission de longue durée, mais aussi à une guérison entière. Cependant, même si le but de tous les agents chimiothérapeutiques connus à ce jour est sensiblement le même, c'est-à-dire interférer avec les capacités de croissance et de multiplication d'une cellule cancéreuse, leurs mécanismes d'actions sont variables. La plupart des agents chimiothérapeutiques interagissent avec l'ADN ou l'ARN des cellules tumorales. Ces interactions sont destinées à modifier le contenu génétique d'une telle manière que les cellules cancéreuses ne sont plus aptes à se diviser. Parmi les agents chimiothérapeutiques ADN-modifiants, on compte quatre types, à savoir : (1) les agents ADN-endommageants, (2) les antibiotiques anti-tumoraux (3) les antimétabolites et (4) les inhibiteurs d'enzymes de réparation de l'ADN.

Les agents ADN-endommageant comme par exemple le chlorambucil, le cyclophosphamide ou le melphalan sont regroupés sous le terme d'agents alkylants et provoquent la mort cellulaire en ajoutant des groupements alkyl à des groupes électronégatifs. D'autres substances ADN-endommageantes, comme par exemple le carboplatine, se lient à l'ADN ; ils provoquent des liaisons entre différentes bases guanines de l'ADN, empêchant ainsi un repliement spatial et structural correct de l'ADN et de cette manière exercent un effet cytostatique ; les cellules tumorales ne peuvent plus se diviser. D'une manière similaire, les antibiotiques antitumoraux comme la daunorubicine, l'idarubicine et la mitoxantone s'intercalent entre deux bases nucléotidiques adjacentes ce qui empêche une séparation des brins ADN lors de la réplication. Ces antibiotiques peuvent aussi interférer avec l'ARN cellulaire et provoquer ainsi l'arrêt de la synthèse d'enzymes indispensables à la survie cellulaire.

Les antimétabolites, comme le nom l'indique, avec par exemple le méthotrexate, la fludarabine ou la cytarabine, sont des substances qui miment les métabolites nécessaires à la synthèse d'ADN et d'ARN. Elles empêchent le passage de la phase S du cycle cellulaire. On y distingue trois groupes, à savoir :

- les antipyrimidines avec par exemple le 5-fluorouracile inhibant la thymidylate synthase
- les antipurines avec la fludarabine inhibant l'ADN polymérase
- les antifolates avec le méthotrexate qui inhibe la dihydrofolate réductase qui est une enzyme clé de la synthèse des pyrimidines et des purines

L'emploi d'antimétabolites conduit à la mort cellulaire.

Les inhibiteurs d'enzymes contrôlant la structure topologique de l'ADN (topoisomérases I et II) comme par exemple l'étoposide ou le topotécan empêchent des processus essentiels de la vie cellulaire (p.ex. réplication et transcription), entraînant ainsi la mort cellulaire par apoptose.

A part les agents jouant sur l'intégrité de l'ADN, des traitements hormonaux avec comme par exemple de la prednisone ou de la dexaméthasone peuvent être utilisés pour soigner des lymphomes. Une autre possibilité est de bloquer les cellules tumorales en phase de mitose par l'emploi de la vincristine ou de la vinblastine. Ceci empêche les cellules tumorales de se multiplier.

Un autre type de chimiothérapie plus récent, l'immunothérapie, utilise des anticorps spécifiques de cellules cancéreuses. Soit la liaison de l'anticorps gêne le fonctionnement normale de la cellule, soit l'anticorps accouplé à une toxine ou à une substance radioactive cause la mort de la cellule.

Les agents chimiothérapeutiques peuvent être administrés, seuls ou en combinaison, par différentes voies, à savoir principalement par : (1) voie intraveineuse, (2) voie orale, (3) voie intramusculaire et (4) par voie intrathécale. Selon le type de leucémie, le mode d'administration est défini : pour certaines leucémies ou lymphomes qui possèdent une forte tendance à se disperser dans le système nerveux, la voie intrathécale est par exemple de rigueur.

Même si les traitements chimiothérapeutiques ont grandement contribué à la très nette amélioration de la survie de patients atteints d'un cancer, d'une leucémie ou d'un lymphome en l'occurrence, il ne faut pas perdre de vue que la chimiothérapie est souvent associée à des effets secondaires néfastes. Bien que le but de la chimiothérapie soit d'éradiquer les cellules tumorales, elle n'est pas sans effet sur les cellules saines avoisinantes. Ces effets secondaires sont spécifiques d'un certain agent thérapeutique, de la durée de traitement tout comme de la voie d'administration choisie. Généralement on considère que quatre types de tissus, caractérisés par un fort renouvellement et une forte prolifération cellulaire, peuvent être affectés par la substance chimique : (1) les muqueuses gastro-intestinales, (2) la peau, (3) les

follicules des cheveux et (4) la moelle osseuse. Selon la littérature, les symptômes peuvent varier : des sensations de démangeaisons au niveau de la bouche, de la diarrhée, de la constipation, des nausées, des pertes de cheveux ou de poils, des anémies, des infections voir de la fatigue (The Leukemia & Lymphoma Society).

Pendant presque un siècle, des agents chimiques ("The Forty Glory Cytotoxic"), issus de microorganismes ou de plantes, furent le fondement pharmacologique de la thérapie anticancéreuse (Bailly, 2009; Orosz *et al.*, 1993). Traditionnellement on comptait quatre catégories de médicaments utilisés pour traiter les cancers, à savoir des produits naturels issus de plantes, des produits naturels issus de microorganismes auxquels s'ajoutaient plus récemment dans les années '90 des anticorps monoclonaux et des petites molécules dites ciblées (Figure 1). Si un certain nombre de ces agents anticancéreux traditionnels subsiste de nos jours, leur usage a été considérablement réduit, vu l'émergence de nouvelles molécules récepteur-spécifiques. Suite au développement consécutif de ce nouveau domaine pharmacologique, et ayant devant les yeux un traitement ciblé, la recherche de nouvelles substances naturelles anti-oncogéniques fut négligée.

Ainsi, la vision d'une thérapie sur mesure pour chaque patient reste une vision de nos jours. Certes, des patients atteints par exemple de leucémies chroniques myéloïdes ont vu augmenter leur chance de survie, grâce notamment au développement d'inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases comme l'imatinib (Gleevec®), le dasatinib (Sprycel®) ou encore le nilotinib (Tasigna®) (**Tableau III**), mais le nombre de traitements alternatifs pour des patients atteints d'autres tumeurs, ou pour des patients montrant une rechute, voire une résistance contre une certaine thérapie appliquée, reste très limité. En tant qu'exemple de possibilités thérapeutiques non homogènes, on peut citer la situation du mélanome avancé : le traitement de ce type de tumeur n'est toujours que palliatif, dans le meilleur des cas.

Donc, malgré le progrès indéniable du domaine chimique dans la thérapie anticancéreuse, le besoin de nouveaux médicaments reste de l'ordre du jour, notamment pour prévenir un éventuel développement tumoral et, le cas échéant, minimiser les effets secondaires liés à la thérapeutique. L'ultime but reste évidemment de pouvoir proposer aux patients, un jour, une thérapie spécifiquement ciblée, parfaitement adaptée à un certain type de tumeur, à l'instar des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases appliqués dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques. En ce qui concerne les leucémies, et donc

notre sujet, c'est notamment cette spécificité qui requiert une poursuite de la recherche d'agents anticancéreux alternatifs. Parce que le domaine des leucémies est beaucoup plus vaste et ne concerne pas seulement les leucémies myéloïdes chroniques, il y a une nécessité absolue de trouver d'autres agents anti-leucémiques puissants pour les autres atteintes hématologiques, à l'instar des Gleevec® et Sprycel®, permettant d'augmenter le champ d'action. De plus, aujourd'hui on voit par exemple déjà la nécessité d'avoir en réserve un traitement alternatif des leucémies myéloïdes chroniques : des cas existent où le patient devient résistant au traitement par le Gleevec® (Klemm *et al.*, 2009 ; Strout and Schatz, 2009). Il peut aussi s'avérer utile d'avoir à disposition un traitement opérant via un mode différent. Finalement, l'idée de synergie est aussi prometteuse : une substance ou un produit naturel pourrait agir en synergie avec une certaine molécule à ciblage spécifique comme l'imatinib par exemple. D'une façon similaire, on peut imaginer qu'une telle substance naturelle pourrait aussi potentialiser l'effet thérapeutique de l'agent chimique. Ceci permettrait ainsi de travailler avec de moins fortes doses et donc de minimiser les effets secondaires indésirables.

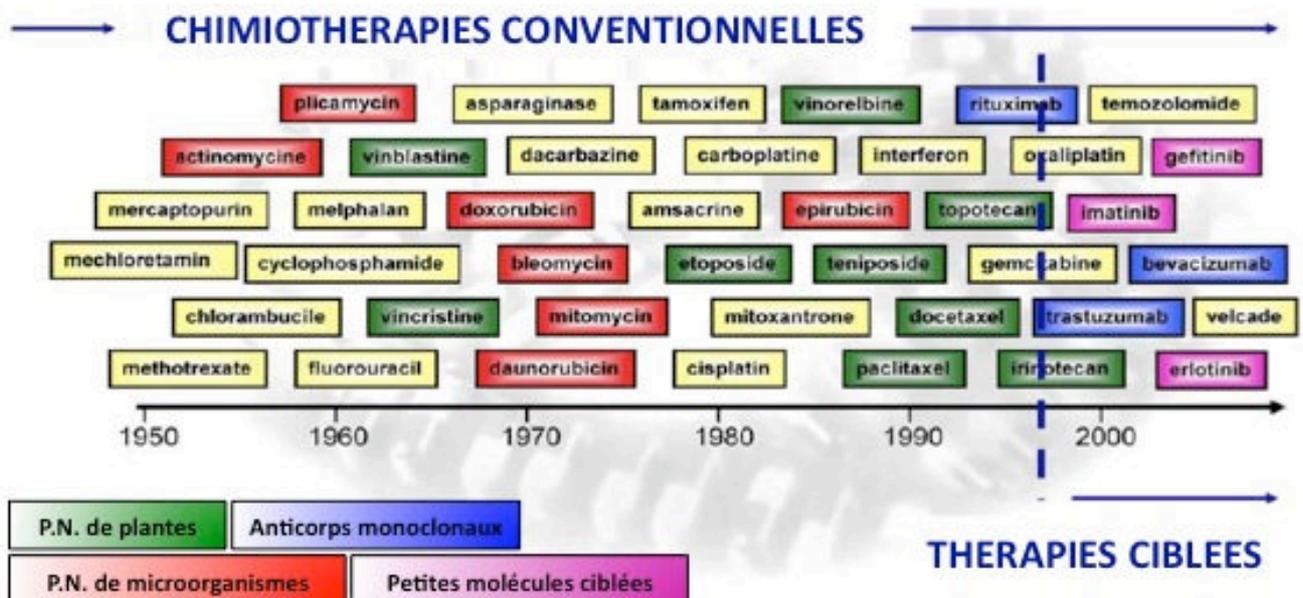


Figure 1. Les 4 catégories d'agents utilisés en cancérothérapie pendant les dernières 50 années (Bailly, 2009).

Des substances cytotoxiques naturelles jouaient un rôle prépondérant en chimiothérapie conventionnelle jusqu'en 1990, avec l'apparition de thérapies moléculaires ciblées, faisant usage d'anticorps monoclonaux et de petits inhibiteurs moléculaires de kinases.

TABLEAU III. DES AGENTS ANTICANCEREUX RECENTS (FDA)

Alemtuzumab (Campath®)	Indiqué contre les leucémies lymphocytiques chroniques (actif contre les lymphocytes)
Acide all-trans-retinoïque ou ATRA (Tretinoin®)	Améliore le degré et la durée de rémission dans le cas d'une leucémie promyélocytaire aiguë
Azacitidine (Vidaza)	Indiqué pour tout type de Syndrome Myélodysplasique
Bendamustine (Treanda®)	Indiqué comme traitement de leucémies lymphocytiques chroniques et de lymphomes non hodgkiniens à faible croissance en progression avec rituximab
Bortezomib (Velcade)	Indiqué pour le traitement de myélomes et lymphomes à cellules du manteau (au moins une thérapie antérieure)
Cladribine (Leustatin®)	Lymphome à cellules du manteau (détection récente) : induit une rémission longue durée
Pentostatin (Nipent®)	(peut servir comme alternative à la Cladribine)
Clofarabine (Clolar®)	Approuvée dans le traitement de rechutes chez des enfants atteints de leucémie lymphocytaire aiguë réfractaire (ayant reçu au moins deux thérapies préalables)
Dasatinib (Sprycel)	Médicament de « deuxième génération » indiqué dans le traitement de leucémies myéloïdes chroniques
Denileukin diftitox (Ontak®)	Indiquée comme traitement de lymphomes T cutanés (cellules malignes CD24+, CD25+)
Gemtuzumab (Mylotarg®)	Anticorps monoclonal employé chez des personnes âgées de ≥ 60 ans atteintes d'une leucémie myéloïde aiguë CD33+ (première rechute)
Ibritumomab (Zevalin®) Tositumomab (Bexxar®)	Anticorps monoclonaux indiqués dans le traitement de rechutes de lymphomes B non

	hodgkiniens
Imatinib mesylate (Gleevec)	Actuellement la thérapie standard de leucémies myéloïdes chroniques nouvellement diagnostiquées
Lenalidomide (Revlimid)	Indiqué dans le traitement de patients atteints de MDS (délétion partielle du chromosome 5) et en combinaison avec la dexaméthasone dans le traitement de myélomes
Nilotinib (Tasigna)	Indiqué dans le traitement de leucémies myéloïdes chroniques
Rituximab (Rituxan)	Approuvé dans le traitement de lymphomes indolents (p.ex. lymphome folliculaire), de lymphomes agressifs (p.ex. lymphome B diffus, à grandes cellules). Peut-être associé à d'autres substances chimiothérapeutiques.
Thalidomide (Talomid)	Approuvé dans le traitement de myélomes nouvellement diagnostiqués (en combinaison avec la dexaméthasone)
Vorinostat (Zolinza)	Indiqué dans le traitement de lymphomes cutanés (MDS à l'étude)

1.3. Prévenir et traiter leucémies et lymphomes par les glycosides stéroïdes cardiaques

Vu les effets secondaires souvent néfastes, le risque de développer une résistance à de multiples agents chimiques, l'apparition d'un dysfonctionnement physiologique thérapeutique induit ou encore d'une rechute à cause de métastases distales, un besoin absolu de découvertes de nouveaux agents anticancéreux reste d'actualité. Malgré les efforts mondiaux réalisés en recherche, le caractère létal du cancer persiste en causant la mort de plus de 6 millions de personnes à l'échelle mondiale (Greten *et al.*, 2004; Kimura, 2003; Madhusudan *et al.*, 2004).

Pendant de nombreuses années, des produits naturels d'origine terrestre, plantes et microorganismes, étaient sources de molécules médicamenteuses aux potentiels antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasites, anti-inflammatoires et anticancéreux. Pour ces derniers, on peut citer parmi les plus anciens, l'aclarubicine (Aclacin, 1981), la peplomycine (Pepleo, 1981) et l'acétate elliptinium (Celiptium, 1983) (Newman, 2007). Déjà en 1964 un congrès intitulé "Drugs from the Sea" rassemblait des chercheurs pour qui la flore marine constituait un énorme réservoir de produits naturels. Aujourd'hui la recherche sur des produits naturels, à potentiels anticancéreux en l'occurrence, se fait sur des substances aussi bien terrestres que maritimes.

1.3.1. Les glycosides stéroïdes cardiaques et leurs sources

Pendant des siècles, la médecine traditionnelle des vieilles cultures d'Égypte, de Chine, de l'Amérique ou encore d'Afrique avait recours à des plantes, auxquelles les savants attribuaient des effets pharmacologiques. Nous savons aujourd'hui que certaines de ces plantes constituent des sources de stéroïdes glycosidiques cardiaques (Melero, 2000; Mijatovic, 2007). Ces glycosides cardiaques composent une famille de substances pharmacologiquement actives, issues ou dérivées de produits naturels. Bien que les membres de cette famille se différencient par une grande diversité structurale, toutes les molécules possèdent un noyau stéroïde (Figure 2, Figure 3), élément commun considéré comme pharmacophore essentiel pour le potentiel pharmacologique des molécules (Schonfeld, 1985). D'une manière générale, le noyau stéroïde est substitué par un groupement lactone en position 17 et par un groupement glycoside en position 3. Comme on peut le voir sur la figure 2, la

nature du groupement lactone définit la classe du glycoside cardiaque : la présence d'un groupement butyrolactone en tant que substituant sur le noyau stéroïde est caractéristique d'un cardénolide, première classe des glycosides cardiaques. Autre possibilité, le noyau stéroïde peut être substitué par un groupement pyrone en position 17 ; on parle alors d'un bufadiénolide. Stéréochimiquement, les glycosides cardiaques montrent une configuration *cis* en A/B et en C/D.

A l'inverse de leur partie lactone plutôt peu variable, les glycosides cardiaques montrent une importante variation de leur partie glycosylée : d'après la littérature, les sucres les plus répandus sont le glucose, le galactose, le mannose, le rhamnose et le digitalose. Bien que la partie osidique ne soit pas pharmacologiquement active par elle-même, il a été montré que sa présence voire son absence influencent grandement le potentiel pharmacologique des glycosides cardiaques. Ainsi, Melero *et al.* ont démontré par néoglycorandomisation que des molécules aglycones sont absorbées et métabolisées plus rapidement que leurs contreparties glycosylées. Cette équipe a montré que l'activité du glycoside cardiaque dépend spécifiquement du groupe glycosyl présent : en tant qu'exemple, ils ont cité le rhamnose qui potentialise le glycoside de 6 à 35 fois, à l'inverse du mannose qui n'a pas montré d'effet significatif (Melero, 2000).

Globalement, une centaine de glycosides cardiaques ont été identifiés jusqu'aujourd'hui (**Tableau IV**). La plupart de ces produits naturels proviennent de plantes appartenant à la superfamille des Angiospermes. Parmi ces plantes, les plus connues sont probablement celles du genre *Digitalis*, décrites et nommées par le physicien et professeur de botanique allemand Leonard Fuchs en 1542, et appartenant aujourd'hui à la famille des Scrophulariaceae. Cependant, les glycosides cardiaques stéroïdes ne proviennent pas essentiellement de végétaux : certaines espèces animales, dont les crapeaux du genre *Bufo*, synthétisent des stéroïdes cardiaques. Il a même été démontré que certains tissus et liquides d'origine mammifère contiennent ce type de composés. En tant qu'exemple on peut citer l'ouabaïne qui a été identifiée (Hamlyn, 1991) dans le plasma humain, ou encore la digoxine, isolée à partir des urines (Goto *et al.*, 1990).

L'emploi d'extraits contenant des composés de nature glycosidiques à effet pharmacologique remonte jusqu'à 1785. Cependant leurs mécanismes d'actions ne furent décrits que dans les années '60 du 20^{ième} siècle (Prassas and Diamandis, 2008).

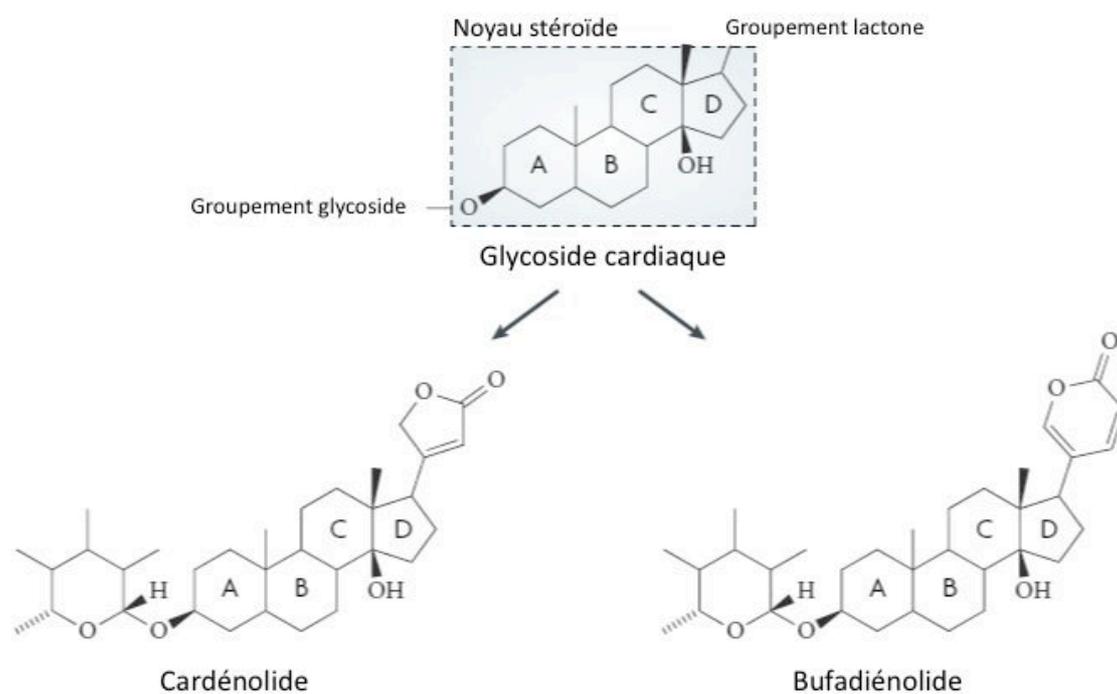


Figure 2. Caractéristiques structurales des glycosides cardiaques (Ioannis Prassas and Eleftherios P. Diamandis, modifié).

La molécule de base est constituée de trois parties : (a) un noyau stéroïde, (b) un groupement glycoside et (c) un groupement lactone. Selon le type du groupement lactone, on distingue entre cardénolide (avec un groupement butyrolactone insaturé) et bufadiénolide (avec un groupement pyrone insaturé).

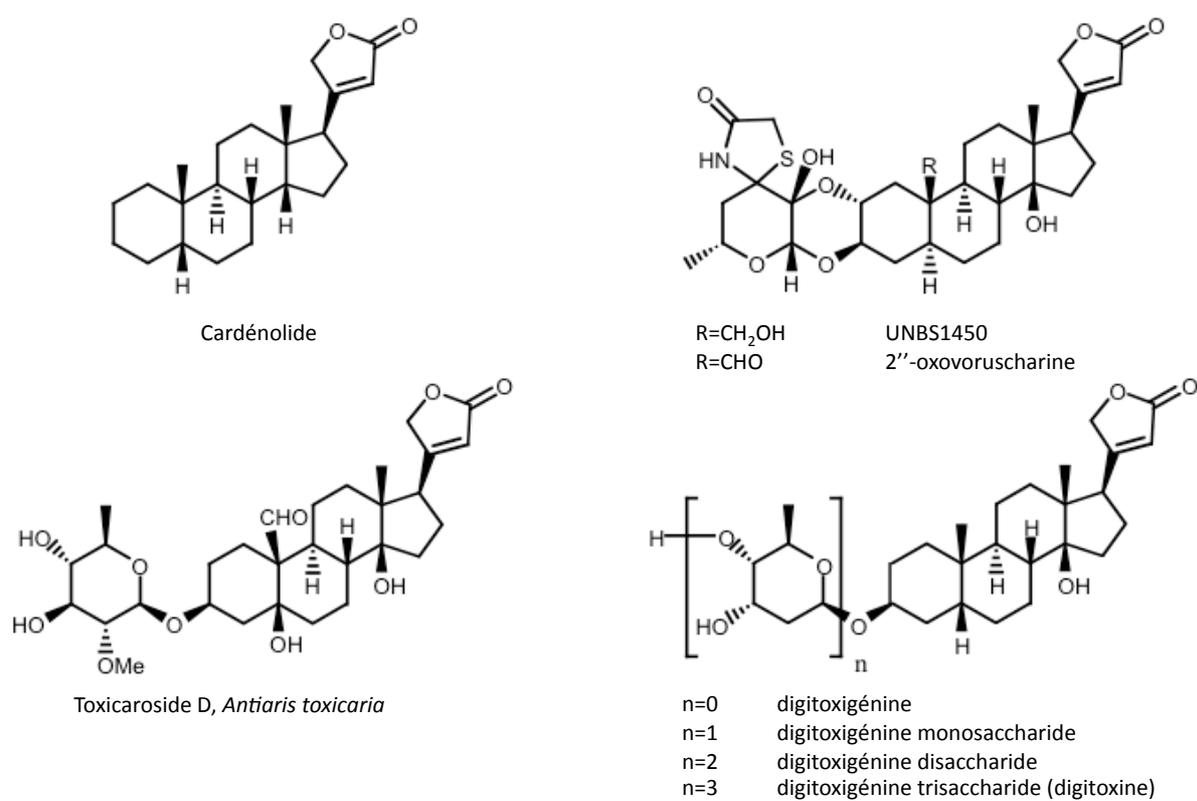


Figure 3. Illustrations des structures chimiques de certains cardénolides.

TABLEAU IV. LES PLANTES MAJEURES CONTENANT DES GLYCOSIDES CARDIAQUES STEROÏDES (D'APRES MIJATOVIC ET AL., 2007, MODIFIE)

Famille	Glycosides cardiaques	Genre	Exemple
CARDENOLIDES			
<i>Apocynaceae</i>	Oléandrine, néérine, nériantine, odoroside A et B, ouabaïne, cymarine, sarmentocymarine, périplocymarine, K-strophantine, thévétine, cerbéline, péruvoside, thévétozine, thévéthine A, tanghinine, désacétyltanghinine, échujine, honghéloside G	<i>Nerium</i> <i>Acokanthera</i> <i>Strophantus</i> <i>Thevetia</i> <i>Cerbera</i>	<i>N. oleander</i>
<i>Asclepiadaceae</i>	Périplocine, strophantidine, strophantidol, nigrescine, uzarine, gomphoside, calotropine, calactine, voruscharine, uscharine, 2''oxovoruscharin, 3'-O-β-D-glucopyranosylcalactine, 12-déshydroxyghalakinoside, 6'-déshydroxyghalakinoside, dérivés des ester méthyles de l'acide calactinique, 19'-nor-16-α-acétoxy-10-β-hydroxyasclepine, acide 20β, 21-dihydroxy-pregna-4,6-dien-3-one, 3,4-seco-urs-20(30)-en-3-oïque	<i>Calotropis</i> <i>Asclepias</i> <i>Periploca</i> <i>Xysmalobium</i> <i>Gomphocarpus</i> <i>Pergularia</i>	<i>C. procera</i>
<i>Brassicaceae</i>	Cheiroside A, cheirotoxine	<i>Cheiranthus</i>	<i>C. cheiri</i>
<i>Celastraceae</i>	Eounoside, euobioside, euomonoside	<i>Euonymus</i>	<i>E. europaeus</i>
<i>Fabaceae</i>	Alloglaucotoxine, corotoxine,	<i>Coronilla</i>	<i>C. sp.</i>

	coroglaucine, glaucorine		
<i>Moraceae</i>	Antiarine	<i>Antaria</i>	<i>A. toxicaria</i>
<i>Scrophulariaceae</i>	Digitoxine, gitoxine, gitaline, digoxine, gitonine F, digitonine, Iantoside A-C	<i>Digitalis</i>	<i>D. purpurea</i>
BUFADIENOLIDES			
<i>Crassulaceae</i>	Lancetoxine A et B, kalanchoside, bryotoxine A-C, bryophylline B, cotiledoside, tyledoside A-D, F et G, orbicuside A-C	<i>Kalanchoe</i> <i>Tylecodon</i> <i>Cotyledon</i> <i>Bryophyllum</i>	<i>K. tomentosa</i>
<i>Iridaceae</i>	Dérivées de la scillirosidine et de la bovogénine A	<i>Moraea</i> <i>Homeria</i>	<i>M.</i> <i>polystachya</i>
<i>Liliaceae</i>	Scillarène A et B, scilliroside, scillarénia, scillia-cinoside	<i>Convalaria</i>	<i>C. majalis</i>
<i>Hyacinthaceae</i>	Scilliglaucoside, scilliglaucosidine, scil-liphaéosidine, scilliaphaéoside, scillirosidine, scillirubrosidine, scillirubroside, proscillaridine, rubéline, convalloside, convallatoxine, bovoside A, glucobovoside A, bovoruboside, 16 β -hydroxy-scillarénine, 16 β -O-acétyl-scillarénine, 12 β -hydroxy-5- α -4,5-dihydroscillirosidine, 16 β -hydroxy-5- α -4,5-dihydroscillirosidine, 16 β -O-acétyl-5- α -4,5-dihydroscillirosidine, 12 β -hydroxy-scillirubrosidine, 16 β -O-acétyl-scillirubrosidine, 9	<i>Urginea</i> <i>Bowiea</i>	<i>U. maritima</i>

	hydroxyscilliphaeosidine, 12 β -hydroxy-désacétyl-scillirosidine		
<i>Melanthaceae</i>	Mélianthusigénine, bersénogénine, berscillogénine, 3-épiberscillogénine	<i>Melianthus</i> <i>Bersama</i>	<i>M. comosus</i>
<i>Ranunculaceae</i>	Helleboréïne, helleborine, hellebrine, hellebrigénine, adonidine, adonine, cymarine, adonitoxine	<i>Helleborus</i> <i>Adonis</i>	<i>H. niger</i>
<i>Santalaceae</i>	Thesiuside	<i>Thesium</i>	<i>T. lineatum</i>

1.3.2. Mécanismes d'action des stéroïdes glycosidiques cardiaques.

En 1785, Sir William Withering avait découvert des potentiels pharmacologiques résidant dans *Digitalis purpurea* («*An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses with Practical Remarks on Dropsy and other Diseases*») (Aronson, 1986). En pleines recherches dans le but de trouver un remède à des problèmes d'hydropisie, il constata une nette amélioration chez l'un de ses patients traité par un mélange de plantes. Il découvrit que le potentiel guérisseur venait des feuilles rouges de *Digitalis purpurea*. Non seulement il observa cet effet diurétique de la digitale, mais il constata aussi que les patients traités par des extraits des feuilles rouges de la plante présentaient des altérations dans le rythme cardiaque. Cependant Sir William n'était pas en mesure de voir la relation qui existait entre l'affection du rythme cardiaque et l'amélioration du système excréteur des urines, relation qui fut établie plus tard.

De la découverte de Sir William Withering à l'identification du mécanisme d'action des glycosides cardiaques il fallut 173 ans. Dans les années '60 du 20^{ème} siècle, à l'Université de Bern, l'équipe de H.J. Schatzmann démontrait que les glycosides cardiaques agissaient de façon directe et spécifique sur les pompes sodiques (Schatzmann and Rass, 1965). Les pompes Na^+/K^+ sont des protéines canaux membranaires, ubiquitairement exprimées, qui, *via* hydrolyse d'ATP, assurent un échange actif des ions potassium et sodium à travers la membrane cytoplasmique ; les ions potassium déplacent du cytoplasme les ions sodiques. À un stade conformationnel E1, la protéine phosphorylée peut se lier à trois ions Na^+ intracellulaires. Par la suite, ces ions Na^+ seront relargués dans l'espace intercellulaire, en échange de deux ions potassium ; l'enzyme est alors en stade conformationnel E2. Les ions K^+ seront importés vers le cytosol. Par hydrolyse et relargage d'un groupement phosphate inorganique, l'enzyme retourne à son stade initial E1 (Figure 4). Le gradient Na^+/K^+ ainsi créé joue dans beaucoup de processus physiologiques, notamment dans la régulation du volume cellulaire, dans la prévention de la lyse cellulaire, dans le maintien du potentiel membranaire et du pH. Les canaux sodiques sont ainsi essentiels à la viabilité cellulaire et par conséquent sont exprimés à travers de nombreux tissus (Faller, 2008; Horisberger, 2004).

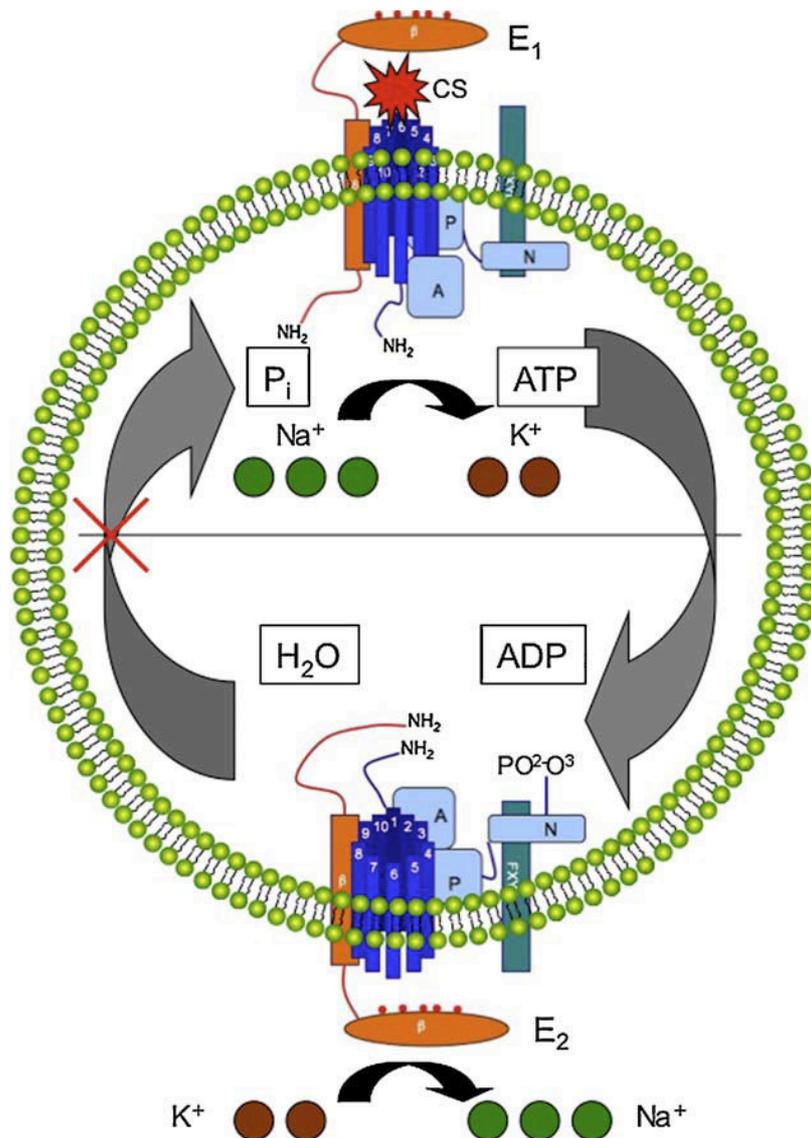


Figure 4. Représentation schématique de la pompe Na⁺/K⁺ et de son inhibition (Juncker *et al.*, 2009).

On distingue 2 stades conformationnels différents : en E₁ la phosphorylation de l'enzyme en P rend possible une liaison et une exportation de 3 Na⁺ cytosoliques en échange de 2 K⁺. Au stade E₂, le relargage des 3 Na⁺ dans l'espace extracellulaire est suivi d'une liaison de 2 K⁺. Par hydrolyse et formation d'un groupement phosphate inorganique, l'enzyme retourne à son stade E₁ ; les 2 K⁺ sont importés et relargués dans le cytoplasme. Des stéroïdes cardiaques (CS) comme les cardénolides se lient à la sous-unité α de l'enzyme et la bloquent en stade E₂ ; l'échange ionique n'est plus possible.

Maints travaux ont mis en évidence un potentiel inhibiteur des pompes sodiques par les glycosides cardiaques.

Les transporteurs Na^+/K^+ sont des protéines hétérodimériques, formées de sous-unités α et β . D'une masse moléculaire de 106 kDa, la sous-unité α se compose d'un domaine M de dix segments transmembranaires et de trois domaines cytosoliques, à savoir les domaines N de liaison à l'ATP (N – nucléotide binding domain), P de phosphorylation et A activateur. Il existe quatre isoformes de sous-unité α : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$. L'isoforme α présente au cœur de l'holoenzyme dépend fortement du tissu en question : l'isoforme $\alpha 1$ est plus ou moins uniformément répandue ; l'isoforme $\alpha 2$ est spécifique du cerveau, du cœur, des vaisseaux sanguins et des muscles squelettiques ; l'isoforme $\alpha 3$ est essentiellement trouvée dans les tissus nerveux et dans la musculature lisse tandis qu' $\alpha 4$ est exprimée dans les gonades, surtout dans les spermatogonies et spermatozoïdes matures. Avec 40 kDa, la sous-unité β est beaucoup plus petite que la sous-unité α . Abondamment glycosylée, elle possède un seul segment transmembranaire qui se caractérise par une partie N-terminale cytosolique courte et une partie extracellulaire plus grande. Contrairement à la sous-unité α à activité catalytique, la sous-unité β est indispensable à la biogenèse tout comme à l'activité de l'holoenzyme (Faller, 2008; Horisberger, 2004). Selon les tissus, une troisième sous-unité appelée FXYD peut être associée aux deux sous-unités α et β .

Les glycosides cardiaques endogènes et exogènes, dont les cardénolides, se lient à des sites de fixations conservés au cours de l'évolution ; des différences existent selon l'espèce prise en considération (Figure 5). Ainsi on sait par exemple que chez la souris, les isoformes $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont naturellement sensibles aux glycosides cardiaques. A l'inverse, $\alpha 1$ est par exemple résistante à une liaison à l'ouabaïne. Chez l'homme, la situation est toute autre : l'isoforme $\alpha 1$ est sensible à des glycosides cardiaques et pourrait même jouer un rôle clé dans la transduction de signaux, initiée par la présence de ligands glycosides cardiaques endogènes (Price and Lingrel, 1988 ; Wang *et al.*, 2001). Les stéroïdes cardiaques influencent la pompe sodique Na^+/K^+ en se liant à des boucles d'acides aminés extracellulaires essentiellement de la sous-unité α . Comme illustrée par la Figure 5, la composition en acide aminés de la première boucle extracellulaire de la sous-unité α s'est avérée comme étant un élément clé à la liaison d'un stéroïde glycosidique. On sait aujourd'hui que par substitution d'acides aminés, on arrive à anéantir l'affinité de la boucle pour des glycosides cardiaques (Keenan *et al.*, 2005).

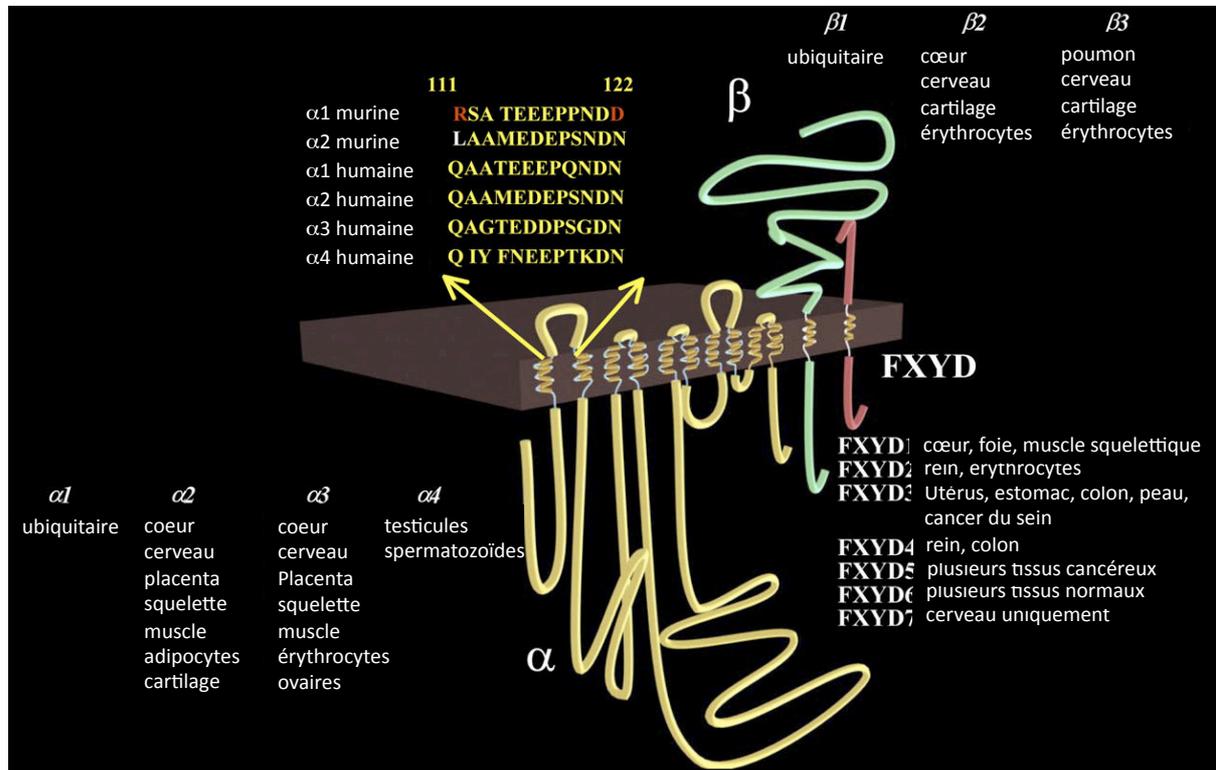


Figure 5. Représentation schématique des différents domaines de la pompe sodique (Mijatovic, 2007, modifié).

Cette figure montre la composition équimolaire en sous-unités de la pompe Na^+/K^+ . En jaune, la sous-unité catalytique α , en vert la sous-unité régulatrice β et en rouge la sous-unité FXYD. À ce jour, il existe 4 isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) de la sous-unité α et 3 isoformes ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) de la sous-unité β . L'expression tissulaire et cellulaire des différentes isoformes est indiquée. Particulièrement importante pour la fixation de stéroïdes cardiaques (CS), la première boucle extra-membranaire (acides aminés 111-122) montre une certaine hétérogénéité au niveau de sa composition en acides aminés. Ceci se traduit par une sensibilité variable envers des stéroïdes cardiaques (CS) divers en fonction de l'isoforme présente. Chez l'homme, l'isoforme sauvage $\alpha 1$ est par exemple responsable d'une sensibilité importante envers l'ouabaine.

Il a été démontré que les cardénolides se lient au stade conformationnel enzymatique E2, bloquant ainsi l'enzyme et la rendant inactive (Erdmann and Schoner, 1973) ; la formation des complexes E2-phosphoenzyme/cardénolide est irréversible. Avec des valeurs de K_d variables, les complexes enzyme/inhibiteur sont probablement internalisés et dégradés. En ce qui concerne les conséquences d'une telle inhibition, un blocage des pompes sodium/potassium conduit à une augmentation de la teneur en Na^+ cytosolique. On sait aujourd'hui que cette hausse en sodium cytosolique influence l'équilibre thermodynamique des pompes d'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ce qui entraîne un renforcement de la concentration cytosolique en Ca^{2+} (Keller *et al.*, 2007). De cette façon, de plus importantes quantités de Ca^{2+} sont disponibles aux protéines contractiles, aboutissant ainsi à un renforcement de la contraction musculaire, et notamment myocardique, expliquant de cette manière le potentiel cardiotonique que possèdent ces stéroïdes glycosidiques (Blaustein, 1974 ; Demiryurek and Demiryurek, 2005; Rahimtoola, 2004). L'emploi de médicaments issus de *Digitalis* est toujours à l'ordre du jour : des patients atteints d'insuffisances cardiaques ou d'arythmies systoliques sont toujours traités par exemple par la digitoxine ou la digoxine, car ces médicaments augmentent la force contractile systolique et prolongent la durée de la phase diastolique.

Des études épidémiologiques montrent que, pendant le 20^{ème} siècle, seulement très peu de patients ayant été sous traitement par des stéroïdes cardiaques sont décédés à cause d'un cancer. En 2001, Stenkvis *et al.* réussissaient à mettre en évidence une létalité du cancer du sein fortement réduite (de 34 % à 6 %) chez des patients sous traitements par des glycosides de *Digitalis* (Stenkvis, 2001). Dans un contexte similaire, il a été démontré que l'apparition de leucémies est significativement moins fréquente au sein d'une population statistique de patients possédant une insuffisance cardiaque sous thérapie par des glycosides cardiaques. De plus, il est intéressant de savoir, qu'en Chine, le glycoside cardiaque bufadiénolidique bufaline a été largement utilisé par la médecine traditionnelle pour traiter des leucémies et des hépatocarcinomes. Ainsi, depuis le début du 21^{ème} siècle, les stéroïdes cardiotoniques ont progressivement monté dans l'intérêt de la cancérologie : parmi les découvertes peut-être les plus importantes, on note par exemple que plusieurs études montrent que les glycosides cardiaques sont capables de bloquer diverses cellules cancéreuses dans la phase G2/M du cycle cellulaire. Enfin, l'équipe autour de Weidemann a établi une hypothèse selon laquelle des altérations non seulement au niveau du métabolisme de substances endogènes du type

stéroïde cardiaque mais aussi au niveau d'interactions de ces dernières avec les pompes sodiques pourraient être associées aux développements de cancers divers (Weidemann, 2005).

Ce vaste champ d'applications possibles des stéroïdes glycosidiques cardiaques pourrait trouver son origine dans une caractéristique bien particulière de la cible de ces composés chimiques, à savoir des pompes Na^+/K^+ . À côté de leur rôle importateur/exportateur d'ions, ces pompes sodiques peuvent aussi interagir avec des protéines membranaires voisines et déclencher, après fixation de nombreux possibles stéroïdes glycosidiques cardiaques endogènes voire exogènes, des cascades de signalisation aboutissant à l'envoi de messages chimiques vers les organelles intracellulaires ; on parle d'une capacité à former des signalosomes. Depuis, plusieurs protéines membres de ce signalosome ont été identifiées, à savoir la kinase Src, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et autres cavéolines (Haas *et al.*, 2000 ; Haas *et al.*, 2002 ; Yuan *et al.*, 2005). En 2002, Xie Z. et Askari A. étaient parmi les premiers à avoir décrit cette fonctionnalité des ATPases Na^+/K^+ (Xie and Askari, 2002). Ce domaine de signalisation se trouve localisé dans des dépressions membranaires revêtues de clathrine du côté cytoplasmique. Des changements conformationnels de la structure protéique lors de l'arrimage des glycosides cardiaques déclenchent alors ces cascades d'interactions des protéines transductrices du signal.

Selon les travaux du groupe de Segall, l'activité de transduction de signal de l'ATPase Na^+/K^+ est indépendante de son activité de transporteur d'ions (Segall *et al.*, 2003). En effet, selon les doses de stéroïdes glycosidiques cardiaques administrées, les réponses des pompes sodiques divergent. Effectivement, de faibles doses de ces glycosides cardiaques, n'engendrant que de faibles changements au niveau de l'activité d'échangeur d'ions, résultent dans l'activation de voies de signalisation multiples (Barwe *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2003). Comme passés en revue récemment par Ioannis Prassas et Eleftherios P. Diamandis (Figure 6), et d'après les connaissances actuelles, les mécanismes exacts des voies de signalisations empruntées en aval d'une stimulation des pompes sodiques par de faibles doses de stéroïdes glycosidiques cardiaques ne sont à ce jour pas encore entièrement connus (Prassas and Diamandis, 2008). Actuellement, les recherches dans ce domaine se concentrent surtout sur l'étude de signalisation en aval via des oscillations de la teneur intracellulaire en calcium et via la stimulation de RAS.

Depuis les études de Aizman *et al.* en 2001, plusieurs équipes ont ciblé leurs recherches sur les effets apparents des stéroïdes glycosidiques cardiaques, à concentrations nanomolaires, sur les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} (Aizman and Aperia, 2003 ; Aizman *et al.*, 2001 ; Saunders and Scheiner-Bobis, 2004 ; Zhang *et al.*, 2006a). Des oscillations au niveau de la concentration en calcium influencent un grand nombre de fonctions cellulaires : prolifération, différenciation et apoptose cellulaires, toutes dépendant largement de la périodicité de ces oscillations. Plus la fréquence oscillatoire est basse (4-6min), plus le facteur de transcription NF- κ B est susceptible d'être activé (Zhang *et al.*, 2006a) et d'induire la transcription de gènes anti-apoptotiques ou proliférateurs. Les travaux de Aizman *et al.* (2001) ont montré que l'ouabaïne était capable d'entraîner des oscillations des concentrations calciques intracellulaires dans les cellules du tubule rénal proximal, lorsqu'elle était employée à des concentrations qui n'avaient peu ou pas d'effet inhibiteur sur l'activité transporteur de l'ATPase Na^+/K^+ . Ces découvertes novatrices furent par la suite confirmées sur d'autres types cellulaires (cellules endothéliales et COS-7). Leur capacité à influencer ces oscillations du Ca^{2+} fait des stéroïdes glycosidiques cardiaques des outils non négligeables pour la thérapie de pathologies diverses, puisque nombre d'elles sont directement liées à des anomalies d'homéostasie calcique (Aperia, 2007).

Comme nous l'avons évoqué en amont, une liaison entre stéroïde cardiaque et pompe Na^+/K^+ peut aussi entraîner l'activation de diverses cascades de signalisation en formant de multiples interactions protéine-protéine. Une des premières découvertes dans ce domaine démontrait qu'en se liant aux pompes sodiques Na^+/K^+ , des stéroïdes cardiaques comme l'ouabaïne étaient capables de transactiver le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR *via* l'activation de la tyrosine kinase Src et en favorisant l'association de Src à EGFR (Haas *et al.*, 2002). Xie *et al.* montraient par la suite qu'une fois activé, EGFR recrute la protéine adaptatrice SHC, la protéine GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) et SOS avant de stimuler la protéine membranaire Ras. Par la suite, la voie de signalisation MAPK est stimulée par Raf et MEKK (Xie and Askari, 2002 ; Xie and Cai, 2003).

Cependant, il est important de souligner que de nombreux travaux appellent l'attention au vu des conclusions tirées sur les résultats obtenus sur l'emploi de stéroïdes cardiaques spécifiques sur des types cellulaires spécifiques (Aydemir-Koksoy *et al.*, 2001; Kometiani *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004; McConkey *et al.*, 2000; Mijatovic *et al.*, 2006a; Mijatovic *et al.*,

2006b; Taurin *et al.*, 2002; Trevisi *et al.*, 2004; Xie and Cai, 2003). De ce fait, il faut considérer les effets d'un stéroïde cardiaque comme étant spécifique du type cellulaire utilisé.

Dans notre cas, cette caractéristique souligne l'utilité d'avoir étudié les effets des glycosides cardiaques sur différentes lignées cellulaires leucémiques.

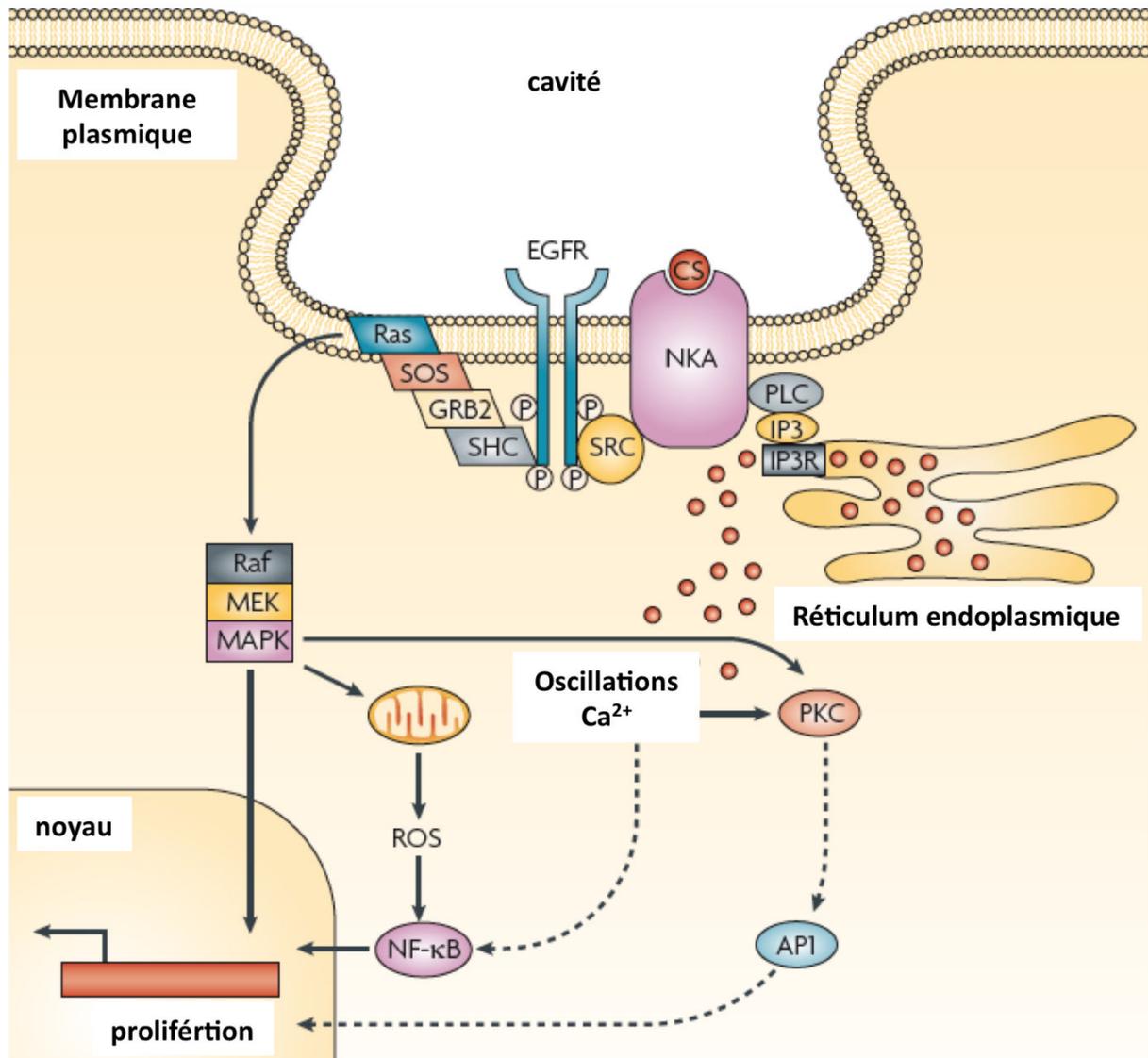


Figure 6. L'ATPase Na⁺/K⁺ en tant que transducteur de signal (Prassas and Diamandis, 2008), modifié.

Une liaison entre le stéroïde cardiaque (CS) et la pompe Na⁺/K⁺ (NKA) entraîne l'activation de la protéine-tyrosine kinase SRC qui à son tour active le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR. EGFR activé recrute et stimule les protéines adaptatrices SHC, GRB2 et SOS menant à l'activation de Ras et de la cascade MAPK. En parallèle, la phospholipase C (PLC) et l'inositol triphosphate (IP3) permettent à NKA d'entrer en contact avec le réticulum endoplasmique. Une telle stimulation du réticulum endoplasmique conduit à un relargage temporaire ou répété de Ca²⁺ dans le cytoplasme. Créant des variations de la concentration en Ca²⁺, les ions calciques sont ainsi capables d'induire des voies de signalisation menant à l'activation de NF-κB.

1.3.3. De nouvelles applications thérapeutiques pour les stéroïdes glycosidiques cardiaques

Vues leurs propriétés inotropiques et leur capacité d'interagir sur le plan fonctionnel et transductionnel de signaux avec les pompes Na^+/K^+ , les glycosides cardiaques ont été l'objet de nombreuses études pharmacologiques. Les stéroïdes glycosidiques cardiaques figurent parmi les médicaments les plus utilisés de nos jours (Daniel *et al.*, 2003). Il est admis aujourd'hui que par leur potentiel purement inhibiteur d'une part, et par l'induction de voies de signalisation d'autre part, les glycosides cardiaques influencent grandement les fonctionnalités cellulaires. La thérapie la mieux connue concerne évidemment la digoxine et la digitoxine en tant que substances inotropes dans le domaine de la cardiologie. Bien que d'autres médicaments comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les inhibiteurs β -adrénergiques et les inhibiteurs des récepteurs à l'angiotensine ont rendu nettement plus ciblée et adaptée la thérapie cardiologique. Les substances issues de *Digitalis* ont gardé leur importance au sein de cette dernière, surtout vu leur capacité à réduire les taux de mortalité et d'hospitalisation de patients atteints d'insuffisances cardiaques systolique et diastolique.

Basées sur le fait que les glycosides cardiaques peuvent induire des voies de signalisation diverses en se liant aux canaux sodiques Na^+/K^+ , une multitude d'études a vu son apparition, mettant en évidence des potentiels pharmacologiques allant de la modulation du relargage de cytokines pro-inflammatoires (Ihenetu *et al.*, 2008; Ihenetu *et al.*, 2003a ; Ihenetu *et al.*, 2003b) à l'induction de l'apoptose de cellules cancéreuses (Daniel *et al.*, 2003 ; Kolkhof *et al.*, 2010; McConkey *et al.*, 2000) ou à la mort cellulaire par autophagie (Mijatovic *et al.*, 2007a).

Les exemples de la littérature montrent que les effets des stéroïdes glycosidiques cardiaques sur des cellules cancéreuses ne sont pas uniformes : Kaplan et Shen figurent parmi les premiers à avoir décrit une stimulation de l'activité de ces pompes sodiques dans des tissus néoplasiques (Kaplan, 1978 ; Shen *et al.*, 1978), à l'inverse de Davies *et al.*, qui ont montré que dans certains types de cancers, les pompes Na^+/K^+ se retrouvent réprimées (Davies *et al.*, 1991). L'expression des pompes ATPases Na^+/K^+ tout comme leur sensibilité envers les glycosides cardiaques varie elle aussi en fonction du tissu néoplasique en question, ce qui fait des stéroïdes glycosidiques cardiaques des agents prometteurs pour faire avancer la thérapie alternative de cancers.

Cependant, d'un point de vue thérapeutique anticancéreuse, il y a un inconvénient important, à savoir la cardiotoxicité. Il n'est évidemment pas envisageable de traiter des patients atteints d'une tumeur quelconque par un agent novateur, qui, hélas, possède un effet inotrope positif. Pour cette raison, il était absolument incontournable de développer des stéroïdes glycosidiques « cardiaques » non cardiotoxiques.

1.4. UNBS1450 : un nouveau stéroïde glycosidique cardénolide semi-synthétique

Des études récentes réalisées au sein de notre équipe, ont montré que différentes substances naturelles ou synthétiques peuvent avoir un caractère chimiopréventif, c'est-à-dire qu'elles peuvent supprimer, retarder ou inverser la cancérogenèse (Duvoix *et al.*, 2005; Kelloff *et al.*, 1994). La plupart des agents chimiopréventifs connus aujourd'hui sont des extraits de plantes et peuvent être regroupés en deux classes : (i) les agents bloqueurs, qui inhibent la phase d'initiation en empêchant une activation cancérogène et (ii) les agents suppresseurs, qui inhibent une prolifération de la cellule maligne pendant les phases de promotion et de progression de la cancérogenèse. Cependant, des agents chimiopréventifs comme la curcumine et le resvératrol présentent des mécanismes d'action multiples, et appartiennent ainsi aux deux catégories.

La curcumine (diféruylméthane), citée en tant qu'exemple, est extraite de la racine de *Curcuma longa L.* À côté de ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antiseptiques (Hergenbahn *et al.*, 2002), il est aujourd'hui admis que la curcumine pourrait aussi servir en tant qu'adjuvant dans la chimiothérapie traditionnelle. La curcumine possède donc des effets chimiopréventifs et chimiothérapeutiques. Il a été démontré que la curcumine peut (i) induire l'apoptose de beaucoup de lignées cellulaires, à savoir les HL-60, les K562, les MCF-7 et les HeLa (Roy *et al.*, 2002) et de cellules primaires (Tourkina *et al.*, 2004), (ii) inhiber la cyclooxygénase 2 tout comme la lipooxygénase, deux enzymes impliquées dans l'inflammation (Huang *et al.*, 1991), (iii) inhiber les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et (iv) influencer l'expression d'enzymes détoxifiantes.

UNBS1450, un nouveau cardénolide semi-synthétique, est issu à la base d'une des plantes les plus utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique, à savoir *Calotropis*

procera (Figure 7). Cette plante est essentiellement répandue à travers les régions semi-arides à arides des Caraïbes, de l'Amérique Central et du Sud, de l'Inde, d'Israël et d'Afrique. Depuis que les sciences médicales ont reconnu le potentiel pharmacologique de *Calotropis procera*, de nombreuses substances pharmacologiquement actives furent isolées à partir des racines, du tronc, des feuilles et du latex de la plante : esters norditerpéniques, carbonés organiques, cystéines protéases, alkaloïdes, flavonoïdes et stéroïdes font de *C. procera* une source précieuse de composés biologiquement actifs (Sharma and Sharma, 1999)(Dewan *et al.*, 2000)(Kumar *et al.*, 2001)(Kumar and Shivkar, 2004). A partir d'extraits méthanoliques, Van Quaquebeke *et al.* ont réussi l'isolation de nouveaux stéroïdes glycosidiques apparentés aux glycosides cardiaques (Van Quaquebeke *et al.*, 2005). Ainsi, la 2''-oxovoruscharine, un dérivé de la voruscharine, fut identifiée et démontrée posséder des fonctionnalités anticancéreuses. Cependant, à cause de son faible indice de dose maximale tolérée (MTD, maximal tolerated dose) déterminé lors des expériences réalisées sur des modèles de souris, la 2''-oxovoruscharine fut considérée comme ayant un index thérapeutique insuffisant. Des modifications chimiques ont permis de réduire cette toxicité : des études sur le rapport structure/activité de variants chimiquement modifiés ont abouti à la synthèse de UNBS1450. Par rapport aux cardénolides classiques, groupe chimique auquel appartient UNBS1450, ce nouveau composé semi-synthétique se caractérise par un groupement glycosidique attaché par liaison double au noyau stéroïde et par un positionnement en *trans* des groupements cycliques formant le noyau stéroïde. D'un point de vue thérapeutique, UNBS1450 a non seulement été prouvé être significativement plus tolérable que le composé mère (2''-oxovoruscharine) mais aussi d'être plus efficace dans les traitements anticancéreux.

UNBS1450 a été démontré cibler essentiellement les isozymes Na^+/K^+ -ATPases $\alpha 3\beta 1$. Comme nous l'avons énoncé antérieurement, une inhibition d'une ATPase Na^+/K^+ par un stéroïde glycosidique du genre cardénolide peut être accompagnée de l'activation d'une multitude de voies de signalisation intracellulaires (Xie and Cai, 2003): le duo pompe Na^+/K^+ et stéroïde glycosidique, donc UNBS1450 en l'occurrence, est susceptible d'agir en tant que signalosome. Ainsi, il a été démontré que UNBS1450 est capable de désorganiser le cytosquelette d'actine, la structure nucléolaire et de désactiver des voies de signalisations protectrices constitutivement activées afin d'induire la mort cellulaire par autophagie. La spécificité de UNBS1450 pour certaines isozymes Na^+/K^+ -ATPases va de pair avec un ciblage de cellules tumorales. Une surexpression des différentes sous-unités de ces pompes sodiques est en effet typique de certains cancers : ainsi, une surexpression de la sous-unité $\alpha 1$

est par exemple caractéristique des aspects cliniques de certains types de cancers pulmonaires (NSCLC, non small cell lung cancer) et de glioblastomes.

Aussi, le potentiel anticancéreux de UNBS1450 a-t-il été étudié : non seulement il fut démontré qu'*in vitro* UNBS1450 exerce un effet inhibiteur sur la prolifération de nombreuses lignées cellulaires tumorales, mais UNBS1450 s'est aussi montré efficace lors des expériences *in vivo*. Une administration chronique de UNBS1450 par voie intrapéritonéale ou *per os*, à des doses variables inférieures ou égales à la dose MTD (maximal tolerated dose), allongait significativement la période de survie de modèles murins ayant subi une xénogreffe de cellules issues de cancer NSCLC ou de glioblastomes (Mijatovic *et al.*, 2006b). Suite à ces observations, un potentiel cytotoxique fut accordé à UNBS1450 (Lefranc *et al.*, 2008b) : des études récentes proclament que des effets pro-autophagiques de UNBS1450 sont responsables du potentiel cytotoxique observé. En effet, des concentrations de l'ordre du nanomolaire se sont avérées suffisantes pour induire la mort cellulaire par autophagie de cellules issues de NSCLC, de glioblastomes et de cancers de la prostate (Mijatovic *et al.*, 2006a)(Lefranc *et al.*, 2008b)(Mijatovic *et al.*, 2008).

Dans tous les cas, et contrairement à d'autres stéroïdes glycosidiques, comme par exemple la Bufaline ou la Digoxine, UNBS1450 ne semblait pas induire une mort cellulaire par voie apoptotique.

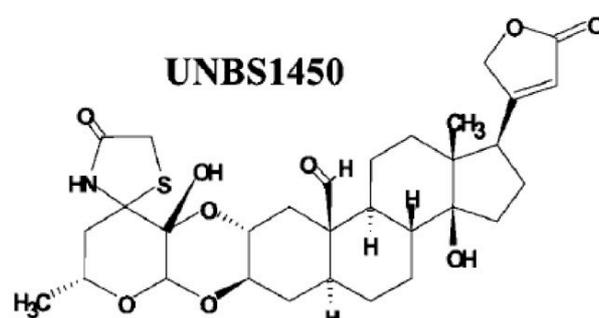


Figure 7. Calotropis procera

Tropical Plants for the Butterfly House, www.pwbelg.clara.net/.../Calotropis_procera.jpg

Structure chimique de UNBS1450

1.5. La mort cellulaire par voie apoptotique, une thérapie de choix en cancérologie

1.5.1. Introduction à la notion d'apoptose

L'apoptose, encore appelée mort cellulaire programmée, est par définition un mécanisme d'élimination de cellules. Elle est indispensable à des processus physiologiques lors du développement : on peut citer en tant qu'exemple les « palmes » interdigitales fœtales qui sont éliminées par apoptose, et l'élimination de cellules B et T auto-réactives (Mita, 2006). L'apoptose constitue un mécanisme hautement conservé au sein des organismes multicellulaires (Khan *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2008). Ce concept de mort cellulaire physiologique a vu le jour en 1972, notamment avec les travaux de Kerr *et al.*, décrivant l'apoptose comme un mécanisme opposé à la mitose (Kerr *et al.*, 1972). Le terme même d'apoptose est dérivé du Grec, faisant référence à la perte des pétales des fleurs, voire des feuilles des arbres (Khan *et al.*, 2010). Parmi les caractéristiques typiques de cellules apoptotiques figurent (1) la réduction générale en taille de ces cellules, (2) le bourgeonnement membranaire, (3) la condensation de la chromatine en un profil caractéristique dit « en barreaux d'échelle », traduisant (4) une fragmentation inter-nucléosomale de l'ADN en fragments de 180 à 200 paires de bases (Khan *et al.*, 2010). Les éléments fonctionnels clés de l'apoptose sont des cystéines protéases appelées caspases : initialement présentes au sein de la cellule sous forme de zymogènes ou de pro-caspases, leur activation par protéolyses hiérarchiques aboutit à la dégradation de substrats essentiels au fonctionnement physiologique de la cellule, à savoir de protéines du cytosquelette, de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et de sous-unités inhibitrices d'endonucléases (Mita, 2006). A la fin, les cellules apoptotiques sont ingérées par des macrophages avoisinants, empêchant ainsi une réponse inflammatoire dans le microenvironnement (Khan *et al.*, 2010; Savill and Fadok, 2000).

1.5.2. Les voies de signalisations apoptotiques

Différentes voies de signalisation aboutissent à la mort cellulaire par apoptose. Principalement nous distinguerons (1) la voie intrinsèque, ou mitochondriale, et (2) la voie extrinsèque, ou voie médiée par des récepteurs de mort (Khan *et al.*, 2010; Ziegler and Kung, 2008). La voie intrinsèque peut être initiée par un défaut en facteurs de croissance, par un endommagement de l'ADN, par un stress oxydant, par une rupture de liaisons intercellulaires,

par une situation d'hypoxie ou encore par des agents xénobiotiques chimiothérapeutiques. Cette voie intrinsèque d'activation de l'apoptose est à la fois stimulée et réprimée par des protéines de la superfamille Bcl-2 (Mita, 2006), superfamille protéique constituée d'antagonistes (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W, Bfl-1, et Mcl-1) et d'agonistes (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Bim, et Hrk) de mort cellulaire (Mita, 2006) : à l'issue d'un stress cellulaire, Bax et Bak oligomérisent et s'intègrent dans la membrane mitochondriale, augmentant ainsi la porosité membranaire et réduisant le potentiel membranaire mitochondrial (Mita, 2006). Il y a relargage du cytochrome c et de Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI). Après relargage, le cytochrome c se lie à Apaf-1 (apoptosis-inducing factor 1) et à la pro-caspase 9 formant ainsi l'apoptosome. Smac/DIABLO interfère avec les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs : XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP, ILP2, livin, apollon, and survivin) (Reuter *et al.*, 2008). Il en résulte l'activation des caspases-9 et caspases-3, -6 et -7, exécutrices d'apoptose. Une activation de la voie extrinsèque par liaison entre récepteurs de mort cellulaire (p.ex. TNFR, Fas, DR3-6, TRAIL-R) et leurs ligands spécifiques mène à un recrutement de FADD (Fas-Associated Death Domain) et à la formation d'un complexe protéique de mort cellulaire DISC (Death Induced Signaling Complex). Les caspases initiatrices 8 et 10 ainsi que les caspases effectrices 3 et 7 sont activées ; il y a convergence des voies intrinsèque et extrinsèque au niveau de l'activation des caspases effectrices. En tant que principal régulateur négatif de la voie extrinsèque, cFLIP (NF- κ B induit) peut interagir avec et inhiber DISC (Figure 8). Une troisième voie d'activation a été décrite récemment : un stress originaire d'une accumulation de protéines à structure 3D non physiologique due à une situation d'hypoxie, à une privation de nutriments, à la réduction de liaisons disulfures ou d'une surexpression de protéines, affecte le réticulum endoplasmique (ER stress, endoplasmique réticulum stress), converge avec la voie intrinsèque cytochrome c-dépendante et conduit à la mort apoptotique (Momoi, 2004; Nakagawa and Yuan, 2000).

Plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont connues pour interférer avec les cascades de signalisations apoptotiques (Mita, 2006) : une stimulation de la voie de signalisation PI3K/Akt par exemple par des facteurs de croissance réprime la signalisation pro-apoptotique en empêchant le relargage du cytochrome c et l'activation des caspases effectrices. PI3K/Akt est interconnectée à la voie de signalisation NF- κ B : en désactivant I κ B, la voie de signalisation PI3K/Akt peut contribuer à la translocation du facteur de transcription

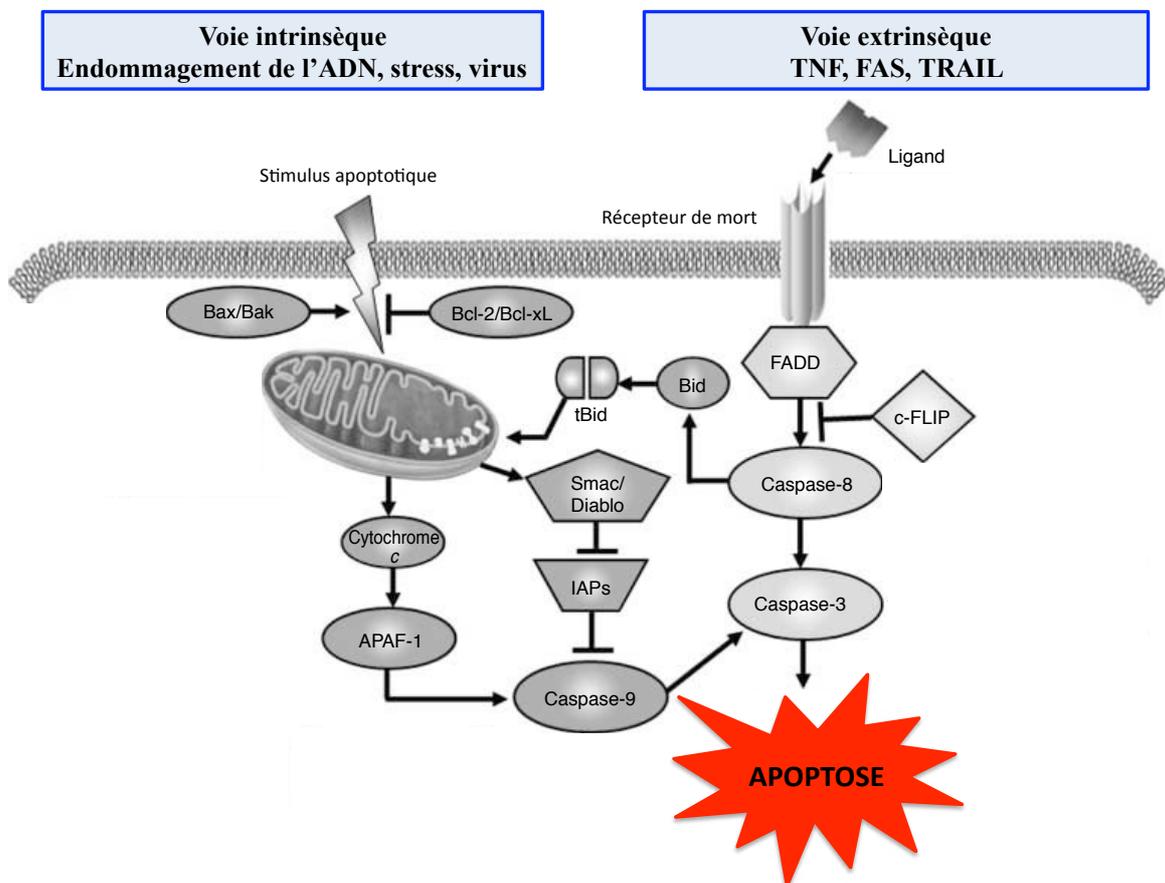


Figure 8. Illustration schématique des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose (Khan *et al.*, 2010, modifié).

La voie extrinsèque est déclenchée par stimulation des récepteurs de mort, conduisant à l'activation de la caspase-8 initiant le clivage de la caspase-3 effectrice de l'apoptose. La voie intrinsèque est activée par différents stimuli menant à un relargage du cytochrome c mitochondrial et à l'activation de la caspase-9 ; des protéines de la famille Bcl-2 régulent ces cascades de signalisation. Le cytochrome c interagit avec APAF-1 et la caspase-9 afin de promouvoir l'activation de la caspase-3 effectrice.

NF- κ B (Adams and Cory, 2001; Zhou *et al.*, 2000) qui peut induire la transcription de gènes anti-apoptotiques et pro-inflammatoires.

1.5.3. Apoptose et cancérogenèse

Une évasion à la mort cellulaire par apoptose est indispensable à une croissance tumorale et notamment leucémique. Une résistance à l'apoptose est ainsi typique des cellules cancéreuses : une perte des signaux pro-apoptotiques combinée à un gain de signaux anti-apoptotiques contribuent à la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2000). Les voies intrinsèques et extrinsèques peuvent être affectées (**Tableau V**) : p53 par exemple, un facteur de transcription suppresseur de tumeurs, est le gène le plus fréquemment muté des tumeurs humaines. p53 intervient sur le cycle cellulaire en cas de détection d'endommagement irréparable de l'ADN et induit, le cas donné, la mort cellulaire par apoptose, en stimulant l'expression de protéines impliquées dans la perméabilisation mitochondriale comme par exemple Bcl-2, Bax, NOXA, PUMA et Mcl-1 (Adams and Cory, 2007; Brenner and Mak, 2009; Thomas *et al.*, 2010) et de récepteurs de mort (p.ex. Fas, DR5) (Ryan *et al.*, 2001). A côté des dérégulations et dysfonctionnements de p53, bien d'autres facteurs peuvent altérer le fonctionnement physiologique des voies apoptotiques : une surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que des homologues de Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999; Reed, 1999), de survivine ou encore des IAPs (Deveraux and Reed, 1999) peut aussi bien contribuer à un potentiel pro-apoptotique diminué que des niveaux d'expression réduits de protéines pro-apoptotiques comme par exemple Apaf-1 (Soengas *et al.*, 2001) ou une activité accrue de voies de signalisation pro-prolifératives comme PI3K/Akt (Datta *et al.*, 1999; Shayesteh *et al.*, 1999) ou NF- κ B. Similairement, une inhibition ou bien une mutation des gènes de récepteurs de mort cellulaire limitent l'efficacité de la voie extrinsèque. Un transport défectueux du récepteur TRAIL, une surexpression de cFLIP, une expression de la pro-caspase-8 revue à la baisse ainsi qu'un recrutement diminué de la pro-caspase-8 par FADD contribuent également à la promotion tumorale (Ashkenazi, 2002; Jin *et al.*, 2004).

TABLEAU V. CANCERS ET DEREGULATIONS APOPTOTIQUES (D'APRES MITA ET AL., 2006, MODIFIE)

Eléments de la voie apoptotique intrinsèque dérégulés dans certains cancers			
Nom	Type(s) de cancer(s)	Rôle	Références
p53	multiples	Initiation de la voie intrinsèque ; une mutation de p53 apporte une résistance envers une induction apoptotique	(Vogelstein <i>et al.</i> , 2000)
Bax, Bak	Cancer du colon, du sein, ovarien Carcinome	Médiation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale	(Kondo <i>et al.</i> , 2000; Rampino <i>et al.</i> , 1997)
Bcl-2	Cancer du colon, de la prostate Carcinome, Lymphome	Antagonisme de Bax/Bak	(Reed, 1999)
Apaf-1	Mélanome, Leucémies	Etablissement d'un lien entre le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-9	(Soengas <i>et al.</i> , 2001)
IAPs	Cancer du poumon, du sein, du pancréas Carcinome du colon	Inhibition des caspases effectrices	(Deveraux and Reed, 1999)
NF-κB	multiples	Transcription des facteurs anti-apoptotiques	(Dolcet <i>et al.</i> , 2005; Feinman <i>et al.</i> , 2004)
caspases	Cancer colorectal Carcinome pulmonaire et gastrique	Dégradation de substrats cellulaires,	(Hosomi <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2003; Koenig <i>et al.</i> , 2005; Philchenkov <i>et al.</i> ,

			2004; Podgorski and Sloane, 2006; Soung <i>et al.</i> , 2003; Soung <i>et al.</i> , 2005; Soung <i>et al.</i> , 2006)
Bcl-XL	Carcinome ovarien	Antagonisme de Bax/Bak	(Rogers, 2002)
Eléments de la voie apoptotique extrinsèque dérégulés dans certains cancers			
Nom	Type(s) de cancer(s)	Rôle	Références
CD95/Fas	Cancers lymphoïdes, solides	Initiation de la voie extrinsèque	(Muschen and Beckmann, 2000; Muschen <i>et al.</i> , 2000)
Trail-R1/R2	Cancer du sein (métastatique)	Initiation de la voie extrinsèque	(Shin <i>et al.</i> , 2001)
Caspase-8	Neuroblastomes	Caspase initiatrice de l'apoptose	(Teitz <i>et al.</i> , 2000)
FLIP	multiples, p.ex. Lymphome de Burkitt	Inhibition de l'activation de la caspase-8	(Tepper and Seldin, 1999)

1.5.4. Une induction de l'apoptose en chimiothérapie

Comme l'impossibilité d'entrer en apoptose constitue une caractéristique typique des cellules tumorales, un but principal de la thérapie anticancéreuse consiste à induire une mort cellulaire (**Tableau VI**). Une élimination des cellules tumorales peut être obtenue d'après différents mécanismes : que ce soit par autophagie, par catastrophe mitotique, par nécrose ou par apoptose, l'ultime but de la chimiothérapie est de cibler, d'empêcher une prolifération et idéalement de réduire en nombre spécifiquement les cellules tumorales et de ne pas nuire aux cellules avoisinantes, saines (Vangestel *et al.*, 2009). Rechercher à induire la mort cellulaire par apoptose, *via* les voies intrinsèque et extrinsèque décrites précédemment, constitue une approche attractive pour de potentielles interventions thérapeutiques. Pour ce faire, plusieurs stratégies ont été développées : (1) La voie dite mitochondriale peut être stimulée par des immunotoxines, des structures hybrides entre anticorps spécifiques d'antigènes de surface de cellules tumorales et toxines, se liant aux cellules tumorales. Ingérées par endocytose, les toxines sont capables d'activer les voies apoptotiques, par exemple en favorisant des clivages double-brins de l'ADN (DiJoseph *et al.*, 2004; Kreitman *et al.*, 2005; Kreitman *et al.*, 2009). Alternativement, d'autres approches visent soit à diminuer les effets de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Kim *et al.*, 2007) ou IAPs (Angell, 2008; Schimmer and Dalili, 2005) par des oligonucléotides antisens, soit à augmenter les effets de protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 (D'Amelio *et al.*, 2008) en développant des molécules qui interfèrent avec les facteurs pro-apoptotiques. Comme p53 est muté dans un grand nombre de cancers, une restauration des fonctionnalités de p53 peut aussi être envisagée, que ce soit en empêchant les interactions entre p53 et son inhibiteur Hdm2 (Shangary *et al.*, 2008; Vassilev, 2007) soit en infectant les cellules tumorales par des adénovirus exprimant p53 (Vangestel *et al.*, 2009) pour ne citer que ces deux exemples. Bien d'autres méthodes aboutissent à une stimulation de la voie apoptotique intrinsèque : à l'instar du Bortezomib (Joazeiro *et al.*, 2006), une inhibition de l'activité protéasomale peut être pro-apoptotique. Des inhibiteurs de méthylation de l'ADN (Baylin, 2005) voire de désacétylation d'histones (Prince *et al.*, 2008), entraînent une réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, une répression de la voie de signalisation PI3K-Akt stimulant la prolifération de cellules tumorales (Luo *et al.*, 2003) ou encore une neutralisation de HIF-1 α (Welsh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006b), facteur de transcription procurant aux cellules cancéreuses une résistance à la situation d'hypoxie généralement trouvée au cœur d'une tumeur ; tous sont susceptibles d'entraîner une entrée en

apoptose de cellules néoplasiques. (2) D'une façon similaire, d'autres approches thérapeutiques ciblent une stimulation agonistique (Ashkenazi and Herbst, 2008) des trois principaux récepteurs de la voie apoptotique extrinsèque qui sont Fas (Timmer *et al.*, 2002), TNF-R1/2 (Curnis *et al.*, 2000) et TRAIL-R1/2 (Carlo-Stella *et al.*, 2007). Une telle stimulation peut conduire à une induction de mort cellulaire par apoptose, tout comme à une diminution de l'expression de cFlip par des inhibiteurs de topoisomérases ou de désacétylases d'histones (Yang, 2008). (3) Indépendamment de la voie apoptotique ciblée, une activation directe (Buckley *et al.*, 1999) ou indirecte (Dudich *et al.*, 2006) de la caspase-3 ou d'autres caspases initiatrices ou effectrices (Xie *et al.*, 2001) sont propices à une induction apoptotique.

TABLEAU VI. QUELQUES EXEMPLES D'AGENTS APOPTOTIQUES EMPLOYÉS EN CHIMIOTHÉRAPIE.

Thérapie	Cibles moléculaires	Mécanisme	Exemples avec références
Emploi d'immunotoxines	<ul style="list-style-type: none"> - antigènes de surface (p.ex. CD22, CD33) - ADN 	p.ex. Clivage double-brin de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> - Inotuzumab-ozogamicine (DiJoseph <i>et al.</i>, 2004) - Gemtuzumab-ozogamicine (Arceci <i>et al.</i>, 2005) - Exotoxine A (DiJoseph <i>et al.</i>, 2004)
Emploi d'anticorps	<ul style="list-style-type: none"> - CD20 (cellules B) → NF-κB - CD25 (cellules lymphoïdes saines et néoplasiques) - HLA-DR (leucémies lymphoïdes chroniques) 	Inhibition de voies de signalisations, p.ex. NF-κB et activation de la voie apoptotique mitochondriale	<ul style="list-style-type: none"> - Rituximab (Cartron <i>et al.</i>, 2007) - Alemtuzumab (Robak, 2008) - Apoluzimab (Mone <i>et al.</i>, 2004)
Emploi d'agonistes de récepteurs de mort cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> - Fas - TNFR1/2 - TRAILR1/2 	Activation de la voie apoptotique extrinsèque	<ul style="list-style-type: none"> - Ac monoclonal anti-Fas (Timmer <i>et al.</i>, 2002) - FasL (Timmer <i>et al.</i>, 2002) - TNF couplé à GNGRC (Curnis <i>et al.</i>, 2000) - sTRAIL (Ashkenazi <i>et al.</i>, 1999) - TRAIL recombinant

			<p>(Ashkenazi <i>et al.</i>, 2008)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mapatumumab (Tolcher <i>et al.</i>, 2007) - Lexatumumab (Ashkenazi and Herbst, 2008) - Apomab (Ashkenazi and Herbst, 2008) - AMG-655 (Ashkenazi and Herbst, 2008) - LBY135 (Ashkenazi and Herbst, 2008) - Ad-TRAIL (Griffith and Broghammer, 2001)
Ciblage de protéines de la famille Bcl-2	<ul style="list-style-type: none"> - Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1 - Bak, Bax - protéines à domaines BH3 	<ul style="list-style-type: none"> - inhibition des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques - mimétisme des protéines pro-apoptotiques à domaines BH3 	<p><u>Bcl-2, Bcl-X_L</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Désoxinucléotides antisens (Kim <i>et al.</i>, 2007; Ozvaran <i>et al.</i>, 2004) <p>mimétisme <u>protéines à domaine BH3</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - HA141, - Antimycine A - Tétrocarcine A - Chelerythrine - Gossypol (D'Amelio <i>et al.</i>, 2008)
Emploi d'activateurs de caspases	Caspases-3, -8, -9	<p>activation</p> <ul style="list-style-type: none"> - directe : activateurs de caspases 	<p><u>Directe</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - peptides RGD : liaison et activation de la caspase-3

		<p>- indirecte : interférences avec les inhibiteurs de caspases (p.ex. cFlip, IAPs)</p>	<p>(Buckley <i>et al.</i>, 1999)</p> <ul style="list-style-type: none"> - MX-2060 (analogue de l'acide gamboïque) : activateur potentiel des caspases (Zhang <i>et al.</i>, 2004) <p><u>Indirecte :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - inhibiteurs de cFlip : activation possible de la caspase-8 (Yang, 2008) - α-fétoprotéine : rupture de la liaison XIAP-caspase-3 (Dudich <i>et al.</i>, 2006) - Mapmoduline et PHAPI (putative HLA-DR associated protein) (Schafer <i>et al.</i>, 2006): sensibilité accrue envers le cytochrome c - oligonucléotides antisens anti-XIAP (Schimmer and Dalili, 2005; Tamm, 2008): taux réduits de XIAP - embelin : peptide Smac/DIABLO (Chen <i>et al.</i>, 2006) - oligonucléotides antisens anti-survivin, siARN (Angell, 2008): taux réduits de survivin
--	--	---	--

Restauration fonctionnelle de p53	p53	<ul style="list-style-type: none"> - annihiler les interactions p53-hdm2 - restaurer l'activité transcriptionnelle de protéines p53 mutées - thérapie génique 	<ul style="list-style-type: none"> - Nutlines, MI-219 (Shangary <i>et al.</i>, 2008; Vassilev, 2007) : antagonistes de l'interaction p53-hdm2 - amifosine, PRIMA-1 (Bykov <i>et al.</i>, 2002) : restauration de p53 - Ad-p53 (Vangestel <i>et al.</i>, 2009) : thérapie génique
Inhibition du protéasome	protéasome	<ul style="list-style-type: none"> - arrêt de la croissance/prolifération cellulaire (arrêt dans G2/M du cycle cellulaire) - impact sur les protéines de la famille Bcl-2 	Bortezomib (Joazeiro <i>et al.</i> , 2006) : inhibiteur de la sous-unité protéasomale 26S
Thérapie épigénétique	<ul style="list-style-type: none"> - méthylation de l'ADN - acétylation des histones 	<ul style="list-style-type: none"> - inhibition de méthylation de l'ADN de gènes suppresseurs de tumeurs - inhibition de désacétylases d'histones 	<p><u>Inhibiteurs de méthylation d'ADN</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Décitabine (Lubbert and Minden, 2005) - Azacitidine (Lemaire <i>et al.</i>, 2008) - Hydralazine (Chavez-Blanco <i>et al.</i>, 2006) - Acide valproïque (Chavez-Blanco <i>et al.</i>, 2006) <p><u>Inhibiteurs de</u></p>

			<u>désacétylases d'histones</u> - acide valproïque - Romidepsine - Vorinostat - ITF2357 - panobinostat (LBH589) (Condorelli <i>et al.</i> , 2008)
Répression de la voie de signalisation PI3K/Akt	PI3K/Akt	- inhibition de PI3K - inhibition de PDK1 - inhibition de Akt - inhibition de mTOR	<u>Inhibiteurs de PI3K</u> - Wortmannine - LY294002 (LoPiccolo <i>et al.</i> , 2008) - Quinolone - pyrido-pyrimidine - IC87114 <u>Inhibiteurs de PDK1</u> - BX-795 - BX-912 - BX-320 (Feldman <i>et al.</i> , 2005) <u>Inhibiteurs de Akt</u> - anticorps anti-Akt - séquestration d'ATP (p.ex. enzastaurine LY317615) - inhibiteur 2 de la voie Akt (API-2) (Cheng <i>et al.</i> , 2005; Neri <i>et al.</i> , 2008) <u>Inhibiteurs de mTOR</u>

			<ul style="list-style-type: none"> - rapamycine - CCI-779 - RAD-001 (Barbone <i>et al.</i>, 2008; LoPiccolo <i>et al.</i>, 2008)
Inhibition de HIF-1 α	HIF-1 α	- blocage de la synthèse de HIF-1 α	<ul style="list-style-type: none"> - PX-497 (Greijer and van der Wall, 2004; Welsh <i>et al.</i>, 2006) - oligonucléotides antisens anti-HIF-1α (Zhang <i>et al.</i>, 2006b)

1.6. Le facteur de transcription NF- κ B : sa voie de signalisation et son importance dans le cancer

La fonction principale du système immunitaire étant la reconnaissance et l'élimination du non-soi, les cellules immunitaires responsables de la reconnaissance produisent un grand nombre de messagers chimiques, de cytokines, telles que TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ou IL-8 encore appelée CXCL8, eux-mêmes capables de recruter et d'activer les cellules effectrices. Ainsi stimulées, les cellules immunitaires réagissent à l'infection en induisant la transcription de gènes pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion cellulaire, dont la régulation transcriptionnelle est sous le contrôle d'un ou de plusieurs facteurs de transcription. En prenant l'exemple de l'IL-8, la région promotrice comporte un grand nombre de sites de liaison de répresseurs ou d'activateurs de transcription (Figure 9). Il est connu que des cytokines comme le TNF α ou des toxines telles que le LPS sont des activateurs typiques de la voie de signalisation NF- κ B (Figure 10).

Le facteur NF- κ B est un membre de la famille des protéines activatrices Rel et répond à un stress oxydant et à un stress inflammatoire. NF- κ B est un complexe protéique pouvant être formé d'homo- ou d'hétéro-dimères des protéines p50, p52, p65, Rel B et c-Rel ; Rel B ne se dimérise qu'avec p50 et p52. Le facteur NF- κ B est lié à un inhibiteur de la famille I κ B α qui le séquestre dans le cytoplasme lorsqu'il est dans un état non activé. Une activation de la cellule par des cytokines ou des toxines entraîne la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B, ubiquitinylé et dégradé par le protéasome 26S par la suite. NF- κ B est transloqué dans le noyau cellulaire où il se fixe sur des séquences spécifiques de l'ADN (5'-GGGACTTTC-3') (Haefner, 2002). Bien que les voies de signalisation des différents stimuli de NF- κ B peuvent différer, il existe des points communs : toutes les voies mènent à la libération de NF- κ B en passant par la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la dégradation de son inhibiteur I κ B α (Figure 11).

Le complexe I κ B kinase (IKK) a été identifié comme étant la kinase phosphorylant I κ B α . Le complexe IKK est formé d'une sous-unité régulatrice I κ B kinase gamma (IKK γ) ou NEMO et de deux sous-unités à activité kinase, IKK α et IKK β .

De nombreux travaux ont montré que le facteur de transcription anti-apoptotique NF- κ B est constitutivement exprimé dans un grand nombre de cancers humains, notamment dans le cancer du sein, dans les leucémies des lymphocytes B et T, dans le cancer de la thyroïde, dans les mélanomes ou encore dans le cancer du colon. L'inhibition de NF- κ B réprime la prolifération tumorale des cellules (Bharti and Aggarwal, 2002; Younes *et al.*, 2003).

La capacité de NF- κ B à inhiber l'apoptose des cellules cancéreuses et à induire l'expression de proto-oncogènes tels que c-myc et la cycline D1 stimulant directement la prolifération, suggère un rôle fondamental joué par ce facteur dans la cancérogénèse (Guttridge *et al.*, 1999; Pahl, 1999). Ainsi il a par exemple été démontré que l'homologue rétroviral v-Rel de c-Rel est hautement oncogène en favorisant l'apparition d'un cancer dans des cellules lymphoïdes aviaires (Gilmore *et al.*, 1996). De plus, il a été montré que les gènes codants RelA (p65), c-Rel, p50 et p52 sont localisés dans des régions génomiques soumises à des remaniements oncogéniques (Chen *et al.*, 2001; Rayet and Gelinis, 1999).

A côté, le facteur NF- κ B est considéré comme étant le régulateur principal de l'expression de gènes pro-inflammatoires. En induisant la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , il est responsable de nombreuses maladies autres que le cancer, comme par exemple le SIDA, l'athérosclérose, l'asthme, le diabète, les rectocolites ulcéro-hémorragiques, la maladie de Crohn ou encore la polyarthrite rhumatoïde.

Mijatovic *et al.* furent parmi les premiers à investiguer les effets des stéroïdes glycosidiques, en l'occurrence des cardénolides, sur une activation constitutive du facteur de transcription NF- κ B. Ils ont démontré que le cardénolide UNBS1450 était capable d'inhiber l'activité constitutive de NF- κ B dans les cellules A549 issues de cancers NSCLC (Mijatovic *et al.*, 2006b).

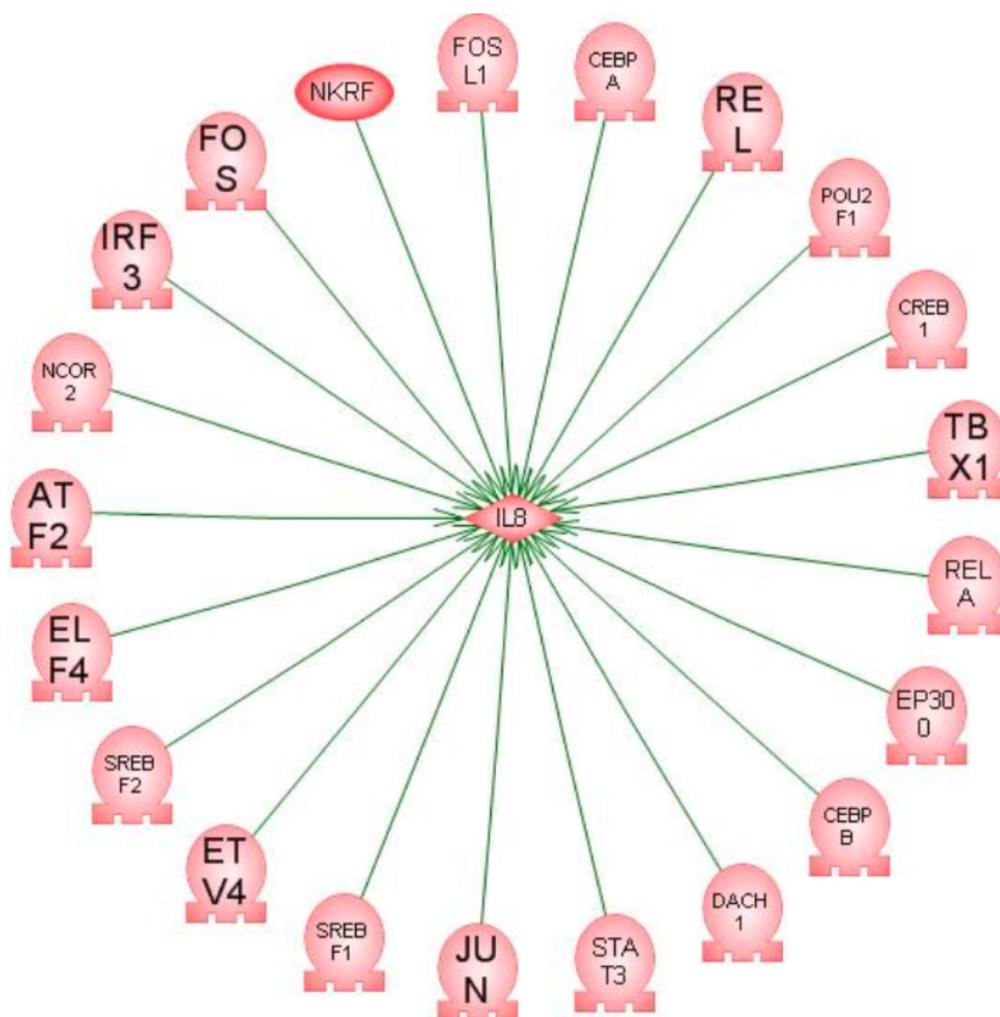


Figure 9. Illustration des différents facteurs de transcription capables d'entrer en interaction avec la région promotrice du gène IL-8

(liste non exhaustive)

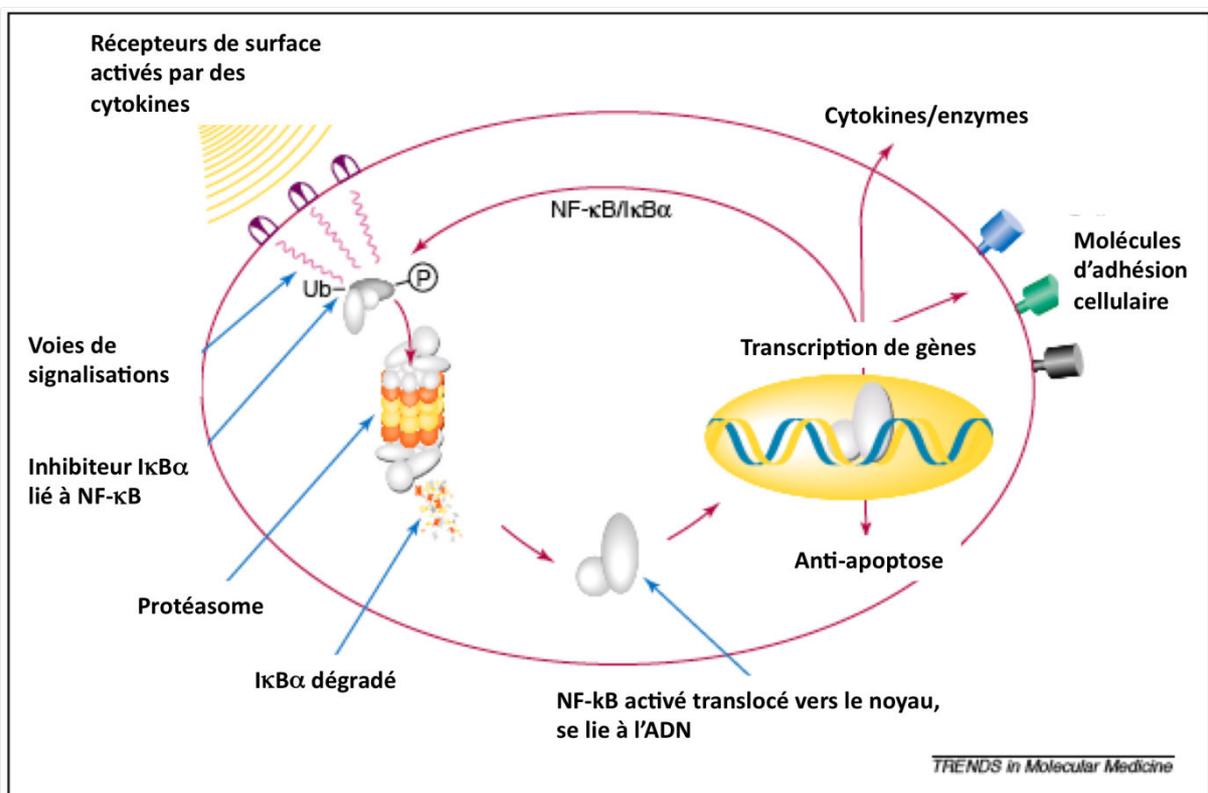


Figure 10. Schéma récapitulatif de la voie de signalisation NF-κB (Adams *et al.*, 2002, modifié)

Des virus, des facteurs de croissance, des radiations, un stress oxydant ou différentes molécules chimiques activent des voies de signalisation qui conduisent à la dégradation de IκBα par le protéasome. Une fois séparé de son répresseur, NF-κB est transloqué dans le noyau afin d'initier la transcription de gènes protégeant la cellule contre l'apoptose et favorisant une prolifération tout comme une différenciation cellulaire.

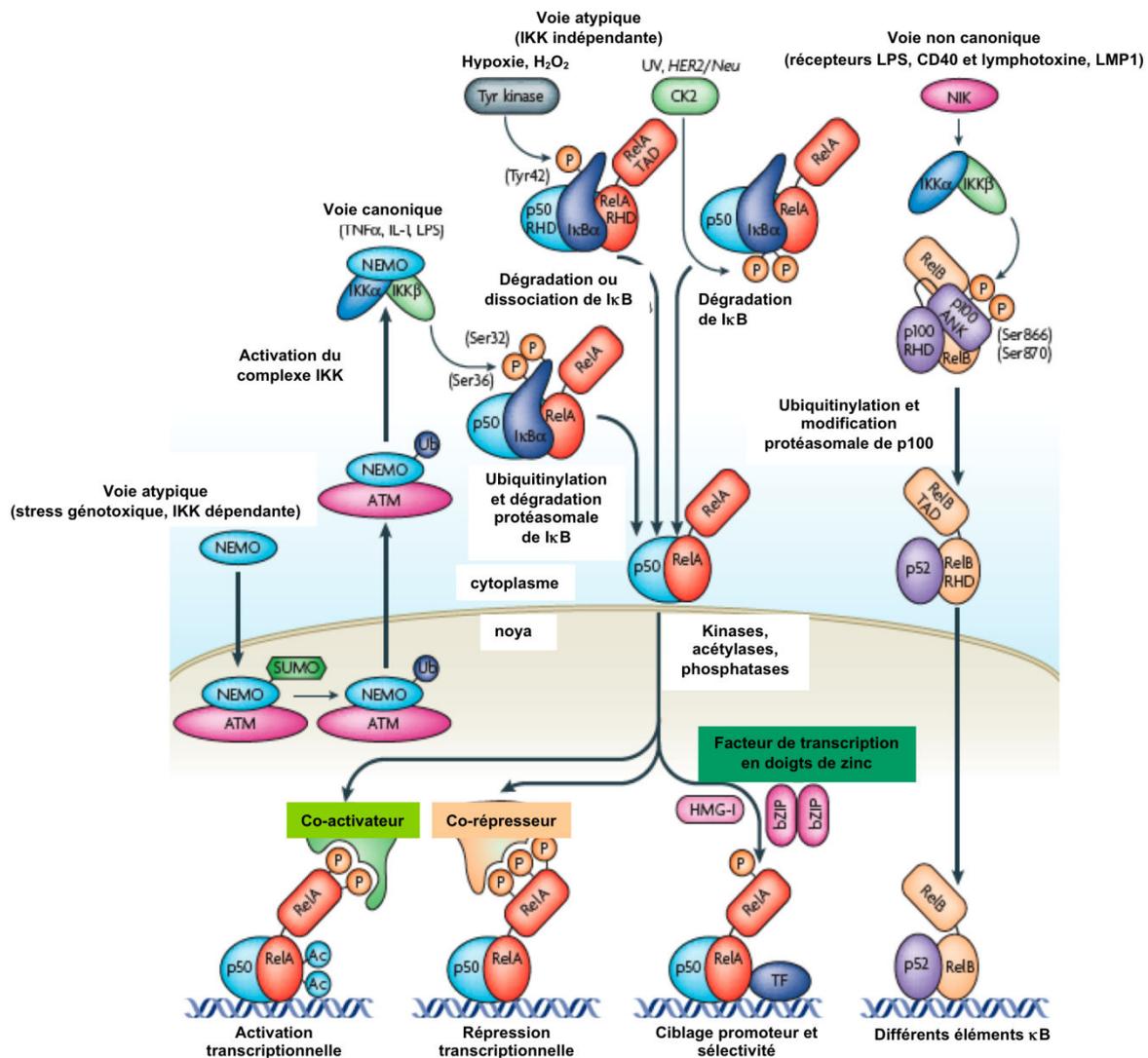


Figure 11. Les voies de signalisation conduisant à une activation de NF- κ B (d'après Perkins *et al.*, 2007, modifié)

Selon les récepteurs initiateurs, on distingue 4 voies de signalisation différentes (la voie canonique, les deux voies atypiques et la voie non canonique) résultant soit dans une activation soit dans une répression transcriptionnelle, dans des effets promoteurs spécifiques ou bien dans le ciblage de différents éléments κ B. Les cascades de signalisation sont assurées par des réactions d'ubiquitinylation, de phosphorylation et de dégradation de protéines adaptatrices spécifiques.

1.7. Investigation d'une possible sensibilisation par UNBS1450 des cellules K562 et U937 à des agents cytostatiques et cytolytiques intrinsèques et extrinsèques.

Comme le nom l'indique, la cytokine TNF α , une abréviation pour "tumor necrosis factor", est capable d'induire *in vivo* la nécrose d'une tumeur et constitue donc un moyen physiologique d'induire la mort de cellules cancéreuses. En fait, la découverte de son activité anti-tumorale remonte jusqu'en 1893 (Figure 12) : le chirurgien américain William Coley a été le premier à décrire une nécrose de tumeurs après les avoir soumises à divers traitements répétés avec des toxines bactériennes (Coley, 1893b). Ce n'est que beaucoup plus tard, en 1975, que cette activité pro-nécrotique fut attribuée à une protéine à laquelle fut par la suite donné le nom de TNF α (Carswell *et al.*, 1975). Cependant, depuis la découverte de la cytokine, de nombreux travaux ont mis en évidence un caractère pro-inflammatoire de TNF α : que ce soit une infection par des pathogènes ou d'autres stimuli nocifs, le système immunitaire inné y répond par une hausse de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et notamment TNF α . La sécrétion de ce facteur est le résultat d'une reconnaissance du pathogène en question par les récepteurs Toll-like (TLR) et de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (Locksley *et al.*, 2001; Tracey *et al.*, 2008). Le relargage d'une quantité importante de TNF α est par la suite à l'origine d'une synthèse accrue de chémokines et de cytokines diverses ayant comme but de recruter neutrophiles, macrophages et lymphocytes vers les lieux d'infection (Locksley *et al.*, 2001; Sethi *et al.*, 2008). De nos jours, il est admis que ce rôle actif joué par le facteur TNF α dans le développement d'une réaction inflammatoire, est aussi propice à une agressivité accrue d'une tumeur : non seulement de nombreux types de cellules cancéreuses, mais aussi les cellules du microenvironnement tumoral de l'hôte, sécrètent des quantités de l'ordre du picogramme de TNF α . La plupart des conséquences pro-tumorales, relatives à ce relargage de TNF α , dépendent de sa fixation sur son récepteur TNFR1 (Arnott *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2007) et de la stimulation de la voie de signalisation NF- κ B qui est le principal médiateur de l'activité pro-cancéreuse des cytokines inflammatoires.

La découverte de Rudolph Virchow en 1863 est sans doute à l'origine des multiples études cherchant à établir un lien entre inflammation et développement de cancers : Virchow a été le premier à constater qu'une tumeur est entourée d'un microenvironnement pro-inflammatoire, avec infiltration de cellules du système immunitaire (Virchow, 1863). En prenant en considération les travaux réalisés sur les rôles remplis par TNF α , à savoir exercer

une cytotoxicité envers des cellules tumorales d'une part et médier l'activation du système immunitaire inné d'autre part, une certaine dualité fonctionnelle reconnue de nos jours devient évidente (Aggarwal, 2003; Sethi *et al.*, 2008) (Figure 13) : une mauvaise régulation de l'expression de TNF α , ou une situation d'autoimmunité avec un relargage chronique de cytokines pro-inflammatoires, dont TNF α , est propice au développement de néoplasmes. La Maladie de Crohn ou bien la rectocolite ulcérohémorragique sont des exemples typiques de maladies autoimmunes liées à un fort taux de TNF α plasmatique et susceptibles de progresser envers des cancers de l'intestin voir du colon (Ahmadi *et al.*, 2009; Pohl *et al.*, 2000; Triantafillidis *et al.*, 2009). Des études réalisées entre autres au sein de notre laboratoire ont également montré qu'une situation d'inflammation, avec des taux élevés de TNF α , inhibe le facteur de transcription GATA-1, indispensable à une différenciation hématopoïétique érythroïde. Son inhibition est donc susceptible de mener à une situation de leucémie (Buck *et al.*, 2009).

TNF α peut donc être considéré comme une cytokine pléiotropique, impliquée aussi bien dans l'induction de mort de cellules cancéreuses que dans la promotion de tumeurs, dans des maladies autoimmunes et le développement de leucémies. Aujourd'hui, de nombreux médicaments ont été développés dans le but de diriger l'action de TNF α dans le sens d'un agent thérapeutique anticancéreux (Yan *et al.*, 2006). Notre étude des effets de UNBS1450 sur des cellules leucémiques telles que les cellules K562 et U937 aura comme but non seulement d'analyser un éventuel potentiel inhibiteur de UNBS1450 sur toute activité pro-inflammatoire, notamment en analysant son effet sur l'activité NF- κ B TNF α -induite, mais aussi de prendre en considération la possibilité de sensibiliser ces types cellulaires à une induction de mort cellulaire par TNF α .

Parallèlement à l'analyse des effets de UNBS1450 en vue d'une sensibilisation à TNF α servant d'exemple de facteurs de stress physiologique, nous avons également évalué le potentiel de UNBS1450 d'agir en synergie avec, voire de sensibiliser des cellules tumorales à, des agents anticancéreux largement établis en cancérologie. Parmi les agents anticancéreux moins récents, certains ont vu leur emploi en forte diminution, faute souvent d'une tolérance médiocre vis-à-vis des tissus sains. Citons l'exemple du Paclitaxel : pendant des années, le Paclitaxel, encore connu sous le nom de Taxol, fut un des agents anti-néoplasiques les plus prometteurs. Le Paclitaxel interfère avec la décomposition du réseau à microtubules ; on parle d'une hyperstabilisation de la structure. Le Paclitaxel s'était avéré actif dans le traitement de

tumeurs des ovaires, du sein, des poumons, et autres. Mais, utilisé à des doses cliniquement efficaces, son emploi est accompagné d'un risque non négligeable de développement de neutropénies. De plus, le Paclitaxel est aussi susceptible de générer des bradycardies et des obstructions coronariennes (Rowinsky *et al.*, 1993). A l'instar de l'exemple donné, la Vincristine, qui est un autre inhibiteur mitotique, est un agent anti-néoplasique largement utilisé en oncologie pédiatrique, a été montrée neurotoxique (Griffiths *et al.*, 1985). Une certaine cardiotoxicité assombrit aussi les tableaux des effets anti-tumoraux bénéfiques de la Doxorubicine (Ludke *et al.*, 2009). D'autres agents anticancéreux, notamment les inhibiteurs des topoisomérases de type I et II ne sont pas exempts non plus d'effets secondaires : Irinotecan et Etoposide respectivement, exercent souvent des effets myélosuppressifs voir immunosuppressifs à côté des diarrhées, chutes de cheveux et abaissements de la pression sanguine certes indésirables (Hartmann and Lipp, 2006). Pour d'autres médicaments anti-tumoraux, en plus d'éventuels effets indésirables, les inconvénients sont différents : le Fluorouracile par exemple, qui compte parmi les agents thérapeutiques anticancéreux les plus anciens mais qui de nos jours est toujours largement répandu, est administré sous forme de pro-médicament métabolisé par la suite en agent actif ; cependant, plus de 80 % de la quantité de Fluorouracile administrée est éliminée par catabolisme (Milano and Chamorey, 2002). Un autre exemple d'une certaine inefficacité due à des effets secondaires souvent néfastes est fourni par le Cisplatine. Surtout employée pour contrer le développement de tumeurs solides, l'administration du Cisplatine est limitée par l'apparition d'une néphrotoxicité (Ali and Al Moundhri, 2006).

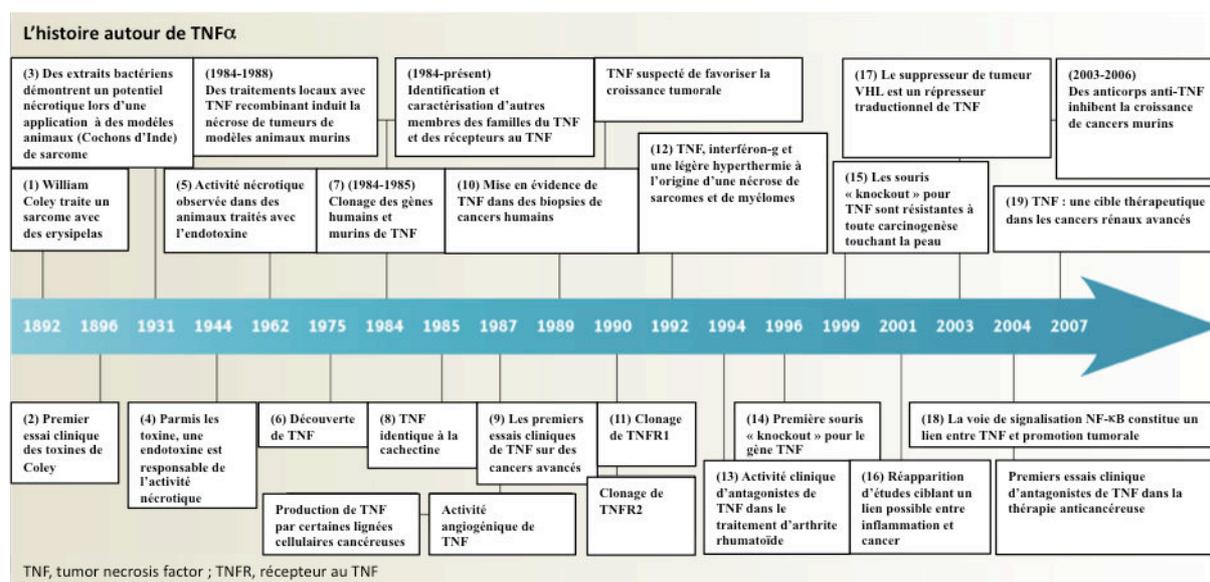


Figure 12. Représentation chronique des principales découvertes dans le domaine du TNF α (Balkwill, 2009), modifié).

(1) (Coley, 1893a) ; (2) (Coley, 1906) ; (3) (Gratia, 1931) ; (4) (Shear, 1944) ; (5) (O'Malley, 1962) ; (6) (Carswell *et al.*, 1975) ; (7) (Marmenout *et al.*, 1985; Pennica *et al.*, 1984) ; (8) (Beutler *et al.*, 1985) ; (9) (Blick *et al.*, 1987; Creagan *et al.*, 1988; Frater-Schroder *et al.*, 1987; Kimura *et al.*, 1987; Selby *et al.*, 1987; Spriggs *et al.*, 1987) ; (10) (Beissert *et al.*, 1989; Malik *et al.*, 1989; Malik *et al.*, 1990; Naylor *et al.*, 1990) ; (11) (Gray *et al.*, 1990; Heller *et al.*, 1990) ; (12) (Lienard *et al.*, 1992) ; (13) (Elliott *et al.*, 1994) ; (14) (Pasparakis *et al.*, 1996) ; (15) (Moore *et al.*, 1999) ; (16) (Balkwill and Mantovani, 2001; Coussens and Werb, 2002) ; (17) (Egberts *et al.*, 2008; Galban *et al.*, 2003; Popivanova *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2003) ; (18) (Pikarsky *et al.*, 2004) ; (19) (Harrison *et al.*, 2007)

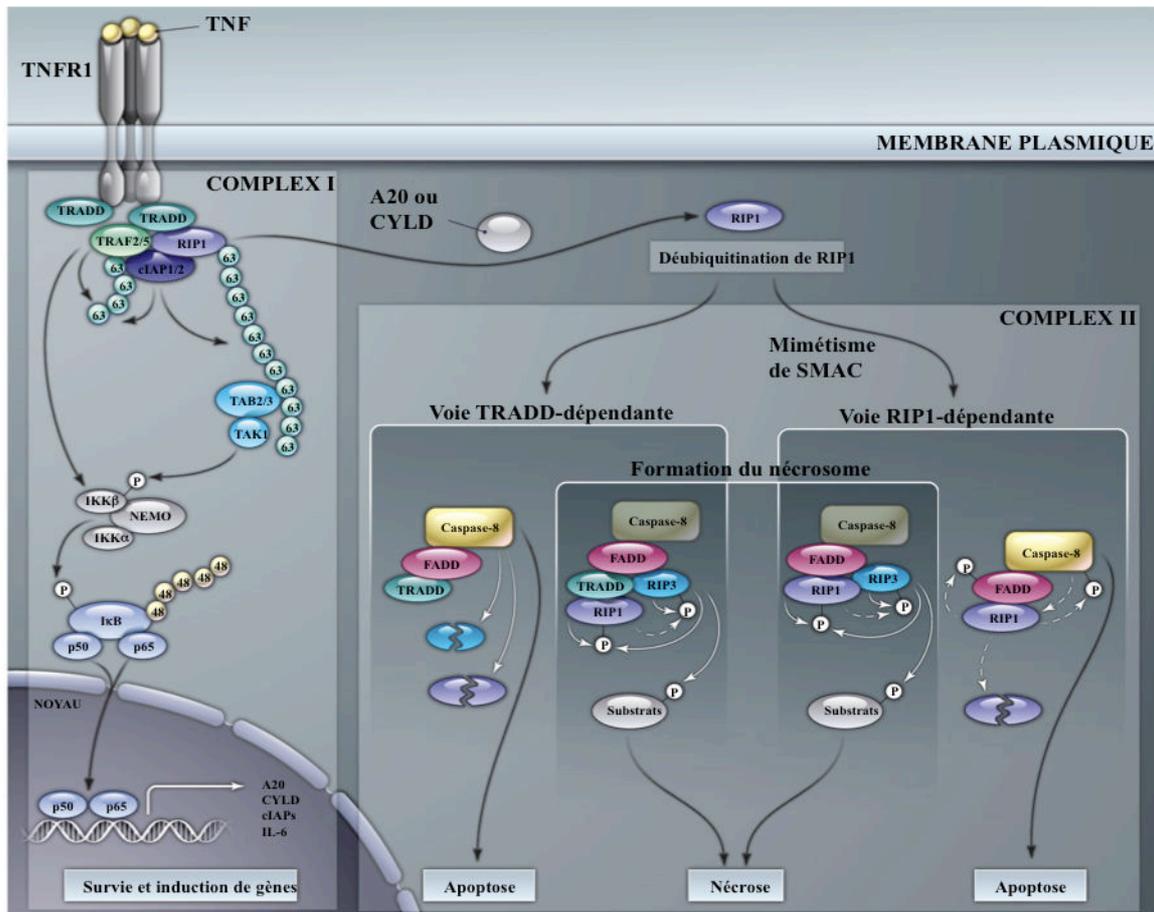


Figure 13. Illustration de la dualité fonctionnelle de $\text{TNF}\alpha$ (Vandenabeele *et al.*, 2010 modifié).

La fixation de TNF sur son récepteur TNFR1 entraîne le recrutement des protéines TRADD, TRAF2/5, RIP1 et cIAPs, formant ainsi le COMPLEXE I, initiant la polyubiquitination des lysine 63 de RIP1 par les cIAPs menant au recrutement de TAB2/3 et de TAK1. Une phosphorylation de IKK β par TAK1 entraîne une liaison entre IKK β et IKK α par NEMO. La libération du facteur de transcription NF- κ B, en l'occurrence formés par p50 et p65, en est assurée en phosphorylant et en ubiquitinant (lysine 48) leur inhibiteur I κ B. Leur translocation dans le noyau induit la transcription de gènes de survie cellulaire et pro-inflammatoires (p.ex. A20, CYLD, cIAPs et IL-6 respectivement). A20 et CYLD (ou un défaut de cIAPs) peuvent inhiber l'ubiquitination de RIP1. Suite à une internalisation du récepteur au TNF, des complexes protéiques secondaires sont formés : (1) un complexe II comprenant TRADD conduit via FADD à l'activation de la caspase-8 (apoptose) ; RIP1/3 sont clivés. (2) Un mimétisme de SMAC conduit indépendamment de TRADD à une association RIP1-FADD et à l'activation de la caspase-8 (apoptose). (3) En présence d'inhibiteurs de caspase-8, RIP1 et RIP3 s'autophosphorylent, forment un nécrosome avec FADD/TRADD ou FADD seul et la caspase-8 (nécrose).

Bien que la thérapie anticancéreuse ait permis de rallonger considérablement la survie et la qualité de vie des patients atteints de tumeurs diverses, les effets secondaires indésirables et souvent néfastes pour certains, une faible assimilation pour d'autres agents anticancéreux, constituent des arguments en faveur de la recherche et du développement de substances antinéoplasiques alternatives ou permettant de sensibiliser la tumeur vis-à-vis de l'agent anticancéreux utilisé et de réduire ainsi les effets secondaires liés aux doses élevées. Les risques sévères de rechutes après traitement, rechutes souvent accompagnées d'une résistance envers l'agent thérapeutique anticancéreux utilisé au préalable, en constituent un autre, comme nous l'avons évoqué plus en amont. Dans cette logique des études de combinaison de UNBS1450 à divers agents chimiothérapeutiques anticancéreux classiques sont envisageables.

1.8. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs rôles dans l'induction de l'apoptose par UNBS1450

1.8.1. Radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène et agents antioxydants

Faisant partie des radicaux libres qui sont des entités chimiques à un ou plusieurs électrons non appariés, les espèces réactives de l'oxygène ou ERO (p.ex. l'oxygène singulet $\bullet\text{O-O}\bullet$, le radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle HO^\bullet ou encore les radicaux peroxydes ROO^\bullet) regroupent des composés chimiques formés lors de réductions incomplètes (**Tableau VII**). Différents facteurs sont à l'origine de la production d'ERO : le métabolisme cellulaire, avec notamment les xanthine oxydases, les lipoxgénases, les cyclo-oxygénases et la respiration cellulaire peuvent aussi bien être à l'origine d'ERO que les réactions inflammatoires avec les différentes voies activables par des cytokines, des pathogènes et des facteurs extrinsèques, environnementaux comme les rayonnements ultraviolets et les xénobiotiques, dont les agents anticancéreux. Une abondance excessive d'ERO est toxique pour les cellules à cause de leurs électrons de valence non appariés. A l'état physiologique, le niveau d'ERO est d'un côté sous l'influence d'inducteurs d'ERO et d'antioxydants cellulaires de l'autre côté. La cellule, et en particulier une cellule cancéreuse, possède un certain nombre de mécanismes intrinsèques permettant une élimination des ERO nocifs (Pani *et al.*, 2010): D'une façon générale, nous distinguons aujourd'hui entre 4 sources d'antioxydants intrinsèques et extrinsèques différentes, à savoir (1) des enzymes (ex : la superoxyde

dismutase, la glutathion peroxydase, la catalase, la glutathion réductase, la thiorédoxine/thiorédoxine réductase, la glutarédoxine), (2) des protéines comme l'albumine, la ferritine et la céruléoplasmine, (3) de petites molécules comme l'acide ascorbique, l'acide urique, le tocophérol, les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion sous sa forme réduite (GSH) notamment et (4) certaines hormones (p.ex. mélatonine, estrogènes et angiotensine) (Prior *et al.*, 2005) (**Tableau VIII**). Finalement, une cellule peut aussi exporter les ERO en dehors du contenu cellulaire.

1.8.2. La notion de stress oxydant

Dans le cas d'un déséquilibre entre les deux composantes, une conséquence possible est l'apparition d'un stress oxydant pour la cellule, stress oxydant qui peut influencer les activités kinases et phosphatases ainsi que les fonctions de facteurs de transcription de gènes spécifiques (Fruehauf and Meyskens, 2007), qui peut de cette manière soit conduire à l'apoptose de la cellule en question, soit entraîner des désordres physiopathologiques sévères comme des maladies autoimmunes, des désordres neurodégénératifs ou encore des inflammations chroniques potentialisant l'initiation d'un développement tumoral, notamment leucémique (Singh *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Un stress oxydant peut être cancérigène par mutations de l'ADN génomique ou mitochondrial ou par altérations structurales de lipides intracellulaires et de protéines (Benz and Yau, 2008). Un dysfonctionnement, voire une saturation des mécanismes protecteurs peut aussi être à l'origine d'une formation de peroxydes lipidiques membranaires ou encore à des modifications protéiques post-traductionnelles (**Tableau IX**).

TABLEAU VII. LES PRINCIPALES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (SCANDALIOS, 2005).

Nom	Symbole	Commentaires
oxygène singulet	$\bullet\text{O-O}\bullet$	produit par irradiation UV A
anion superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet-}$	produit par les chaines mitochondriales de transports d'électrons, les peroxysomes, l'oxydation de xénobiotiques
radical hydroxyle	$\text{HO}\bullet$	hautement réactif (macromolécules), défense contre les pathogènes
radical peroxyde	$\text{ROO}\bullet$	formé lors d'une exposition d'un acide gras insaturé à un radical libre p.ex. $\text{HO}\bullet$
radical alkoxyde	$\text{RO}\bullet$	produit par la réaction de Fenton qui convertit un radical lipidique (issu d'une réaction entre un radical $\text{ROO}\bullet$ et un acide gras insaturé) en radical alkoxyde
peroxynitrite	$\text{ONOO}\bullet$	produit par réaction du monoxyde d'azote avec l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$
monoxyde d'azote	$\text{NO}\bullet$	Produit par les cellules endothéliales, les macrophages, les neurones, les cellules du foie <ul style="list-style-type: none"> - agit comme vasodilatateur - microbiocide - neurotransmetteur - régulateur de l'apoptose - relaxant des muscles lisses

TABLEAU VIII. LES PRINCIPAUX ANTIOXYDANTS ET LEURS FONCTIONS, CLASSEMENT ALPHABETIQUE (LISTE NON EXHAUSTIVE) (GATE ET AL., 1999; MANDL ET AL., 2009; VALKO ET AL., 2007).

Nom	Nature	Fonctions spécifiques
α -tocophérol (Vitamine E)	non enzymatique	Principal antioxydant des membranes lipidiques (réduit les radicaux lipidiques) et des mitochondries
Ascorbate (Vitamine C)	non enzymatique	Cofacteur enzymatique (hydroxylations), antioxydant impliqué dans le repliement 3D des protéines, présente dans les mitochondries et le RE
Caroténoïdes	non enzymatique	Antioxydant apporté par l'alimentation
Catalase	enzyme	Décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène
Flavonoïdes	non enzymatique	Antioxydant apporté par alimentation (p.ex. thé vert), effets anti-inflammatoires (p.ex. catéchines)
Glutathion réductase (GSR ou GR)	enzyme	Catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion (GSH)
Glutathion (GSH)	non enzymatique	le groupement –thiol peut être donneur d'un proton (H^+) pour réduire des radicaux libres (ERO) \rightarrow oxydation en GS^- réactif, association entre deux

		GS ⁻ réactifs → formation de GSSG
Glutathion peroxydase (GPX)	enzyme	Catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par oxydation de glutathion
Ascorbate peroxydase (APX)	enzyme	Catalyse la réduction des peroxydes (p.ex. d'hydrogène) par les ascorbates
Superoxyde dismutase (SOD)	enzyme	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et eau

TABLEAU IX. EXEMPLES DE CONSEQUENCES NEFASTES D'UN STRESS OXYDANT SUR DES LIPIDES, DES PROTEINES ET DE L'ADN (SCANDALIOS, 2005).

<p>Oxydations de lipides et les conséquences</p> <ul style="list-style-type: none">➤ des interactions entre des ERO et des acides gras de la bicouche membranaire cytoplasmique peuvent mener à une porosité membranaire et à la mort cellulaire
<p>Oxydations de protéines et les conséquences</p> <ul style="list-style-type: none">➤ modifications d'acides aminés➤ fragmentation de la chaîne peptidique➤ agrégation de produits d'interactions protéines-ERO➤ modifications des charges électriques➤ risque de dégradation augmenté➤ perte des fonctions enzymatiques (p.ex. oxydations de centres Fe-S par O_2^-)➤ une oxydation d'acides aminés spécifiques peut servir de signal de dégradation pour certaines protéases➤ une oxydation d'acides aminés spécifiques peut conduire à des modifications structurales, à des interactions protéine-protéine
<p>Oxydation de l'ADN et les conséquences</p> <ul style="list-style-type: none">➤ délétions, mutations, translocations d'ADN➤ dégradations de bases, cassures mono-brins➤ interactions protéines-ADN

Cependant, à côté de ce caractère toxique immédiat, les ERO peuvent aussi agir en tant que messagers chimiques secondaires capables d'induire de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Une altération du potentiel redox peut être à l'origine de l'activation de la transcription de gènes antioxydants comme GST, γ GCL ou SOD2 ou de gènes inflammatoires comme IL-1b, IL-6, IL-8 ou COX2 par exemple. L'activation de ces gènes antioxydants voir inflammatoires se fait *via* activation de facteurs de transcription tels que AP-1, ATF, NF- κ B ou en passant par les voies de signalisation JNK et p38 MAPK.

1.8.3. Deux stratégies thérapeutiques anticancéreuses différentes à l'égard d'un stress oxydant

Les cellules tumorales étant caractérisées par une séquestration accrue d'ERO (surexpression des agents détoxifiants), deux stratégies thérapeutiques différentes se sont établies (Fruehauf and Meyskens, 2007): (1) comme presque toutes les catégories d'agents antioxydants connus à ce jour, et mentionnés ci-dessus, ont montré des effets protecteurs, préventifs contre l'initiation de la tumorigenèse (Caraballoso *et al.*, 2003; Cemek *et al.*, 2010; Jefremov *et al.*, 2007), l'emploi d'agents thérapeutiques ciblant une réduction des mécanismes de défense des cellules cancéreuses a été suggéré (Kinnula VL, 2004) (2) l'emploi d'agent à fort potentiel oxydant représente la seconde stratégie (Fleury *et al.*, 2002; Le Bras *et al.*, 2005): de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence qu'une hausse de la teneur intracellulaire en ERO peut jouer un rôle essentiel dans l'induction de l'apoptose (Tohyama *et al.*, 2004; Tripathi and Hildeman, 2004; Valko *et al.*, 2007) (Figure 14). Ainsi, dans la recherche de nouveaux agents anticancéreux, beaucoup d'importance a été attribuée à un éventuel potentiel oxydant pro-apoptotique. En tant qu'exemple, on peut citer la Plombagine, une naphthaquinone bicyclique naturelle qui a été utilisée dans la médecine ayurvédique asiatique, démontrée capable d'augmenter la quantité intracellulaire d'ERO et d'induire par la suite l'apoptose caspases-dépendante de kératinocytes (Inbaraj and Chignell, 2004), de fibroblastes embryonnaires murins (Nicotera *et al.*, 1992), de cellules de cancer cervical humain (ME-180) (Srinivas *et al.*, 2004) et plus récemment de cellules du système immunitaire (McKallip *et al.*, 2010). Outre la Plombagine, la Curcumine, une autre substance naturelle largement connue pour exercer un effet cytotoxique sur des cellules cancéreuses (Anto *et al.*, 2002), et notamment sur des cellules leucémiques (Sanchez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), induit une hyperproduction d'ERO dans les cellules tumorales (Liao *et al.*, 2008).

1.8.4. Une évaluation d'une possible induction de formation d'ERO par UNBS1450

Ainsi, à l'instar de ces deux exemples donnés de substances naturelles oxydantes pro-apoptotiques, une prochaine étape de notre étude va consister à évaluer le potentiel oxydatif de UNBS1450 dans nos lignées cellulaires leucémiques K562 et d'établir, si possible, un lien entre son potentiel oxydant et son potentiel pro-apoptotique. Pour ce faire nous avons eu recours à des agents chimiques comme la N-acétylcystéine (NAC), la buthionine sulfoximine (BSO) et l'acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Trolox). Des antioxydants comme la N-acétylcystéine (NAC) sont des outils prometteurs pour investiguer les rôles que jouent les ERO dans de nombreux processus biologiques et pathologiques : la NAC inhibe l'activation de la kinase c-Jun N-terminale, de la MAP kinase p38, de la protéine 1 activatrice (AP-1) et de NF- κ B redox-sensibles (Zafarullah *et al.*, 2003), régulant ainsi l'expression d'un grand nombre de gènes à fonctionnalités différentes, modifiant ainsi un profil prolifératif des cellules traitées en un profil différenciatif (Parasassi *et al.*, 2010). De plus, il est admis que la NAC exerce des effets anti-apoptotiques et de survie en activant des voies de signalisation kinase-dépendantes extracellulaires (Zafarullah *et al.*, 2003). D'un point de vue chimique, bien que la NAC fut toujours considérée comme étant capable de séquestrer directement des radicaux oxydants libres, des études récentes montrent qu'elle peut plutôt réduire des disulfures (Parasassi *et al.*, 2010) et interagir avec des dérivés d'acides sulféniques au sein de protéines (Parasassi *et al.*, 2010), empêchant de cette manière la formation de disulfures impliqués dans les signalisations redox. Complémentairement à la NAC, nous avons utilisé le Trolox en tant qu'antioxydant : étant un analogue amphiphile de la vitamine E, Trolox traverse la membrane cytoplasmique et procure aux cellules traitées une protection accrue contre des ERO (Diaz *et al.*, 2005). A l'inverse, l'emploi de la buthionine sulfoximine (BSO) nous permet d'analyser le rôle joué par le glutathion (GSH) dans l'induction de la mort cellulaire par voie apoptotique induite par UNBS1450 : BSO inhibe de façon irréversible la γ -glutamylcystéine synthétase, menant ainsi à une déplétion des cellules traitées en glutathion, métabolite indispensable à la protection contre un stress oxydant. Les cellules cancéreuses étant souvent caractérisées par une teneur élevée en glutathion les rendant résistantes à des agents alkylants, une déplétion des cellules tumorales en glutathion par la BSO peut potentialiser les effets cytotoxiques observés *in vitro* et *in vivo* de certains agents anticancéreux (National Cancer Institute, US National Institutes of Health) (Estrela *et al.*, 2006).

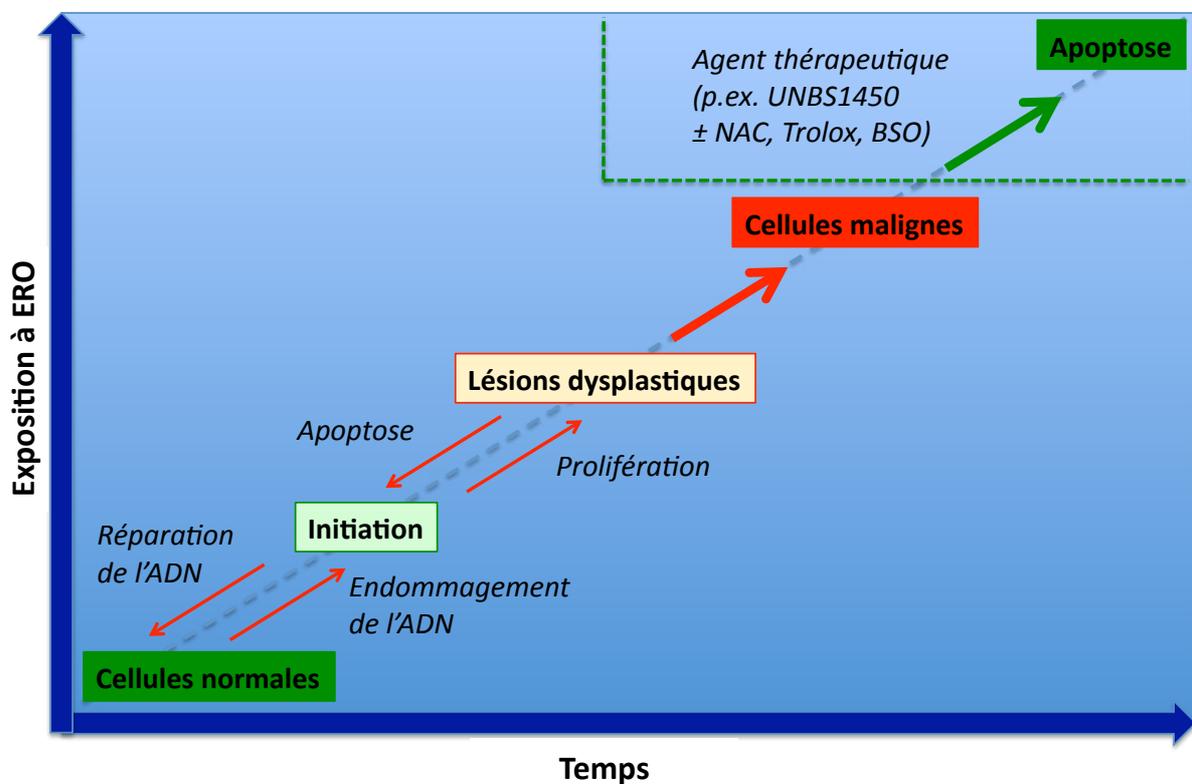


Figure 14. Une exposition chronique à des ERO est cancérogène (d'après Fruehauf and Meyskens, 2007, modifié)

Une exposition continue dans le temps de cellules normales (en vert) à des espèces réactives d'oxygène (ERO) peut conduire à une initiation de la cancérogenèse par endommagement de l'ADN. Une exposition excessive de cellules tumorales (en rouge) à des taux élevés d'ERO induits par des agents chimiothérapeutiques peut être bénéfique et entraîner l'apoptose (en vert) des cellules tumorales.

2. OBJECTIFS

Les données bibliographiques sur les potentiels anticancéreux de UNBS1450 sur les tumeurs solides soulignent l'importance de ce travail : Comparé à des agents chimiothérapeutiques communément employés pour traiter des tumeurs solides, UNBS1450 a montré des propriétés anti-tumorales *in vitro* et *in vivo* nettement accrues. L'objectif principal de notre étude est d'analyser à quelle mesure UNBS1450 est capable d'interférer avec une possible progression et multiplication de cellules leucémiques non adhérentes, telles que les cellules K562, U937 et Jurkat, en induisant notamment une mort cellulaire par apoptose. Notre travail s'inscrit parfaitement dans la thématique du laboratoire dont un objectif est d'identifier et de définir des mécanismes d'actions de nouvelles substances naturelles à effets anticancéreux.

Sachant qu'une apparition d'une masse cellulaire tumorale est souvent liée à un dysfonctionnement sévère au niveau de l'induction de la mort cellulaire par voie apoptotique, élément protecteur anti-tumoral essentiel, nous allons rechercher d'éventuels effets pro-apoptotiques de UNBS1450 sur des lignées cellulaires leucémiques. Plus particulièrement :

- a) Nous allons prendre en considération différentes lignées cellulaires issues de cancers du sang, à savoir les cellules K562 (leucémie myéloïde chronique), U937 (lymphome histiocytique) et Jurkat (leucémie aiguë à cellules T). En tant que cellules témoin saines, nous allons utiliser des cellules sanguines mononuclées issues de sang périphérique (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells).
- b) Notre premier objectif spécifique sera donc d'étudier les effets de UNBS1450 sur la viabilité des cellules leucémiques K562, U937 et Jurkat. Afin de trouver une réponse à cette question, nous utiliserons plusieurs approches complémentaires, notamment :
 - une approche qui aura pour but de mettre en évidence l'impact que possède UNBS1450 sur la prolifération cellulaire en culture à 37 °C.
 - une approche par cytométrie en flux qui consistera à analyser les effets de UNBS1450 sur le cycle cellulaire de nos cellules leucémiques.

- une approche quantitative de cellules apoptotiques faisant usage de la microscopie à fluorescence et de la cytométrie en flux.
 - afin de pouvoir conclure sur une possible induction d'un stress oxydant par UNBS1450, menant à la mort cellulaire par apoptose, nous allons prétraiter des cellules leucémiques K562 avec NAC, Trolox et BSO avant de les soumettre à un traitement par UNBS1450. Les pourcentages de cellules apoptotiques seront déterminés par microscopie à fluorescence.
- c) Le deuxième objectif spécifique consistera à élucider les mécanismes par lesquels une mort cellulaire par apoptose UNBS1450-induite des lignées cellulaires leucémiques sont effectués.
- une première approche aura comme but d'analyser par Western Blot les niveaux d'expression et de clivage des principales caspases initiatrices et effectrices impliquées dans les voies de signalisation intrinsèques et extrinsèques apoptotiques. De même, nous allons analyser les niveaux d'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.
 - complémentaiement et avec comme but d'expliquer les résultats obtenus, nous allons déterminer par RT-PCR les niveaux d'expression de l'ATPase Na^+/K^+ , enzyme fréquemment surexprimée dans des tumeurs solides, et avec laquelle UNBS1450 a été démontré interagir en se liant à la sous-unité $\alpha 1$, au sein de nos cellules leucémiques non adhérentes.
- d) Comme il est admis de nos jours que la voie de signalisation *via* le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle clé dans le développement d'un cancer, en procurant notamment une résistance accrue des cellules tumorales envers des agents anticancéreux, nous allons évaluer la capacité d'UNBS1450 de réduire aussi bien une activation constitutive qu'induite par $\text{TNF}\alpha$ de NF- κ B ; plusieurs techniques seront appliquées afin d'élucider l'impact de UNBS1450 sur NF- κ B :

- des études de l'activité de NF- κ B, assurées par électroporation et transfection des cellules K562 et Jurkat avec un vecteur plasmidique contenant un gène rapporteur luciférase placé sous contrôle NF- κ B, auront pour but d'identifier un possible effet répresseur de UNBS1450 sur l'activité NF- κ B. Des analyses par Western Blot permettront par la suite de mettre en évidence un éventuel effet de UNBS1450 sur la translocation des différents dimères constituant NF- κ B du cytoplasme cellulaire vers le noyau. Les études par Western Blot seront complétées par des études de retard sur gel (EMSA) qui permettront de conclure sur les effets que possède UNBS1450 sur l'activité liante de NF- κ B à l'ADN.
- nous allons étendre notre étude à une analyse par RT-PCR d'une possible influence de UNBS1450 sur des gènes impliqués dans une transduction de signal TNF α -induite et NF- κ B-médiée. Nous allons porter notre attention à des gènes impliqués dans l'activation et la régulation de NF- κ B et à des gènes dont l'expression est régulée par NF- κ B.
- e) Finalement nous analyserons les capacités de UNBS1450 d'agir en tant qu'agent anti-inflammatoire en déterminant par ELISA l'impacte de UNBS1450 sur le relargage de IL-8, interleukine transcrite par NF- κ B et hautement pro-inflammatoire.
- f) Suite aux résultats obtenus, nous envisageons de mettre en évidence un éventuel phénomène de synergie entre des médicaments éprouvés dans la thérapeutique anti-leucémique, ou anticancéreuse en général, et UNBS1450.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Lignées cellulaires

- La lignée THP-1 est une lignée établie à partir de cellules du sang périphérique d'un garçon âgé de 1 an atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë. Les cellules THP-1 expriment des récepteurs de Fc et de C3b et n'expriment pas certaines immunoglobulines de surface ou cytoplasmiques (Tsuchiya *et al.*, 1980).
- La lignée K562 est une lignée continue établie à partir des cellules d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique terminale, prélevées dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans (Lozzio and Lozzio, 1975). Il s'agit de cellules indifférenciées, capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes : érythroïde, granulocytaire ou monocyttaire. Les K562 possèdent le chromosome Philadelphie qui résulte de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Au cours de cette translocation, le protooncogène c-ABL normalement présent sur le chromosome 9 est fusionné au gène BCR sur le chromosome 22 (Woessmann and Mivechi 2001). Le gène hybride qui en résulte conduit à la synthèse d'une protéine de fusion BCR-ABL à forte activité tyrosine kinase (McGahon *et al.*, 1994).
- La lignée Raji a été établie à partir de cellules provenant de la glande maxillaire d'un patient africain de 11 ans atteint d'un lymphome de Burkitt en 1963 (Pulvertaft, 1964).
- La lignée Jurkat a été établie à partir des cellules périphériques d'un patient de 15 ans atteint d'une leucémie aiguë à cellules T en 1974 (Schneider *et al.*, 1977).
- La lignée U937 a été établie à partir de cellules malignes prélevées dans l'épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytique diffus en 1974 (Sundstrom and Nilsson, 1976). Les cellules U937 ont des propriétés de monocytes et expriment des marqueurs de cette lignée comme le récepteur au facteur C3 du complément.
- La lignée HEL a été établie à partir du sang périphérique d'un homme âgé de 30 ans atteint d'une érythroleucémie (Martin, P. et Papayannopoulou, 1982)
- La lignée HL-60 a été établie à partir du sang périphérique d'une femme âgée de 35 ans atteinte d'une leucémie myéloïde aiguë (Collins, 1977).
- La lignée Molt-3 a été établie à partir du sang périphérique d'un jeune homme âgé de 19 ans et atteint d'une leucémie lymphoblastique aiguë (Minowada et al., 1972)

- La lignée MEG-01 a été établie à partir du sang périphérique d'un enfant de 1 an atteint d'une leucémie monocytique aiguë (Tsuchiya et al., 1980)
- La lignée TF-1 a été établie à partir de la moelle osseuse d'un homme de 35 ans atteint d'une érythroleucémie (Kitamura et al., 1989)
- La lignée KBM5 a été établie à partir d'un patient atteint d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique (Beran et al., 1993)

Toutes les lignées cellulaires ont été fournies par DSMZ Allemagne et cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium), additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Lonza, Verviers, Belgium) et de 1 % (v/v) d'antibiotiques-antimycotiques (BioWhittakerTM), à 37 °C et avec 5 % de CO₂.

En tant que cellules contrôles, saines, la Croix Rouge (Luxembourg, Luxembourg) nous a gracieusement offert des dons sanguins sous forme de pochettes « Buffy Coat ». Après une dilution de 1/1, les constituants sanguins ont été séparés par du Ficoll et les cellules mononuclées ainsi isolées ont été mises en culture (2 x 10⁶ cellules/mL) pendant 24 h à 37 °C et 5 % CO₂ avant d'être soumises à un traitement.

3.2. Composés utilisés pour le traitement des cellules

- TNF α a été acheté chez Sigma et dilué à une concentration de 10 mg/mL dans du PBS 1X additionné avec de la BSA 0,5 % (m/v) selon les données du fournisseur. La concentration finale d'utilisation est de 20 ng/mL.
- UNBS1450 nous a été gracieusement fourni par Unibioscreen (Bruxelles, Belgique) : reçu sous forme de poudre sèche, UNBS1450, avec une masse moléculaire de 605,8 g, a été solubilisé dans un mélange DMSO/H₂O 5 : 95 de manière à obtenir une solution mère à 5 mM, congelée par la suite à - 20 °C. En ce qui concerne la synthèse chimique de UNBS1450, des racines et des parties du tronc de *C. procera* ont été soumises à une extraction méthanolique, suivie d'un fractionnement séquentiel dans de l'hexane, un mélange d'hexane/acétone 8 : 2, un mélange d'hexane/acétone 5 : 5, de l'acétone, un mélange d'acétone/méthanol 8 : 2 et dans du méthanol (Van Quaquebeke et al., 2005). Selon les taux de cytotoxicité accordés à chacune des fractions, des chromatographies en flash (gel Si ; éluant : CH₂-Cl₂/méthanol 98 : 2, avec des quantités croissantes de méthanol) ont été réalisées. Les deux substances l'uscharine et la 2''oxovoroscharine ont ainsi été isolées. Selon des études sur la relation structure-activité, des

modifications chimiques de la 2''oxovoruscharine ont abouti à la substances nommée UNBS1450(Mijatovic et al., 2007).

- La N-acétylcystéine (NAC) a été achetée chez Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique), solubilisée et diluée à une concentration stock de 500 mM dans du RPMI (sans additifs). La concentration finale d'utilisation est de 10 mM.

- La Buthionine sulfoximine (BSO) a été achetée chez Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique), solubilisée et diluée à une concentration stock de 50 mM dans de l'eau. La concentration finale d'utilisation est de 1 mM.

- Le Trolox a été acheté chez Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique), solubilisé et dilué à une concentration stock de 250 nM dans de l'éthanol. La concentration finale d'utilisation est de 1 mM.

- SP600125 a été acheté chez Calbiochem (VWR, Leuven, Belgique), solubilisé et dilué à une concentration stock de 20 mM dans du DMSO. La concentration finale d'utilisation est de 25 μ M.

3.3. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires leucémiques ont été cultivées dans du milieu RPMI (Lonza, Verviers, Belgique) additionné de sérum de veau fœtale à 10 % (v/v) (Lonza, Verviers, Belgique) et d'un mélange antibiotique/antimycotique (BioWhittaker™) à 37 °C et en atmosphère à 5 % de CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les 3 jours. Après décongélation, les cellules ont été cultivées pendant 10 jours avant de servir à des expériences. Selon les expériences, le milieu de culture des cellules a été changé un jour avant le traitement des cellules, de façon à éviter une éventuelle rupture du transcriptome. Les cellules ont été reprises à leur densité d'utilisation 1 h avant leur traitement.

Selon une méthode mise en œuvre au sein de notre laboratoire, l'emploi de diverses substances naturelles et l'étude de leurs effets sur les voies de signalisations nécessite une pré-incubation d'une durée variable en présence de la substance en question, avant d'activer les cellules. Pour UNBS1450, nous avons retenu une pré-incubation de 2 h. Nous avons traité les cellules avec des concentrations correspondant aux valeurs d'IC₅₀ préalablement déterminées pour les différentes lignées cellulaires pour une durée d'incubation de 24 h (Jurkat : 13,4 nM ; K562 : 39,8 nM ; U937 : 12,2 nM). A T₀, les cellules ont été prétraitées avec UNBS1450 appliqué à des concentrations variables. Selon l'expérience, à T₀ + 2 h les cellules ont été

activées par TNF α (20 ng/mL). Par la suite, les cellules ont été incubées à 37 °C pour des durées variables.

Contrairement aux essais de pré-traitement, les tests de traitements primaires avec UNBS1450 ont été réalisés exclusivement sur les lignées cellulaires K562 et U937. En se basant sur les valeurs obtenues pour les tests de viabilité, les cellules ont été traitées avec des concentrations variables de UNBS1450, et ceci pour des intervalles de temps donnés en fonction de l'expérience réalisée. Les concentrations de UNBS1450 utilisées sont indiquées.

3.4. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales a été réalisée en utilisant le kit « M-PER » (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce, Belgique). Un culot de 10×10^6 de cellules a été remis en suspension avec la solution M-PER additionnée de 40 μ l/mL de "complete", un mélange d'antiprotéases, à raison de 1 mL pour 100 mg de culot cellulaire. La lyse des cellules a été effectuée sous agitation pendant 10 min à température ambiante. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 4°C pendant 15 min à 14.000 g. La quantification des protéines contenues dans le surnageant a été réalisée par la méthode de Bradford {Bradford, 1976 #50}.

3.5. Extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques

Les facteurs nucléaires ont été extraits à partir de lots cellulaires, traités ou non, selon une méthode préalablement utilisée au sein du laboratoire (Duvoix et al., 2004). Les membranes plasmiques et nucléaires de 10^7 cellules ont été lysées dans des milieux détergents hypertoniques contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete®, Roche, Luxembourg). L'extraction a été réalisée sur de la glace afin d'éviter toute dégradation protéique. Les protéines contenues dans les extraits nucléaires et cytoplasmiques ont été dosées selon la méthode de Bradford.

3.6. Evaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide d'une coloration des cellules mortes par le Bleu de Trypan. Un compteur cellulaire du type Cedex (Roche, Bâle, Suisse) a été utilisé

afin de compter les cellules et de différencier cellules viables et cellules mortes. Complémentairement, un immunomarquage au Hoechst suivi d'une analyse en microscopie à fluorescence inversée DMIRB (Leica) a été utilisé afin de quantifier les cellules apoptotiques. Les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules non traitées et ont été indiquées en tant que pourcentage de cellules viables.

3.7. Transfections transitoires et étude de l'activité NF- κ B par gène rapporteur luciférase

Les transfections transitoires des cellules K562 et Jurkat ont été effectuées par électroporation en utilisant un Gene Pulser (BioRad). L'électroporation est une technique de perméabilisation de la membrane cellulaire par application directe d'une décharge électrique dans les conditions suivantes : 250 V et 500 μ F.

Pour chaque transfection, 250 mL de cellules suspendues dans du RPMI 0,1 % SVF (15×10^6 cellules/mL) ont été combinées avec 5 μ g du plasmide Renilla ph-RG-tk (Promega, Leiden, Pays Bas), 5 μ g d'un plasmide rapporteur luciférase contenant 5 sites NF- κ B consensus pGL4 (Promega, Leiden, Pays Bas). Après électroporation, les cellules ont été resuspendues dans du milieu de culture à 10 % de SVF et incubées pendant 24 h à 37 °C et 5 % CO₂. Après le temps d'incubation requis, les cellules ont été centrifugées et reprises dans du milieu frais (RPMI, 10 % SVF) à une concentration de 10^6 cellules/mL, solution à laquelle a été ajouté UNBS1450 à 40 nM pour un prétraitement de 2 h à 37 °C et 5 % de CO₂. Après le temps de prétraitement, les cellules ont été traitées par TNF α (20 ng/mL) pendant 6 h. Au bout des 8 h d'incubation totale, et afin de mesurer l'activité luciférase, 75 μ L de solutions cellulaires ont été prélevés, auxquels ont été ajoutés 75 μ L de l'agent Dual-GloTM Luciferase Reagent (Promega, Leiden, Pays Bas). Le tout a été incubé pendant 10 min à température ambiante avant que le signal luciférase ne soit mesuré. Par la suite, 75 μ L de Dual-GloTM Stop&Glo (Promega, Leiden, Pays Bas) ont été ajoutés ; une incubation de 10 min à température ambiante a été suivie d'une mesure du signal Renilla. Un luminomètre du type Orion (Berthold) a été utilisé pour déterminer les signaux luminescents. Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires de lumière et correspondent à l'activité luciférase rapportée à l'activité Renilla et ont été indiqués en tant que pourcentage relatif d'activité luciférase.

3.8. Dosage de IL-8 par un test ELISA en sandwich

La concentration de l'interleukine 8 (IL-8) humaine a été déterminée par un kit « Quantikine Human CXCL8/IL-8 colorimetric sandwich ELISA » (R&D Systems) et selon les indications du fournisseur.

10×10^6 cellules ont été centrifugées et le surnageant a été aliquoté dans des puits couverts en présence d'anticorps anti-IL-8. Après un temps d'incubation de 2 h et après 3 lavages, l'Ac secondaire polyclonal anti-IL-8 conjugué à la peroxydase du raifort (HRP) a été ajouté (100 μ L/puits) et incubé 60 min à température ambiante. Après 3 lavages, le substrat pour l'enzyme a été ajouté (200 μ L/puits de H_2O_2 + TMB), suivi d'une incubation à température ambiante pendant 30 min avant d'arrêter la réaction par addition de H_2SO_4 . La réaction enzymatique s'est traduite par l'apparition d'une couleur bleue qui est devenue jaune après arrêt de la réaction. L'intensité de l'absorption a été mesurée par spectrophotométrie (450 nm).

3.9. Etude de l'activité liante des facteurs de transcription par retard de migration sur gel

La mise en évidence des domaines de fixation des protéines sur l'ADN est essentielle à la compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Les extraits de protéines nucléaires ont été mis en présence de la sonde oligonucléotidique bicaténaire radiomarquée par du $\gamma^{32}P$.

Les complexes formés par liaison des facteurs de transcription sur leur site spécifique sur la sonde ont été séparés en fonction de leur poids moléculaire, les plus lourds ayant été les plus retardés sur le gel. Pour un fragment de taille donnée, la migration et donc la position du complexe ADN-protéine a été différente par rapport à celle de l'ADN libre. Les fragments d'ADN appelés sondes ont été préalablement marqués avec de l'ATP $\gamma^{32}P$. La position du complexe sonde-protéine sur le gel a ainsi pu être identifiée par autoradiographie.

Les séquences oligonucléotidiques (Eurogentec, Liège, Belgique) utilisées sont présentées dans le **tableau X**.

TABLEAU X. SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE RETARD SUR GEL.

Les noms des oligonucléotides, les séquences sens (s) et antisens (as) ainsi que leur taille ont été indiqués. Les sites de fixation des facteurs ont été soulignés en gras. La séquence NF-κB consensus a été issue du promoteur de la chaîne légère k des immunoglobulines.

Sondes NF-κB	Séquence	Taille (pb)
NF-κB consensus	(s) : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCCAGGC-3' (as) : 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'	23

Ces sondes ont été formées par hybridation de quantités équivalentes de brin sens et antisens **tableau X**. Les oligonucléotides simple brin lyophilisés ont été repris dans de l'eau ultrapure, puis 1500 ng de brin sens (+) et 1500 ng de brin antisens (-) ont été mis en présence l'un de l'autre dans 12 μL de tampon d'hybridation 5X, puis hybridés dans un thermocycleur selon la séquence de température suivante : 90 °C pendant 5 min (dénaturation), 65 °C pendant 10 min, 37 °C pendant 10 min, 20 °C pendant 10 min et 4 °C jusqu'au moment de précipitation. Les sondes ADN double brin ont ensuite été précipitées avec 0,1 volume d'acétate de Na (3 M) et 3 volumes d'éthanol à 100 % à -20 °C. Après une nuit, ce mélange a été centrifugé à 14000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant a été éliminé, puis le culot a été lavé avec 200 μL d'éthanol à 75 %. Après une centrifugation à 4 °C et à 14000 g pendant 10 min, le culot a été séché et repris dans 15 mL d' H_2O (200 ng/ μL).

Le marquage enzymatique des sondes a été réalisé par la polynucléotide kinase T4 (Roche, Bâle, Suisse) qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate en position γ de l'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ sur la terminaison 5' hydroxylée de l'ADN. Le marquage a été réalisé dans un mélange constitué de 2 μL d'oligonucléotides double brin, de 2 μL ATP $\gamma^{32}\text{P}$ (activité spécifique : 7000 Ci/mmol), d'un μL de polynucléotide kinase T4, de 2 μL de tampon kinase 10X (livré en accompagnement de la T4 kinase) et de 13 μL H_2O . Ce mélange a été incubé pendant 30 min à 37 °C et l'ADN double brin marqué a été purifié sur colonne de silice à l'aide du kit Qiaquick Removal Nucleotide (Qiagen), puis élué.

Une quantité de 0,2 ng de sonde radiomarquée a été incubée à 4 °C avec un mélange contenant 5 à 10 mg d'extraits nucléaires, de poly-dIdC à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (oligonucléotide synthétique qui permet par compétition d'éliminer les fixations non spécifiques des protéines à l'ADN cible), d'albumine de sérum de veau à 2 mg/mL (favorisant la formation de complexes) et de spermidine à 80 mM. Après 30 à 45 min d'incubation sur glace, les mélanges ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 5 %. Les complexes protéines/ADN formés ont alors été séparés par électrophorèse pendant 2 à 3 h à 16 mA dans du tampon TBE 0,5X. Le gel a ensuite été séché par aspiration sous vide avant d'avoir révélé par autoradiographie la séparation des complexes par mise en contact directe avec un film Kodak X-Omat. Le signal radioactif a été également visualisé et analysé grâce à un phosphorimager Cyclone (Canberra-Packard).

Les expériences de compétition ayant pour but de déterminer la spécificité des complexes obtenus, ont été réalisées avec un excès de sonde froide non marquée par rapport à la sonde marquée. Les facteurs nucléaires ont été incubés avec les deux sondes pendant 45 min à 4 °C et les échantillons ont ensuite été déposés sur gel.

Les expériences de supershift, permettant d'identifier la protéine formant le complexe retardé, ont été réalisées en incubant les facteurs nucléaires ainsi que les sondes avec des Ac spécifiques anti-p65 et anti-p50 utilisés à des concentrations de 200 µg d'IgG/0,1 mL. Si un complexe a été formé, il est migré plus lentement à cause de son poids moléculaire plus élevé (supershift). Il est cependant à noter que l'épitope reconnu par l'Ac a pu se situer au niveau du site de liaison à l'ADN et une disparition du complexe protéine-ADN a donc pu être observée ; il s'est agi alors d'une immunodéplétion.

3.10. Western blot

Les protéines totales, cytoplasmiques ou nucléaires ont été séparées d'après leur taille à l'aide d'une électrophorèse sur gel polyacrylamide dans des conditions dénaturantes assurées par du dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE). Un volume correspondant à 10 à 20 µg de protéines (protéines totales ou facteurs cytoplasmiques, nucléaires) a été mélangé à un volume équivalent de tampon dénaturant 2X, et dénaturé à 100° C au bain-marie pendant 5 min. L'électrophorèse des échantillons a été effectuée à 200V dans du tampon d'électrophorèse.

Après séparation, les protéines ont été transférées sur une membrane de PolyVinylideneDiFluoride (PVDF) (GE Healthcare, Pays-Bas) qui a été activée à une intensité de 100V pendant 1 h à température ambiante dans du tampon de transfert.

Après transfert, la membrane a été saturée dans du tampon contenant du PBS 1X, additionné de 0,1% Tween 20 (PBS-T) et 5% de lait écrémé, sous agitation pendant une nuit à 4°C. Après saturation, la membrane a été incubée en présence de l'Ac primaire dans du PBS-T additionné de 5% de lait pendant une nuit sous agitation à une température de 4 °C. La membrane a ensuite été lavée dans du PBS-T, puis incubée avec l'Ac secondaire (conjugué à une HRP) pendant 1h sous agitation à température ambiante. Après un dernier lavage par le

PBS-T, la membrane a été incubée avec le réactif chimioluminescent ECL Plus Western Blotting Detection System Kit® (GE Healthcare, Roosendaal, Pays Bas) et les protéines ont été visualisées sur un film d'autoradiographie (Hyperfilm™, GE Healthcare, Pays-Bas). Un dépôt équilibré des échantillons a été vérifié par β -actine ou encore lamine B et α -tubuline.

Les Ac et les dilutions utilisés pour nos expériences ont été précisés dans le **tableau XI**. Les Ac secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase de raifort (HRP).

TABLEAU XI. ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES POUR LES WESTERN BLOTS.

Protéine cible	Ac primaire	Ac secondaire
PARP	monoclonal de souris (BD Pharmigen), dilué au 1/2000 ^e	anti-souris (Santa Cruz), dilué au 1/5000 ^e
Caspase-3	monoclonal de souris (Santa Cruz), dilué au 1/1000 ^e	anti-souris (Santa Cruz), dilué au 1/4000 ^e
Caspase-8	monoclonal de souris (Cell Signaling), dilué au 1/1000 ^e	anti-souris (Santa Cruz), dilué au 1/4000 ^e
Caspase-9	polyclonal de lapin (Cell Signaling), dilué au 1/1000 ^e	anti-lapin (Santa Cruz), dilué au 1/4000
XIAP	monoclonal de souris (BD Transduction Laboratories), dilué 1/1000 ^e	anti-souris (Santa Cruz), dilué au 1/5000 ^e
Actine	monoclonal de souris (Sigma-Aldrich), dilué au 1/5000 ^e	anti-souris (Santa Cruz), dilué au 1/10000 ^e

3.11. Etude de Bak/Bax par microscopie à fluorescence

Cette technique a été utilisée pour visualiser le niveau d'expression des protéines liées à l'apoptose. 24h après traitement des cellules U937 avec UNBS1450 10, 15, 20 et 30 nM, les cellules U937 ont été lavées par du PBS 1X, puis incubées avec des anticorps (Ac) fluorescents spécifiques.

Après traitement, 10×10^6 cellules ont été fixées par 250 μ l de Cytotfix/Cytoperm 1X (BD Biosciences) et incubées à l'obscurité à 4 °C pendant au moins 20 min. Après deux lavages avec 500 μ L par du Cytowash 1X (BD Biosciences), les échantillons furent centrifugés pendant 7 min à 350 g ; après avoir enlevé complètement les surnageants, les culots ont été repris dans 60 μ L de solution Cytowash 1X (BD Biosciences). L'Ac primaire a été ajouté, suivi d'une incubation de 24 h à 4 °C à l'obscurité et sous agitation. Ensuite, les échantillons ont été lavés deux fois avec 500 μ L de Cytowash 1X (centrifugation 7 min à 350 g) ; les culots ont à nouveau été repris dans 60 mL de Cytowash 1X et l'Ac secondaire a été ajouté. Le tout a été incubé à l'obscurité pendant 30 min sous agitation et à température ambiante. Ensuite, les préparations ont été lavées deux fois avec 500 μ L de Cytowash 1X, les culots (centrifugation 7 min à 350 g) ont été repris dans 100 mL d'une solution PBS 1X/Hoechst (1 μ L/mL). Afin de visualiser les noyaux, les cellules ont été incubées pendant 15 min à 37°C ou bien au moins 30 min à 4 °C.

Par la suite, un aliquot de 6 μ L a été observé à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence Cell^M (Olympus), équipé avec des filtres appropriés et une caméra CCD ; l'analyse des images a été effectuée avec le logiciel d'images Cell^M (Olympus).

TABLEAU XII. ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES EN IMAGERIE A FLUORESCENCE.

Protéine cible	Ac primaire	Ac secondaire (fluorescent)
Bax	polyclonal de lièvre (Santa Cruz), dilué au 1/50 ^e	anti-lièvre (Invitrogen/Molecular Probes), dilué au 1/50 ^e , vert
Bax activée	monoclonal de souris (Santa Cruz), dilué au 1/40 ^e	anti-souris (Invitrogen/Molecular Probes), dilué au 1/50 ^e , rouge
Bak	monoclonal anti-souris (Calbiochem), dilué au 1/40 ^e	anti-souris (Invitrogen/Molecular Probes), dilué au 1/50 ^e , vert

3.12. Analyse de mort cellulaire par apoptose

Les modalités de mort cellulaire ont été déterminées par analyse de fragmentation nucléaire. Le pourcentage de cellules apoptotiques a été déterminé par microscopie à fluorescence (Olympus, Cell^M), par analyse des parties nucléaires colorées au Hoechst ADN spécifique (Sigma, 33342), comme décrit préalablement (Arena et al., 2003). 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>).

Après les temps et les doses de traitement indiqués, les cellules ont été soumises à une analyse de l'exposition de la phosphatidylsérine à l'aide d'un kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II (Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgique) selon les indications données par le fournisseur. Les échantillons marqués ont été analysés par FACS (FACS Calibur, Becton Dickinson, San José, CA, USA). Les valeurs ont été enregistrées à l'aide de CellQuest (<http://www.bdbiosciences.com/features/products>) avant d'être analysées.

3.13. Extraction d'ARN total

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 3×10^6 cellules traitées ou non. Les cellules ont été lavées par du PBS 1X puis centrifugées à 350 g pendant 7 min. La lyse cellulaire et l'isolation de l'ARN total ont été exécutées à l'aide d'un kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Les ARN totaux purs ont finalement été élués avec de l'eau et quantifiés par spectrophotométrie (Nanodrop).

3.14. RT-PCR

5 mg d'ARN totaux ont été soumis à une transcription inverse en utilisant un kit « SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR » (Invitrogen). Les ADNc issus de la transcription inverse ont été mélangés au mix « Power SYBR Green PCR Master Mix » (Applied Biosystems, Halle, Belgique) 1X et aux amorces sens et antisens (Eurogentec,

Liège, Belgique), spécifiques de la sous-unité α de l'ATPase Na^+/K^+ , présentées dans le **tableau XIII**. L'amplification a été réalisée dans un appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Halle, Belgique). Les produits de PCR ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, contenant du bromure d'éthidium dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE) 1X. Finalement, les données ont été analysées par la méthode du $\Delta\Delta\text{C}_T$ et les valeurs brutes ont été normalisées par rapport à la GAPDH.

3.15. Analyse de gènes reliés à NF- κ B par Superarray

5 μg des ARN totaux ont été soumis à la transcription inverse en utilisant le kit « ReactionReady™ First Strand cDNA Synthesis Kit (C-01) » (Superarray, Tebu-bio). Les ADNc issus de la transcription inverse ont été mélangés au mix « RT² Real-Time™ SYBR Green/ROX PCR Master Mix » (Superarray, Tebu-bio), contenant le tampon Real-Time PCR, l'ADN Taq polymérase HotStart, des nucléotides, le colorant SYBR® Green et le colorant de référence ROX nécessaire à une normalisation des optiques de l'instrument. Ce mélange a ensuite été aliquoté dans les puits d'une plaque à 96 puits, dans lesquels des amorces pour 84 gènes reliés à la voie de signalisation NF- κ B, 5 gènes de ménage et 2 contrôles négatifs (RT² Profiler™ PCR Array, Superarray, Tebu-bio) ont été préfixés. L'amplification a été réalisée dans un appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Halle, Belgique). Finalement, les données ont été analysées par la méthode du $\Delta\Delta\text{C}_T$ et les valeurs brutes ont été normalisées par rapport à la moyenne des 5 gènes de référence.

TABLEAU XIII. SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES EXPERIENCES D'AMPLIFICATION PAR RT-PCR.

ARNm	Séquences	Oligonucléotides	Taille (pb)
Sous-unité α de l'ATPase Na^+/K^+	5'-CTA-CCT-GGC-TTG-CTC-TGT-CC-3'	Sens	20
	5'-GCT-GAC-TCA-GAG-GCA-TCT-CC-3'	Antisens	
GAPDH	5'-ACA-GTC-AGC-CGC-ATC-TTC-TT-3'	Sens	132
	5'-ACG-ACC-AAA-TCC-GTT-GAC-TC-3'	Antisens	

3.16. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Chaque expérience représente la moyenne de trois essais \pm SEM. Le test statistique utilisé pour l'analyse de nos expériences est le test paramétrique t de Student.

4. RESULTATS

Comme présenté dans l'introduction bibliographique, UNBS1450 est un agent anticancéreux prometteur : lors d'études *in vitro*, UNBS1450 s'était montré significativement plus cytotoxique (IC_{50} de l'ordre de grandeur nanomolaire) dans le traitement de lignées cellulaires cancéreuses humaines issues de tumeurs solides (glioblastomes, prostate, NSCLC, poumons) que des agents anticancéreux établis (CPT11, SN-38, étoposide, oxaliplatine). *In vivo* l'efficacité de UNBS1450 en tant qu'agent thérapeutique a été prouvée sur des modèles murins de xénogreffes. De plus, d'un point de vue moléculaire, les travaux réalisés expliquaient les effets cytotoxiques observés sur des lignées cellulaires tumorales, souvent apoptose-résistantes, par une induction de mort cellulaire autophagique.

Nous sommes les premiers à étudier les effets de UNBS1450 sur des cellules leucémiques non adhérentes et de définir ses mécanismes d'actions.

4.1. Effet de UNBS1450 sur la viabilité de cellules leucémiques

Le premier emploi de UNBS1450 consistait à évaluer son impact sur la viabilité des lignées cellulaires leucémiques considérées. Nous avons ainsi incubé les cellules K562 et U937 pendant 24 h à 37 °C en présence de concentrations variables de UNBS1450 allant de 0 à 100 nM. Comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes, après les 24 h d'incubation, 75 μ L de chaque culture furent transmis dans un puits d'une plaque à 96 puits. Suivant une courte durée d'équilibration à température ambiante, un volume équivalent (75 μ L) de CellTiter-Glo® fut ajouté. Le principe d'action du CellTiter-Glo® est l'émission d'un signal luminescent, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans les cellules. Le mélange réactionnel fut homogénéisé par un agitateur et le signal luminescent fut stabilisé à température ambiante pendant 10 min. La luminescence émise par chaque échantillon, et mesurée par luminomètre (Berthold), nous a permis d'évaluer la viabilité cellulaire pour tous nos échantillons.

Pour les cellules K562, nous avons pu observer un effet de UNBS1450 sur la viabilité à partir d'une concentration de 30 nM (Figure 15). Une concentration voisine de 50 nM (IC_{50} : 56,7 nM) permet de réduire la viabilité cellulaire de 50 %. Un maximum de 70 % de

répression fut obtenu par la présence d'UNBS1450 à 100 nM. Nous avons également pu voir que, comparé à la viabilité des cellules non traitées, l'emploi de UNBS1450 à des concentrations faibles (jusqu'à 20 nM) n'a pas d'influence significative sur la viabilité.

Les cellules U937 se sont montrées plus sensibles à UNBS1450 que les cellules K562 : le profil du graphique obtenu (Figure 17) ne montre pas de plateau pour les traitements à faibles concentrations comme ce fut le cas pour les cellules K562. La présence de UNBS1450 à une concentration de 20 nM cause une régression d'environ 25 % de la viabilité cellulaire. Une augmentation de la concentration de UNBS1450 à 30 nM fait chuter la viabilité d'environ 70 %, avec un maximum de ≥ 90 % obtenu avec une concentration de 100 nM de UNBS1450 (IC_{50} : 25,4 nM).

Une première conclusion que nous pouvons tirer de ces expériences est que UNBS1450 réduit la viabilité cellulaire de nos lignées cellulaires leucémiques modèles K562 et U937 et que l'impact de UNBS1450 sur la viabilité est concentration-dépendant.

4.2. UNBS1450 induit une mort cellulaire par apoptose des cellules K562 et U937

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la modalité et à la mécanistique de mort cellulaire induite par UNBS1450. Une stimulation des cellules K562 et U937 par des concentrations variables de UNBS1450 pendant des durées d'exposition variables, suivie d'une coloration par le Bleu de Trypan, nous a d'abord permis de vérifier l'impact de UNBS1450 sur la prolifération cellulaire. La Figure 16A nous permet de voir que pour la lignée K562 une incubation des cellules en présence de UNBS1450 à une concentration de 10 nM n'entraîne pas de régression significative de la prolifération cellulaire par rapport aux cellules non traitées, les temps d'incubation ne changeant en rien les effets constatés. Ces résultats confirment ce que nous avons observé précédemment lors des études de viabilité cellulaire, avec un profil en plateau pour les cellules K562 traitées avec des concentrations plutôt faibles d'UNBS1450. En augmentant la concentration de UNBS1450 à 30 et à 50 nM, nous avons pu constater un effet cytotoxique avec une diminution de la multiplication cellulaire, et ceci d'une manière temps-dépendant : au bout de 24 h de traitement avec UNBS1450 appliqué à 50 nM, nous avons compté un taux de régression de la croissance cellulaire approchant les 50 %. En prolongeant les temps d'incubation à 48 voire

72 h, nous avons assisté à une nette augmentation de l'effet inhibiteur de UNBS1450, avec presque 100 % de mort cellulaire après 72 h de traitement. A une concentration de 30 nM, nous observons plutôt un effet cytotatique, la densité cellulaire restant sensiblement inchangée le long du temps d'incubation.

Suite à ces observations, nous avons procédé à une analyse de l'effet de UNBS1450 sur le cycle cellulaire (Figure 16B). Un temps d'incubation des cellules K562 pendant 24 h en présence de UNBS1450 50 nM entraîne une entrée dans un phase préG1 d'une fraction estimée à 80 % de la population cellulaire. Pour les concentrations plus faibles en UNBS1450, l'effet est moins important : à 10 nM, l'état global de la population cellulaire reste quasiment inchangé. UNBS1450 présent à 20 nM entraîne une nette réduction en nombre de cellules en phases G0/G1 (environ 30 % contre 45 à 50 %).

Au point C de la Figure 16, nous montrons des images de cellules K562 non traitées et traitées par UNBS1450 50 nM pendant 24 h. Nous mettons ainsi en évidence pour la première fois un caractère pro-apoptotique de UNBS1450. Les images prises par microscopie optique à fluorescence révèlent les caractéristiques typiques de cellules apoptotiques, à savoir une régression générale en volume et une fragmentation nucléaire typique. Nous pouvons constater qu'il y a une nette différence entre cellules non traitées viables à 100 % et cellules traitées pendant 24 h par 50 nM de UNBS1450 que nous avons estimé par comptage être apoptotiques à ≥ 70 %.

Des analyses par cytométrie en flux ont permis d'approfondir les résultats obtenus précédemment : un double marquage par Annexine V-FITC et PI (iodure de propidium), deux marqueurs typiques de cellules entrées en apoptose (marquage positif pour Annexine V-FITC) et nécrotiques (marquage positif pour PI) de cellules traitées ou non par différentes concentrations d'UNBS1450, nous a permis d'identifier des cellules apoptotiques. Annexine V, une protéine de 35-36 kDa Ca^{2+} dépendante, à forte affinité pour des phospholipides, notamment pour la phosphatidylsérine, est transloquée dans le feuillet extérieur de la membrane plasmique dans les cellules apoptotiques. Un anticorps anti-Annexine V conjugué à un fluorochrome tel que FITC sert donc de marqueur positif de cellules apoptotiques. L'emploi de PI permet de différencier les cellules en apoptose précoce et les cellules en état de mort cellulaire tardive ou nécrose : l'apoptose précoce est caractérisée par une membrane plasmique intacte, excluant ainsi toute entrée de PI, tandis qu'en état de mort cellulaire tardive

par apoptose, la membrane est devenue perméable au PI conduisant ainsi à un marquage positif de l'ADN des cellules au PI. La Figure 16D montre que par rapport aux cellules K562 contrôle (5 % de cellules Annexine V⁺ PI⁻, 8 % de cellules Annexine V⁺PI⁺) un traitement par les différentes concentrations d'UNBS1450 accroît le nombre de cellules Annexine V⁺ PI⁻ (en apoptose précoce) et Annexine V⁺ PI⁺ (en apoptose tardive). Les traitements par 10 et 30 nM d'UNBS1450 engendrent respectivement 5 et 10 % de cellules Annexine V⁺PI⁻, cellules en apoptose précoce, et 5 respectivement 8 % de cellules Annexine V⁺ PI⁺, cellules en apoptose tardive. Le taux total de cellules apoptotiques (cellules Annexine V⁺ PI⁻ et cellules Annexine V⁺ PI⁺) culmine à 65 % pour les échantillons traités avec UNBS1450 à une concentration de 50 nM (38 % de cellules Annexine V⁺ PI⁻ et 27 % de cellules Annexine V⁺PI⁺). Nous notons un taux considérable de cellules en apoptose tardive (Annexine V⁺PI⁺), surtout dans les échantillons traités avec UNBS1450 50 nM (27 %). Pour les échantillons traités avec les concentrations moins importantes, les taux de cellules en apoptose tardive (5 et 8 %) ne diffèrent pas du taux détecté dans les échantillons contrôle non traités (8 %).

La Figure 18 résume ces mêmes expériences répétées à l'identique sur les cellules U937, pour lesquelles des résultats similaires ont été obtenus.

Sous le point A on peut voir qu'un traitement de 24 h par UNBS1450 à une concentration de 20 et 30 nM réduit de respectivement 50 et 70 % la prolifération cellulaire. En prolongeant les temps d'incubation, on retrouve l'effet temps-dépendant observé pour les cellules K562. Avec les concentrations les plus fortes employées pour les cellules U937, les pourcentages de régression de la prolifération cellulaire atteignent des valeurs allant de 80 à 100 % après 48 et 72 h de traitement. De nouveau, à l'inverse des cellules K562, on note l'absence de seuil de sensibilité : un traitement de 24 h par UNBS1450 15 nM non seulement permet aussi bien d'atteindre un taux de 30 % de ralentissement de la croissance cellulaire qu'un traitement de 72 h par UNBS1450 10 nM, mais suffit pour induire une diminution de 90 % après 72 h d'incubation. La relation temps de traitement – taux d'inhibition de la prolifération est plus marqué pour les cellules U937 que pour les cellules K562.

L'analyse de l'impact de UNBS1450 sur le cycle cellulaire montre qu'il y a une accumulation de cellules en phase préG1, et ceci en fonction de la concentration de UNBS1450, avec une entrée en effet de UNBS1450 à partir d'une concentration de 15 nM (environ 40 % de cellules en phase préG1). Des concentrations de 20 et 30 nM de UNBS1450

augmentent le pourcentage de cellules bloquées dans la phase préG1 à des valeurs estimées respectivement à ≥ 70 et ≥ 80 % (Figure 18B).

La Figure 18C illustre le fait que l'effet pro-apoptotique de UNBS1450 mis en évidence sur des cellules K562 reste valable pour les cellules U937. Une stimulation des cellules par UNBS1450 présent à 30 nM dans le milieu de culture pendant 24 h entraîne un taux apoptotique ≥ 70 %. Comme pour les expérience précédentes, l'effet observé est dose-dépendant, mais linéaire pour les cellules U937 : un traitement avec UNBS1450 10 nM n'élève que faiblement le taux apoptotique comparé aux cellules contrôles (10 % contre 5 %, valeurs estimées). Pour des traitements avec 15 et 20 nM, nous obtenons des pourcentages de cellules apoptotiques tournant respectivement autour de 30 et 60 %.

De même, comme pour les cellules K562, nous avons procédé à un double marquage des cellules U937 par Annexine V et PI. Par rapport aux cellules non traitées (5,5 % de cellules Annexine V⁺PI⁻ en apoptose précoce et 3,9 % de cellules Annexine V⁺PI⁺ en apoptose tardive), un traitement par UNBS1450 10, 15, 20 et 30 nM provoque une entrée en apoptose (cellules Annexine V⁺PI⁻) de 3,5, 7,8, 11,2 et de 26,7 % respectivement et des taux de 6, 9,7, 32,1 et 32,3 % de cellules apoptotiques tardives (Annexine V⁺PI⁺). Ainsi on atteint presque le seuil de 60 % de mort cellulaire par la voie apoptotique au bout des 24 h d'incubation en présence de UNBS1450 à 20 nM (Figure 18D).

En résumé, cette expérience nous a permis de conclure que non seulement UNBS1450 induit la mort cellulaire par voie apoptotique, et ceci aussi bien dans les cellules K562 que U937, mais aussi que UNBS1450 est efficace dans un domaine de concentrations de l'ordre du nM. Pour les cellules K562, nous avons mis en évidence un seuil de sensibilité situé aux alentours de 20 nM, tandis que les cellules U937 se sont montrées plus sensibles, avec un seuil de sensibilité situé aux alentours de 15 nM. Au delà de ces seuils, dans le cas des lignées cellulaires K562 et U937, UNBS1450 entraîne une mort cellulaire par voie apoptotique. Nous avons défini comme adéquates des concentrations en UNBS1450 de 40 nM pour le traitement des cellules K562 et de 20 nM pour le traitement des cellules U937.

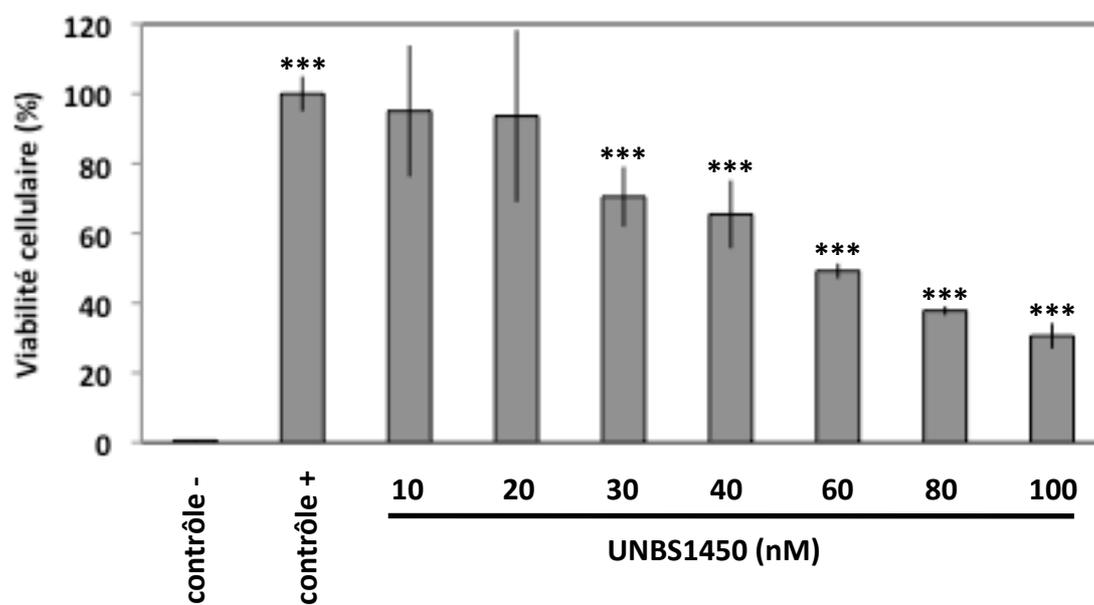
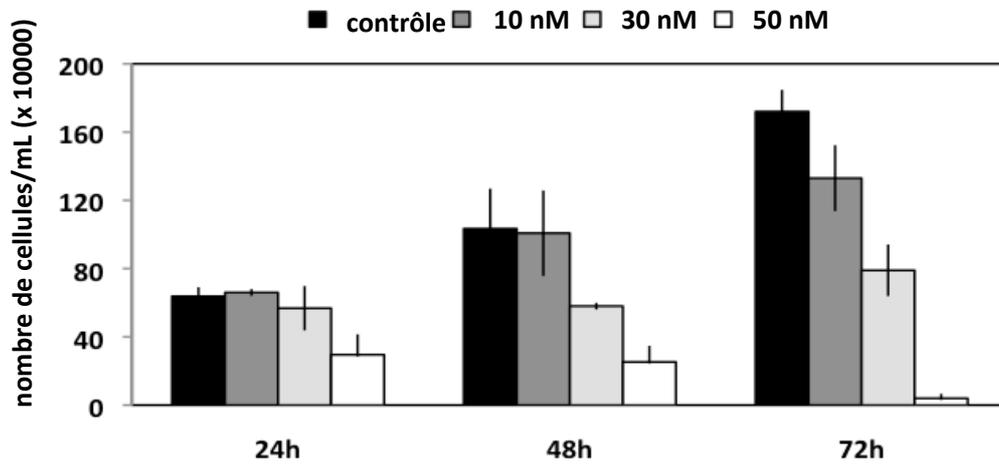


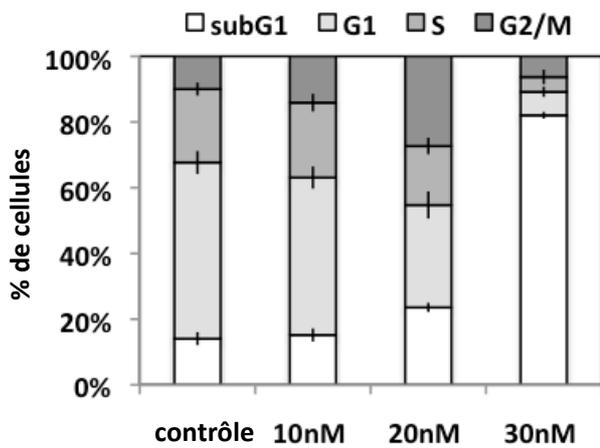
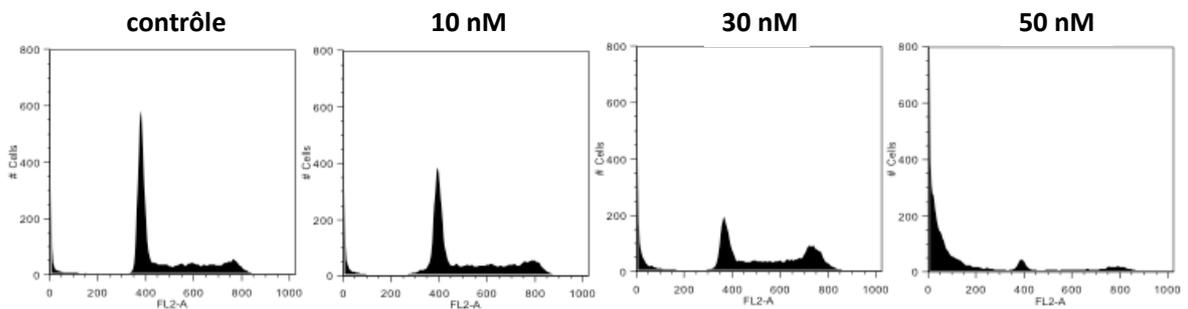
Figure 15. Analyse de l'effet de UNBS1450 sur la viabilité des cellules K562

La quantification de l'ATP au bout de 24 h d'incubation en présence de UNBS1450 (0 à 100 nM) permet de déterminer l'activité métabolique des cellules.

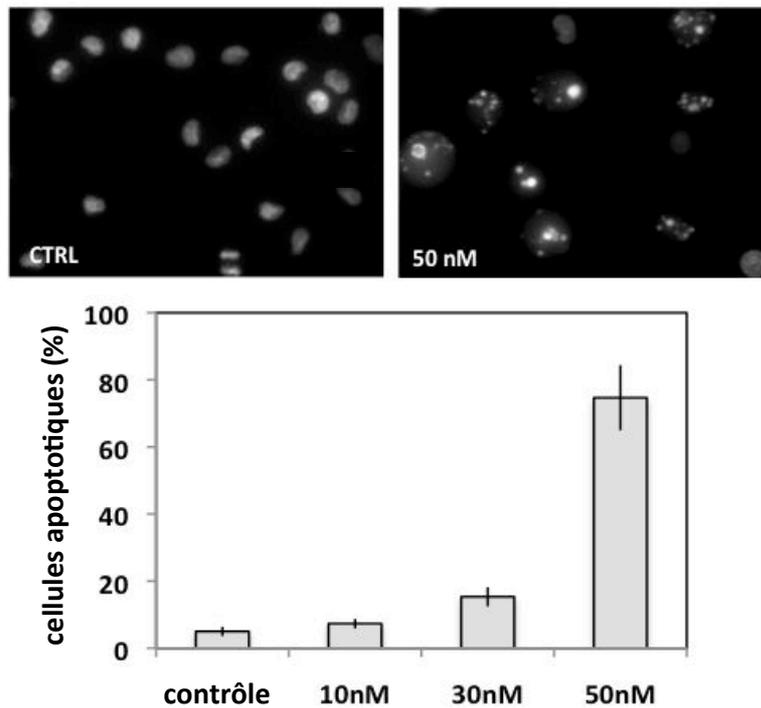
A.



B.



C.



D.

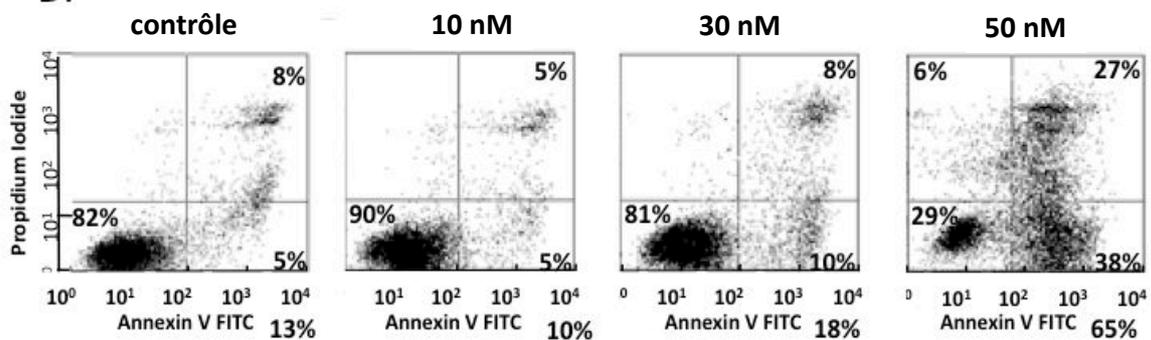


Figure 16. Etude de la modalité de mort cellulaire induite par UNBS1450 sur les cellules K562.

(A) détermination de la prolifération cellulaire par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan; (B) analyse du cycle cellulaire avec quantification des populations cellulaires ; (C) identification de cellules apoptotiques par coloration au Hoechst ; (D) détermination du pourcentage de cellules apoptotiques en fonction de la concentration en UNBS1450 par marquage par Annexine V/PI

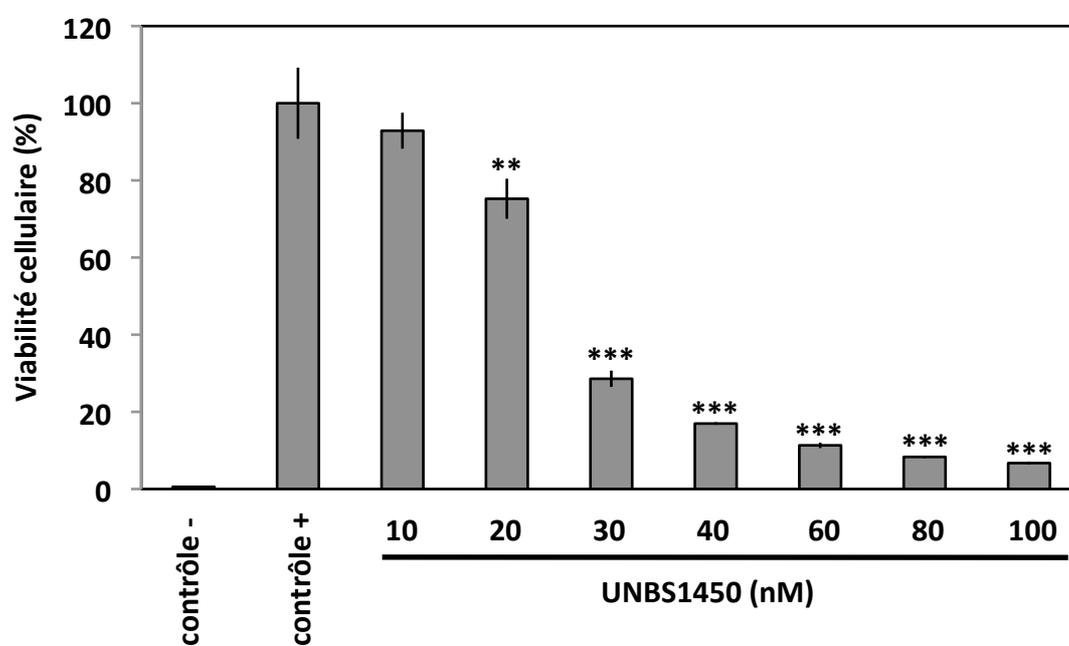
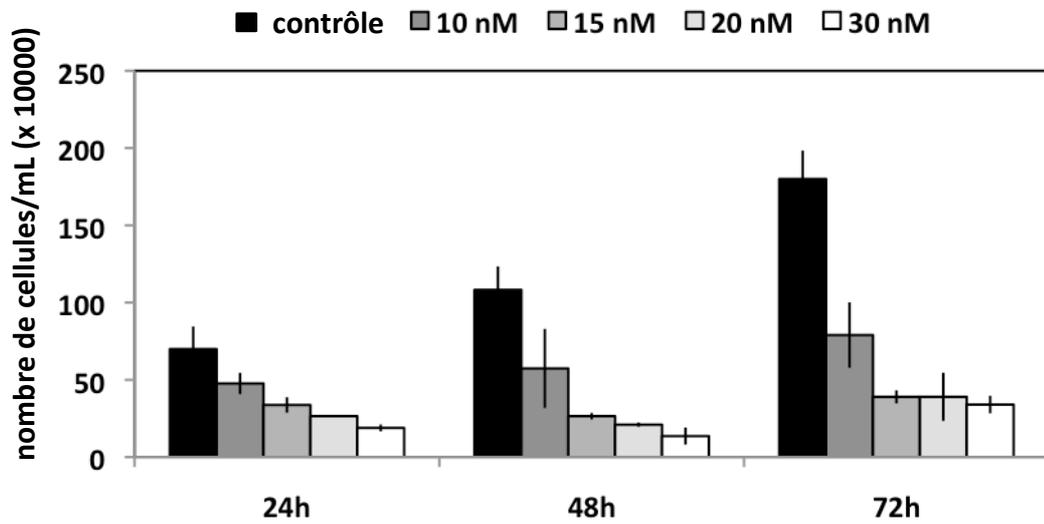


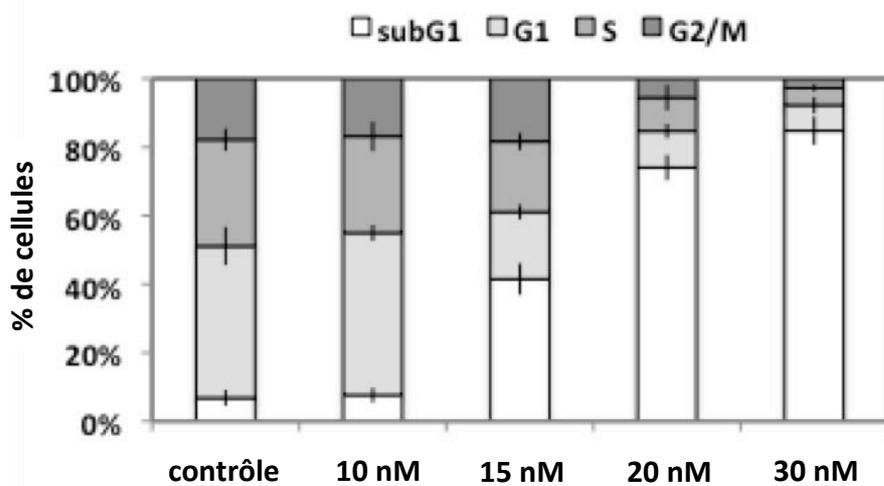
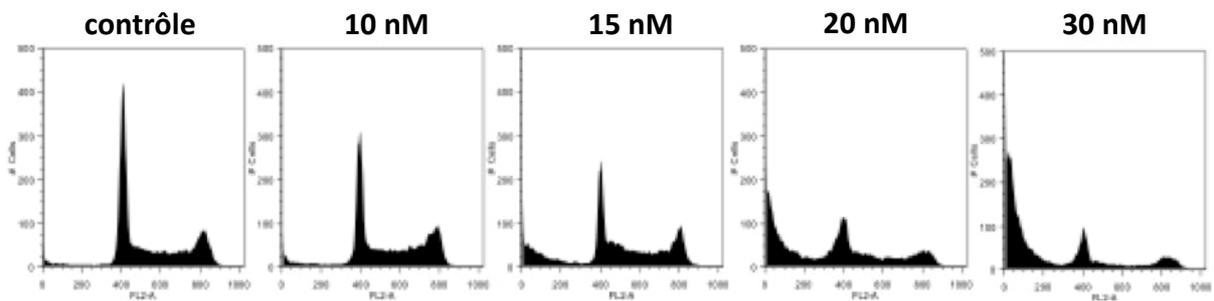
Figure 17. Test de viabilité des cellules U937.

La quantification de l'ATP au bout de 24 h d'incubation en présence de UNBS1450 (0 à 100 nM) permet de déterminer l'activité métabolique des cellules.

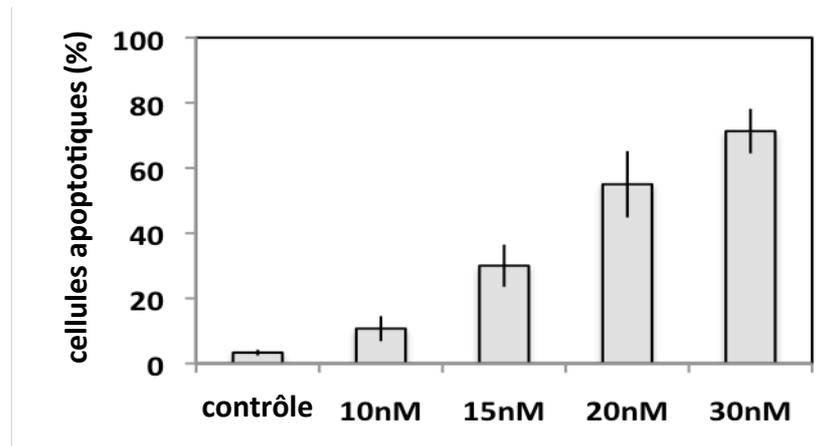
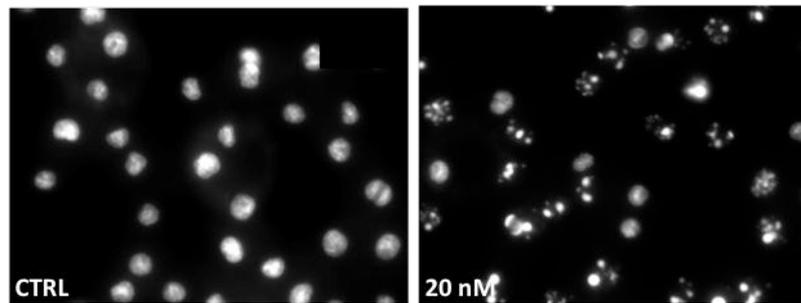
A.



B.



C.



D.

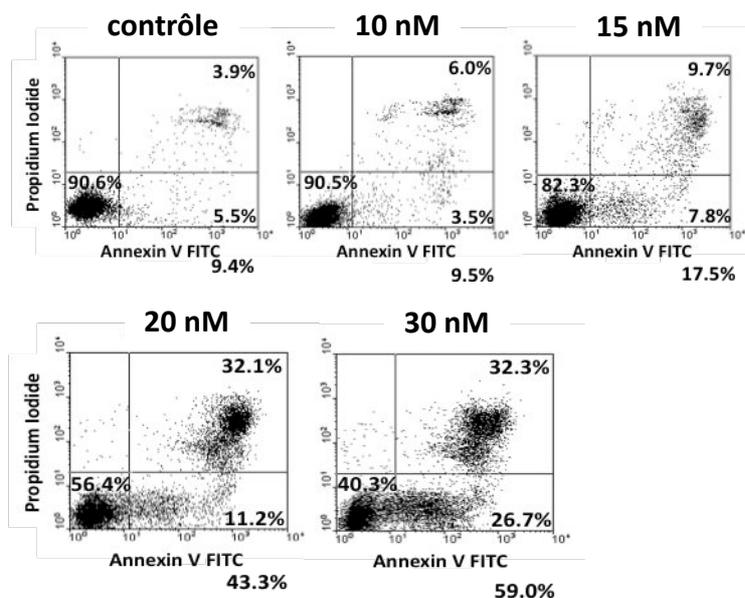


Figure 18. Etude de la modalité de mort cellulaire induite par UNBS1450 sur les cellules U937.

(A) détermination de la prolifération cellulaire par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan; (B) analyse du cycle cellulaire avec quantification des populations cellulaires ; (C) identification de cellules apoptotiques par coloration au Hoechst ; (D) détermination du pourcentage de cellules apoptotiques en fonction de la concentration en UNBS1450 par marquage par Annexine V/PI

4.3. UNBS1450 exerce un effet cytotoxique spécifique des cellules tumorales

Dans la mesure où une spécificité pour les cellules cancéreuses constitue un élément essentiel dans le développement de nouveaux agents anticancéreux, nous avons appliqué UNBS1450 à des concentrations variables à des cellules saines, à savoir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs).

Comme nous l'avons indiqué dans la partie Matériel et Méthodes, 24 h après la mise en culture des cellules PBMCs, nous les avons traitées pendant 24 h par différentes concentrations de UNBS1450 (0 – 100 nM). A la fin du temps d'incubation, les volumes d'échantillons ont été divisés en deux : dans le but de déterminer l'intégrité cellulaire, une moitié des échantillons a été colorée au Bleu de Trypan (Figure 19, en haut), tandis que l'autre moitié a été marquée par Hoechst afin de déterminer les pourcentages de cellules apoptotiques (Figure 19, en bas). Pour toutes les concentrations prises en considération, UNBS1450 n'a changé en rien la perméabilité au Bleu de Trypan des membranes cellulaires, suggérant que UNBS1450 n'altère pas la viabilité des cellules PBMCs. Ces résultats ont par la suite été confirmés par une quantification des cellules apoptotiques : les effets observés suite au traitement par UNBS1450 aux concentrations ≤ 100 nM, ne sont que minimes. Ainsi nous retenons que pour les cellules PBMCs non traitées nous avons évalué le taux de cellules apoptotiques comme étant légèrement supérieur à 3 %, tandis que UNBS1450 appliqué à 50 nM entraîne une induction de l'apoptose dans 10,8 % des cas. En augmentant la concentration de UNBS1450 à 100 nM, concentration bien supérieure à celles employées pour les lignées cellulaires leucémiques, nous avons mesuré un taux apoptotique approchant les 16 %. Il est important de noter que ce pourcentage reste sensiblement en dessous de ce que nous avons obtenu en terme d'apoptose pour les cellules néoplasiques (p.ex. > 60 % pour les cellules U937 traitées par UNBS1450 30 nM).

Suite aux résultats observés, nous pouvons donc affirmer que les effets cytotoxiques, pro-apoptotiques, observés pour les lignées cellulaires leucémiques K562 et U937 sont donc spécifiques de ces cellules néoplasiques ; la cytotoxicité collatérale exercée sur les cellules saines est négligeable.

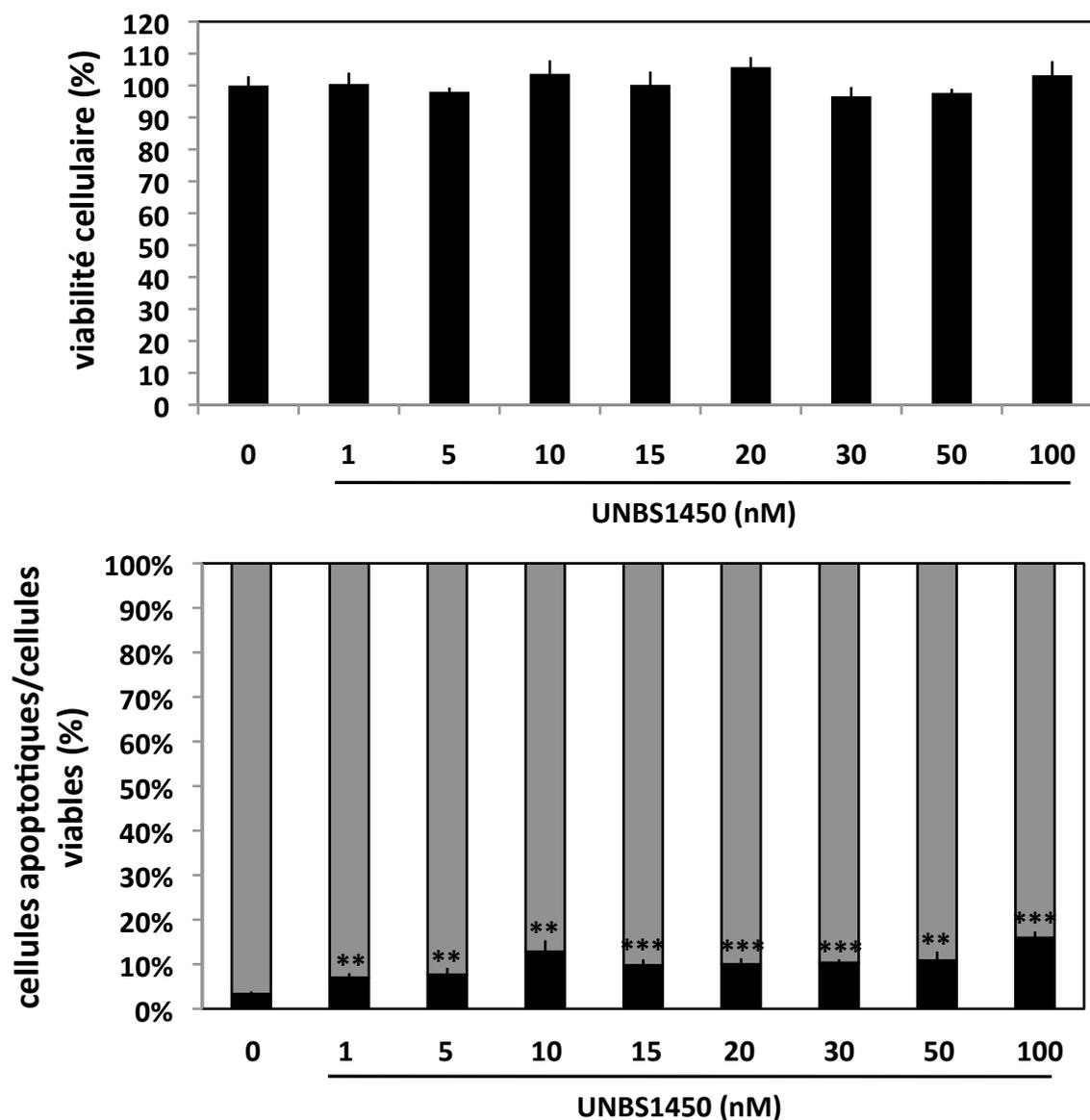


Figure 19. Effet de UNBS1450 sur la viabilité de cellules PBMCs.

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été ensemencées à 2×10^6 cellules/mL, puis, 24 h après, elles ont été traitées par UNBS1450 (0 – 100 nM) pendant 24 h. Soit nous avons coloré les cellules par le Bleu de Trypan (partie du haut) pour évaluer l'intégralité cellulaire, soit nous les avons marquées au Hoechst afin de calculer les taux d'induction apoptotique. Les résultats sont représentatifs de trois expériences réalisées indépendamment, \pm écart-types.

4.4. Définition du mécanisme moléculaire apoptotique mis en place par UNBS1450

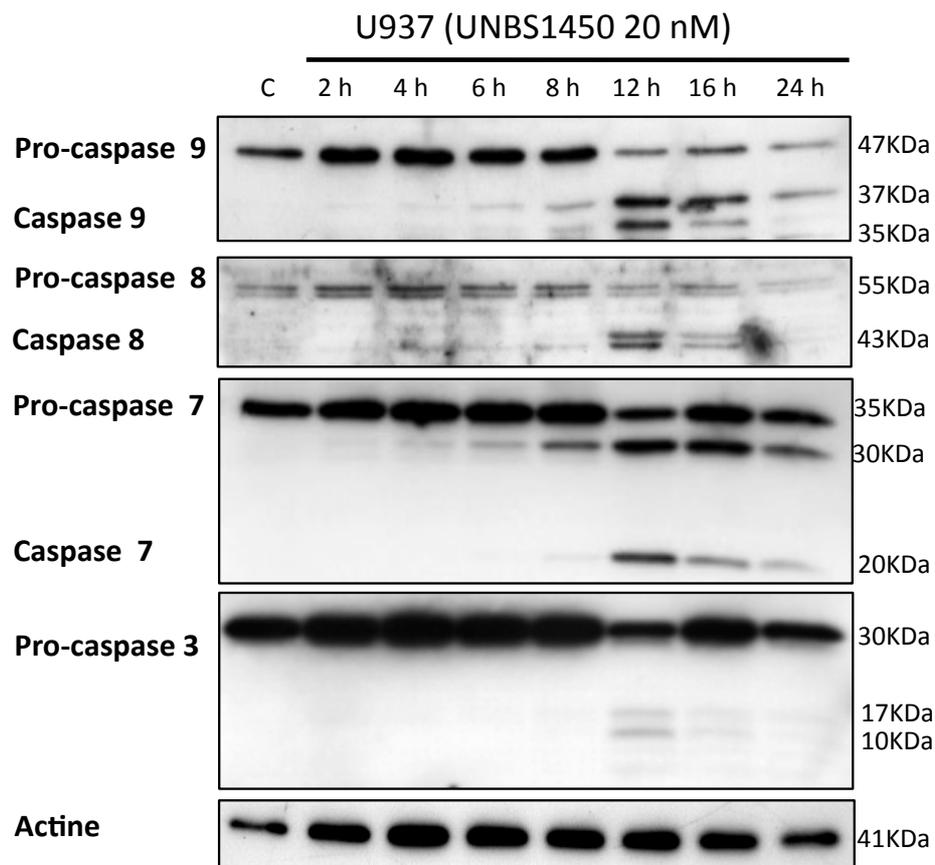
Afin de pouvoir définir plus clairement les voies de signalisations pro-apoptotiques induites par UNBS1450, nous avons réalisé une étude cinétique d'expression et de clivage de différentes protéines impliquées dans les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques, telles que les caspases-3, -7, -8 et -9 tout comme les protéines XIAP, Bcl-2 et Mcl-1 (Figure 20).

Nous démontrons ici que UNBS1450, appliqué à 20 nM aux cellules U937, est capable d'induire le clivage des pro-caspases-8 et -9. Au bout de 12 h d'incubation en présence de UNBS1450, nous observons une apparition des formes actives des caspases-8 et -9, avec un maximum de protéines clivées obtenu au bout de 16 h. Au-delà, la quantité protéique détectée diminue de nouveau, probablement à cause d'une rapide désintégration cellulaire. La pro-caspase-7 étant un substrat de la caspase-9, nous observons un clivage de la pro-caspase-7 en caspase-7 active qui est légèrement décalé dans le temps comparé aux clivages des pro-caspases-8 et -9. En ce qui concerne la pro-caspase-3, nous constatons une légère diminution en quantité de la forme native de la caspase-3 le long de notre étude en cinétique, sans pour autant détecter la fraction clivée active de la caspase-3. Les causes de cette absence de la forme clivée nécessitent de plus amples analyses (Figure 20A).

Après ces résultats confirmant que UNBS1450 est capable d'induire la voie apoptotique caspases-dépendante (extrinsèque), nous avons complété notre étude par l'analyse des taux d'expression de protéines anti-apoptotiques impliquées dans la régulation de la voie apoptotique intrinsèque, à certaines protéines des familles protéiques Bcl-2 et IAPs (IAP – inhibitor of apoptosis) (Figure 20B). Faisant partie des protéines inhibitrices d'apoptose, XIAP n'est pas influencée par la présence de UNBS1450. Les taux d'expressions observés pour les échantillons contrôles et traités par UNBS1450 pendant 0 à 24 h sont sensiblement identiques. Par la suite, nous avons étudié l'expression des protéines Bcl-2 et Mcl-1. Toutes les deux régulent négativement une éventuelle induction de la voie apoptotique intrinsèque. Comme le montre la Figure 20B, le niveau d'expression de Bcl-2 ne varie pas significativement au long de la cinétique. Le contraire est vrai pour Mcl-1 : après 8 h d'incubation en présence de UNBS1450 son niveau d'expression commence à être réduit, tandis qu'à partir de 12 h d'incubation, la présence de Mcl-1 n'est plus détectable.

En tant que troisième conclusion intermédiaire, nous pouvons retenir que UNBS1450 est capable non seulement d'induire la voie canonique de l'apoptose, mais aussi de réduire le potentiel naturel des cellules cancéreuses d'éviter une entrée en apoptose en diminuant le taux d'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1.

A.



B.

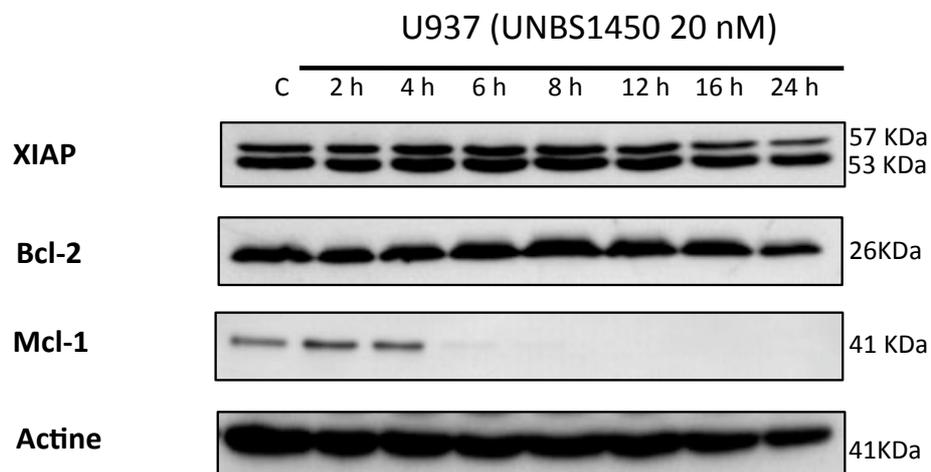


Figure 20. Etude des niveaux d'expression de protéines (A) pro-apoptotiques et (B) anti-apoptotiques.

Analyse par Western Blot (A) du clivage des pro-caspases-9, -8, -7 et -3 et (B) des taux d'expression des protéines anti-apoptotiques XIAP, Bcl-2 et Mcl-1. Les cellules furent incubées dans du RPMI + 10 % SVF avec ou sans UNBS1450 (20 nM) pour des durées déterminées.

4.5. Investigation des conséquences possibles d'une dégradation UNBS1450-induite de Mcl-1: Analyse par microscopie à fluorescence de Bax et de Bak dans les cellules leucémiques U937

Comme Mcl-1 est un élément cytosolique anti-apoptotique clé capable d'interagir directement avec Bak, facteur pro-apoptotique mitochondrial, la prochaine étape de notre étude sur la mécanistique pro-apoptotique induite par UNBS1450 a été une analyse par microscopie à fluorescence d'une possible co-localisation de noyaux cellulaires fragmentés apoptotiques et Bak/Bax.

4.5.1. Détection et localisation de Bak

Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) étant une protéine mitochondriale impliquée dans la perméabilisation membranaire mitochondriale, et par conséquence dans le relargage du cytochrome c et donc finalement de l'apoptose, nous avons étudié son niveau d'expression ainsi que sa localisation par immunofluorescence. La coloration en bleu (Hoechst) permet de visualiser l'intégrité nucléaire tandis que la protéine Bak est marquée par un anticorps émettant un signal fluorescent vert. Comme nous avons pu observer préalablement, les cellules contrôles, non traitées par UNBS1450, ne sont que très peu apoptotiques.

Une stimulation des cellules U937 par UNBS1450 30 nM entraîne un taux apoptotique fortement accru, comme nous l'avons démontré précédemment. Les résultats obtenus montrent des quantités augmentées de Bak en fonction de la concentration en UNBS1450 utilisée comme stimulant cellulaire. Cette augmentation est spécifique des cellules apoptotiques ; la désintégration du noyau est associée à une accumulation de protéines Bak sur les membranes mitochondriales. Pour les cellules traitées avec UNBS1450 20 nM, les effets observés restent sensiblement les mêmes, avec cependant une apoptose généralement moins fréquente ; pour les cellules saines, Bak n'est que très peu présente sur les membranes mitochondriales. Une diminution de la concentration en UNBS1450 à 15 nM permet toujours de provoquer la mort cellulaire associée à une induction de Bak, tandis qu'un traitement des cellules U937 avec UNBS1450 10 nM n'entraîne pas de changements significatifs par rapport à l'échantillon contrôle ; à l'état physiologique, les cellules U937 n'expriment pratiquement pas de protéine Bak (Figure 21).

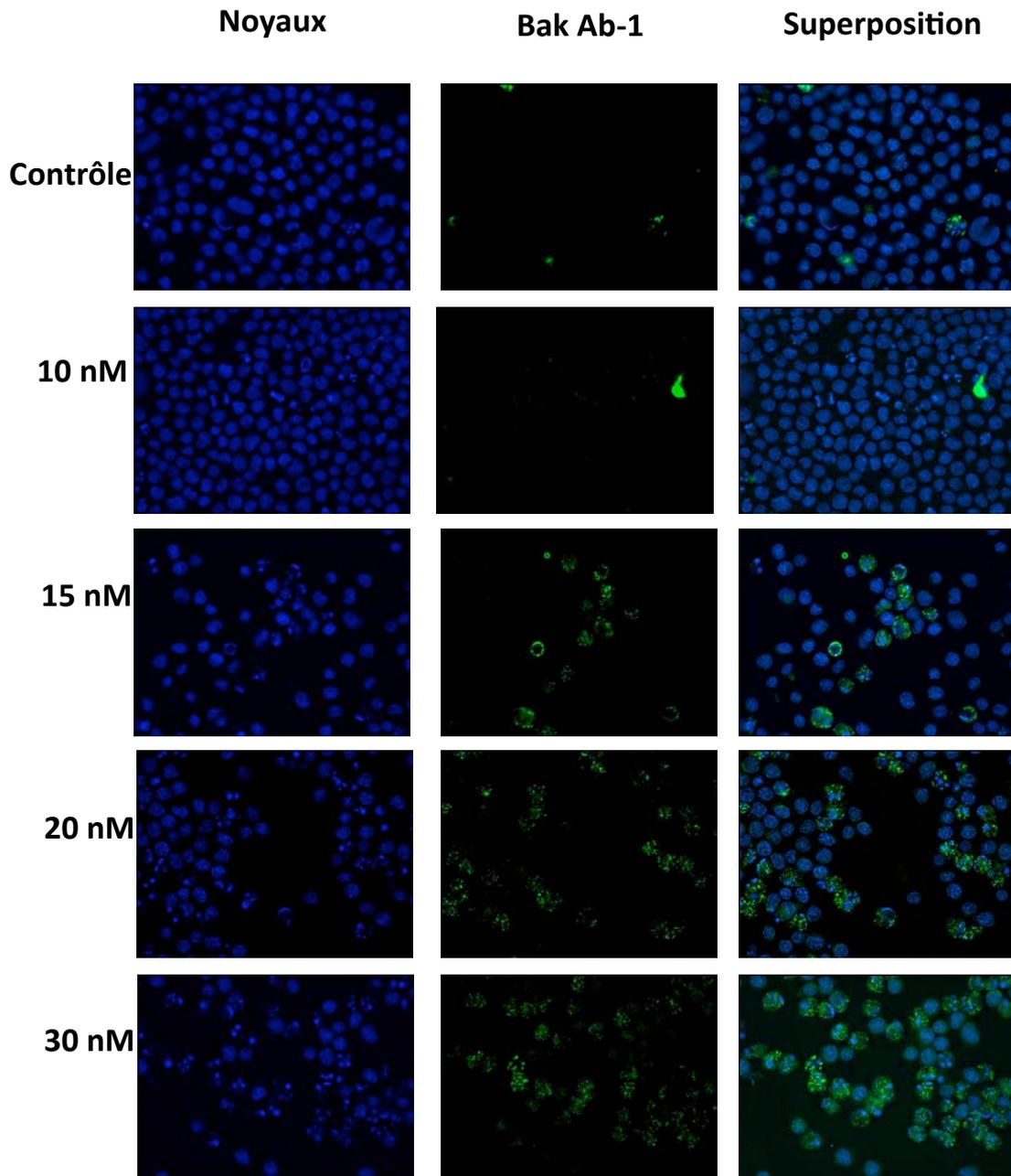


Figure 21. Expression et localisation de Bak dans les cellules U937 après traitement par UNBS1450 (24 h).

A l'aide d'un anticorps spécifique de Bak et de Hoechst, nous avons marqué les cellules au bout de 24 h d'incubation dans du RPMI + 10 % SVF en présence ou en absence de UNBS1450 (10, 15, 20 et 30 nM).

4.5.2. Détection et localisation de Bax

D'une façon similaire, nous avons ciblé par double immunomarquage (cf. Matériel et Méthodes), deux stades conformationnels différents de la protéine cytoplasmique Bax, l'un correspondant au contenu entier de la protéine Bax, l'autre à la protéine activée. Sur la Figure 22A, nous pouvons voir que dans les cellules U937 non traitées, Bax n'est que très peu exprimée (coloration en vert). La néanmoins très faible production de cette protéine pro-apoptotique est probablement due aux conditions de culture des cellules. Par conséquent, toujours dans le cas des cellules contrôles, la forme activée de Bax (coloration en rouge) n'est pas significativement répandue non plus (Figure 22A,B). La coloration au Hoechst permet de conclure sur l'intégrité des noyaux des cellules ; le taux apoptotique des cellules non traitées est négligeable.

Au contraire, dans le cas des cellules U937 stimulées par des concentrations croissantes de UNBS1450 (30 nM, Figure 22C,D ; 20 nM, Figure 22E,F), nous avons pu confirmer, d'une part que les cellules U937 entrent en apoptose à fort taux, et d'autre part, que l'expression de Bax est stimulée : le traitement des cellules avec UNBS1450 30 nM entraîne un accroissement général de l'expression de Bax (Figure 22C). La forme non activée de Bax est répartie d'une façon uniforme dans le cytoplasme des cellules encore intactes, alors que, plus la cellule se trouve dans un stade apoptotique avancé, plus la protéine a tendance à être accumulée par endroit (« dots »). Cet effet est encore plus marqué en ce qui concerne la conformation active de Bax : dans les cellules fonctionnelles, la teneur en Bax activée est minimale, tandis que nous observons une forte accumulation d'îlots, probablement mitochondriaux, de la protéine activée dans les cellules apoptotiques (Figure 22D).

En diminuant les concentrations en UNBS1450, les profils de l'induction de l'expression de Bax, tout comme de son activation, restent les mêmes, mais d'une façon moins prononcée (Figure 22E-H). Nous notons également qu'un traitement des cellules avec UNBS1450 10 nM n'est plus efficace : l'expression et l'activation de Bax sont d'un niveau comparable à celui observée dans les cellules contrôles (Figure 22I,J).

En conclusion, ces études par microscopie à fluorescence de l'impact de UNBS1450 sur Bak et Bax, deux protéines clés de l'exécution de la voie apoptotique intrinsèque,

montrent que l'apoptose UNBS1450-induite repose bien sur une désintégration de la membrane mitochondriale par le tandem Bak/Bax. Ces résultats vont de pair avec l'effet répresseur exercé par UNBS1450 sur l'expression de la protéine Mcl-1 que nous avons démontré précédemment.

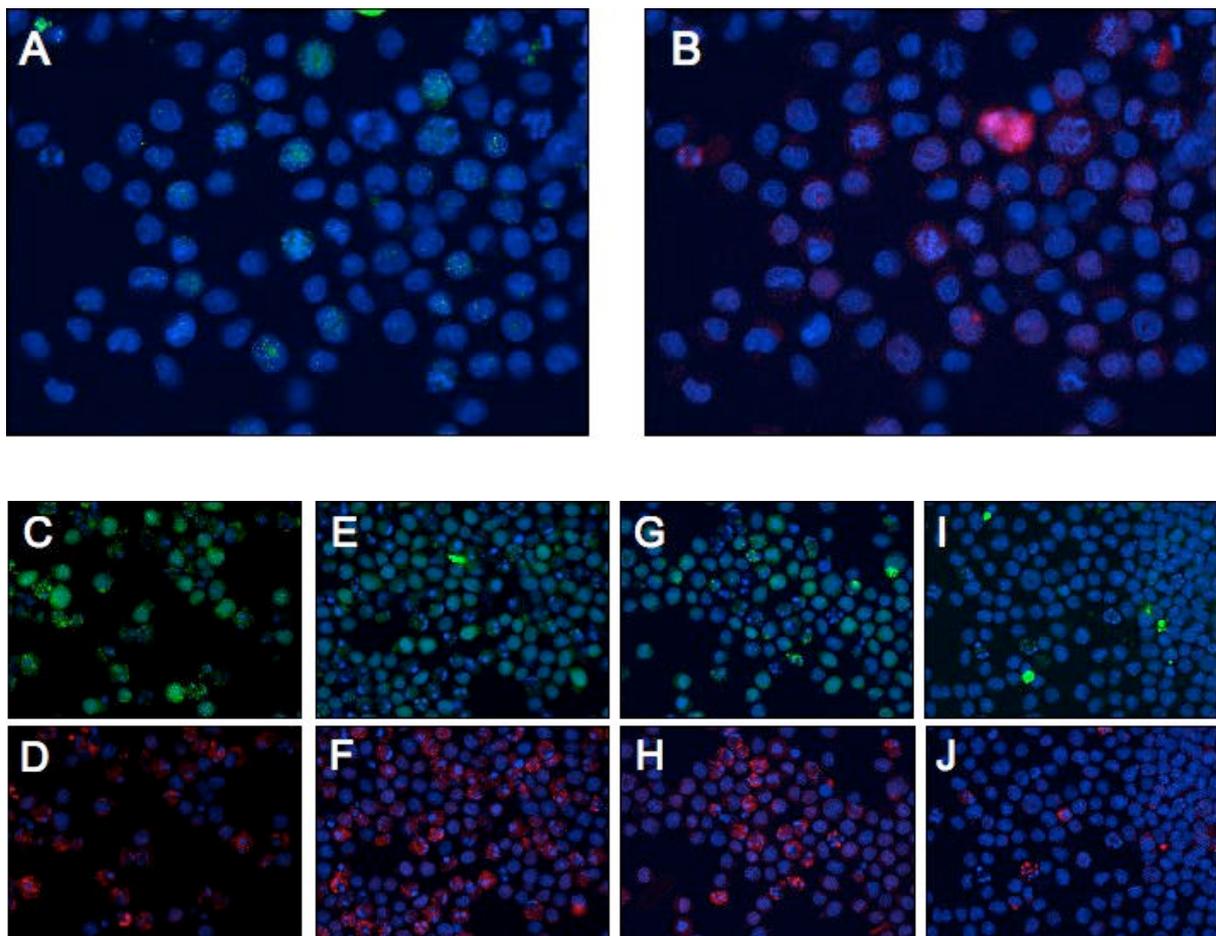


Figure 22. Expression et localisation de Bax totale (en vert) et activée (en rouge) dans les cellules U937 après traitement par UNBS1450 (24 h).

Cellules contrôles non-traitées (A, B) ; cellules traitées pendant 24 h avec UNBS1450 30 nM (C, D), 20 nM (E, F), 15 nM (G, H) et 10 nM (I, J).

A l'aide d'anticorps spécifiques de Bax totale (vert) et de la forme activée de Bax (Bax6A7) et de Hoechst, nous avons marqué les cellules au bout de 24 h d'incubation dans du RPMI + 10 % SVF en présence ou en absence de UNBS1450 (10, 15, 20 et 30 nM).

4.6. Comparaison des niveaux d'expression des ARNm spécifiques de la sous-unité $\alpha 1$ de l'ATPase Na^+/K^+ entre lignées cellulaires leucémiques et cellules sanguines périphériques saines.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, UNBS1450 a été démontré se lier à haute spécificité à la sous-unité $\alpha 1$ de l'ATPase Na^+/K^+ de cellules originaires de tumeurs solides. Au vu nos résultats obtenus sur les effets de UNBS1450 sur la viabilité de cellules leucémiques, nous avons réalisé des expériences de PCR en temps réel en amplifiant spécifiquement l'ADNc des sous-unités $\alpha 1$ des ATPases Na^+/K^+ issues d'un large échantillon de lignées cellulaires leucémiques : dans ce but nous avons choisi des lignées cellulaires leucémiques établies à partir de leucémies myéloïdes chroniques (K562, MEG-01, KBM5) et aiguës (HL-60), d'un lymphome de Burkitt (Raji), d'une leucémie aiguë à cellules T (Jurkat), d'un lymphome histiocytique diffus (U937), d'érythroleucémies (HEL, TF1) et d'une leucémie lymphoblastique aiguë (MOLT-3). En tant que référence de comparaison nous avons choisi des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs).

Illustrés par la figure 23, les résultats montrent des taux d'expression variables selon les cellules considérées : en comparant lignées cellulaires leucémiques et PBMCs, nous pouvons globalement faire une distinction entre trois groupes différentes : (1) Jurkat, Raji, Hel, MOLT-3, Meg-01, TF-1 et KBM5 possèdent des quantités d'ARNm spécifique de la sous-unité $\alpha 1$ inférieures de 22 (KBM5) à 45 % (Jurkat et TF-1) par rapport aux PBMCs. (2) Parmi toutes les lignées cellulaires leucémiques prises en considération, les cellules HL-60 présentent le niveau d'expression du gène $\alpha 1$ le moins élevé : la quantité d'ARNm spécifique de ce gène est inférieure de 72% à celle trouvée dans les PBMCs. (3) À l'inverse, au sein des cellules K562 et U937, ces ARNm sont nettement plus abondants (x 5,8 pour les K562 et x 1,6 pour les U937).

A l'issue de cette expérience, nous pouvons donc retenir qu'au sein des cellules leucémiques prises en considération, le gène de la sous-unité $\alpha 1$ de l'ATPase Na^+/K^+ n'est pas systématiquement surexprimé par rapport à des cellules non cancéreuses comme les PBMCs. Comparées aux cellules issues de tumeurs solides analysées préalablement par d'autres équipes de recherche, nous pouvons conclure que les cellules cancéreuses leucémiques ne se caractérisent donc pas par une transcription systématiquement accrue du gène de $\alpha 1$ par rapport à leurs contreparties saines que sont les cellules PBMCs.

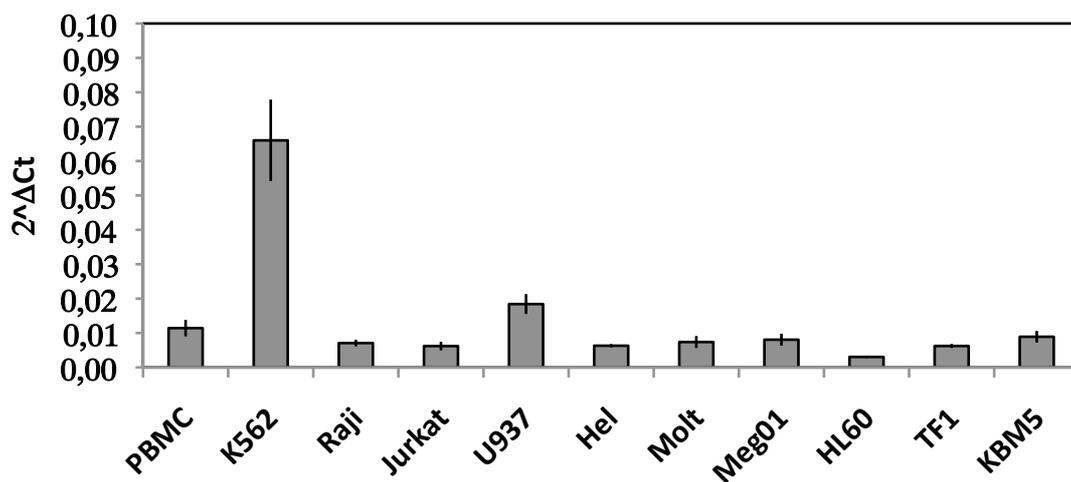


Figure 23. Analyse par PCR en temps réel des expressions basales des ARNm de la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans des PBMCs et dans un échantillon de lignées cellulaires leucémiques.

Les ARN totaux des cellules leucémiques et PBMCs ont été extraits : les cellules leucémiques ont été cultivées jusqu'à trois passages différents, les cellules PBMCs pendant 24 h dans du RPMI 10 % SVF et 1% d'antibiotiques. L'ADNc de la pompe Na^+/K^+ -ATPase a été ciblé et amplifié par des amorces ADN spécifiques (Eurogentech). Les valeurs sont indiquées en $2^{-\Delta Ct}$. Les valeurs Ct obtenues pour l'amplification du gène Na^+/K^+ -ATPase ont été normalisées par rapport aux valeurs Ct obtenues pour GAPDH. Les résultats représentent les moyennes de trois expériences réalisées indépendamment, \pm les écart-types.

4.7. UNBS1450 inhibe significativement l'activation de la voie de signalisation NF- κ B induite par le TNF α

Une stimulation anormale de la voie de signalisation NF- κ B, comme elle est de coutume dans les cellules néoplasiques, conduisant à une transcription augmentée de gènes anti-apoptotiques, procure aux cellules une résistance accrue envers une induction de mort cellulaire par apoptose ; nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique. Nous avons donc comme but d'évaluer les possibilités qu'une inhibition de la voie NF- κ B par UNBS1450 puisse expliquer l'induction apoptotique constatée préalablement. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur une modélisation d'un microenvironnement tumoral, à savoir une activation d'une durée de 6 h de cellules K562 (Figure 24A) et Jurkat (Figure 24B) par TNF α (20 ng/mL) ; un nombre important de tumeurs malignes se caractérise par une production constitutive de TNF α par le microenvironnement tumoral. Afin d'évaluer le potentiel de UNBS1450 de réprimer une telle activation de la voie de signalisation NF- κ B, nous avons prétraité les cellules au préalable pendant 2 h avec différentes concentrations d'UNBS1450 (de 10 à 50 nM). Brièvement : les cellules K562 et Jurkat ont été transfectées avec un plasmide portant un gène rapporteur luciférase, inductible et sous contrôle par NF- κ B, et avec un plasmide *Renilla* servant comme référence comme nous l'avons décrit dans la partie Matériel et Méthodes. 24 h après transfection, les cellules transfectées ont été prétraitées par UNBS1450 pendant 2 h avant d'être stimulées par TNF α (20 ng/mL) pendant 6 h.

Lors de cette expérience, nous avons pu confirmer que la présence de TNF α entraîne une forte activité promotrice de NF- κ B (transcription accrue du gène luciférase), et ceci d'une manière similaire dans les cellules K562 (fold > 36) et dans les cellules Jurkat (fold > 31) (Figure 24). Dans le cas des cellules K562, nous pouvons observer qu'une préincubation en présence de UNBS1450 10 nM conduit déjà à une réduction de 39,35 % de l'activité NF- κ B TNF α -induite. Cette régression de l'activité NF- κ B s'accroît en augmentant la concentration de UNBS1450 : à 20 nM, UNBS1450 réduit de 52,51 % et à 30 nM de 63,30 % l'activité NF- κ B. Au-delà de 30 nM (ne figure pas sur le graphique), l'augmentation de la concentration de UNBS1450 ne continue pas d'exercer une répression linéaire sur l'activité induite de NF- κ B : nous avons obtenu une valeur maximale d'inhibition de l'activité de NF- κ B que nous estimons être de l'ordre de 63 %.

Pour les cellules Jurkat, les résultats obtenus sont similaires : nous observons une première réponse linéaire à des concentrations d'UNBS1450 allant de 10 à 30 nM tandis que par la suite il y a une stagnation de l'effet inhibiteur de UNBS1450 (ne figure pas sur le graphique). Une pré-incubation en présence de 10 nM d'UNBS1450 réduit l'activité TNF α -induite de NF- κ B de 32 %. En augmentant la concentration de UNBS1450 à 20 et à 30 nM, la réduction de l'induction de NF- κ B augmente respectivement à 45 et 56 %. Au-delà d'une concentration de 30 nM, l'inhibition de l'activité NF- κ B par UNBS1450 ne s'accroît plus, nous atteignons une valeur seuil d'une inhibition maximale que nous estimons d'être de l'ordre de 55%.

Nous notons également que UNBS1450 n'a pas d'effet répresseur sur l'activité basale de NF- κ B dans les cellules K562 (Figure 25).

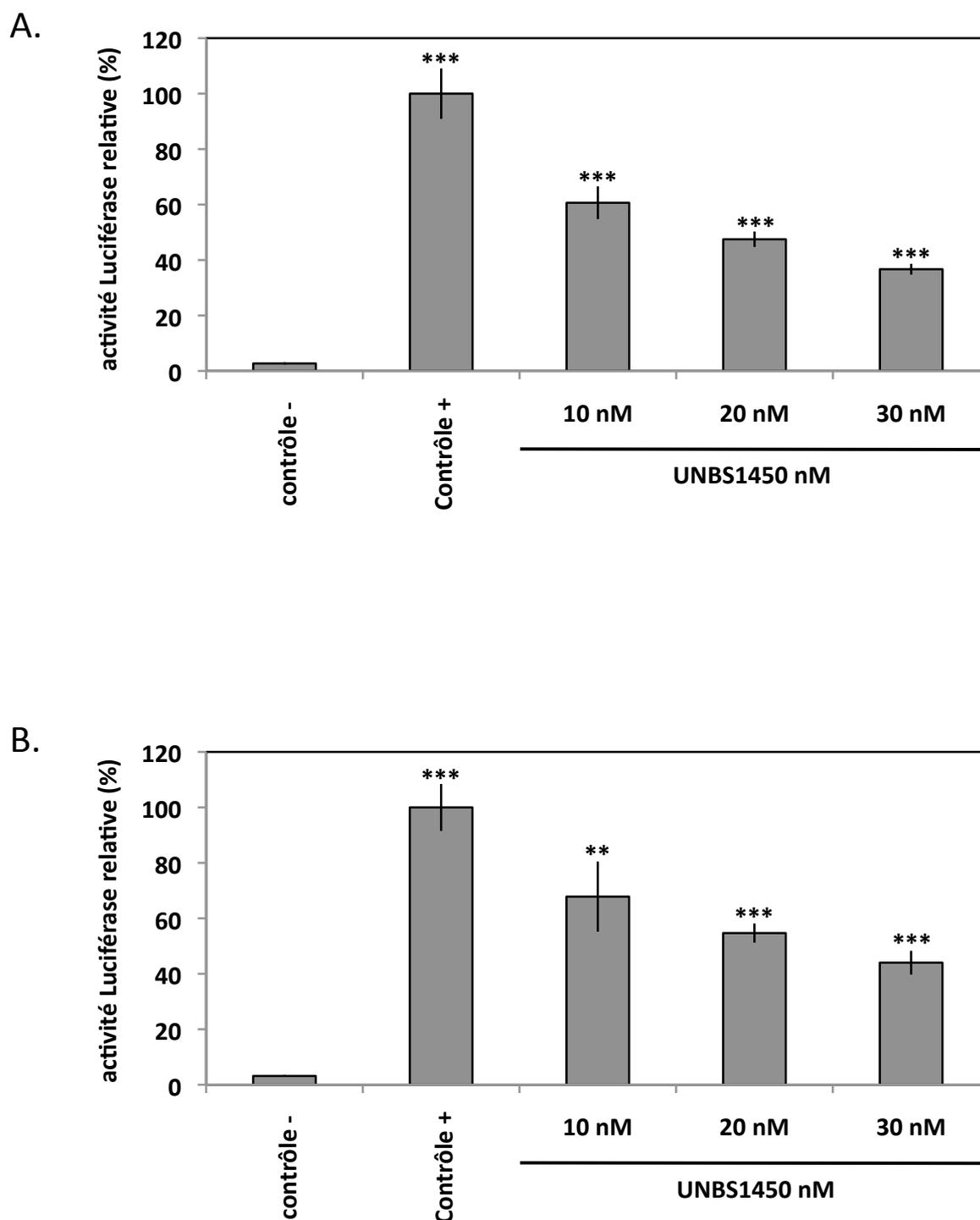


Figure 24. Les effets de UNBS1450 sur l'activation de NF- κ B par TNF α .

Les effets de UNBS1450 sur l'activité de NF- κ B ont été déterminés par un Dual-Glo™ Luciferase assay kit sur des cellules K562 (A) et Jurkat (B). Les cellules ont été incubées dans du RPMI + 10 % SVF à 37 °C pendant 2 h en présence de UNBS1450 et activées par la suite par TNF α (20 ng/mL). Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués d'une façon indépendante. Les résultats sont montrés comme la moyenne \pm un écart-type.

K562	Activité Luciférase relative (%)	Ecart-types (%)
non traitées	0,574	0,147
UNBS1450 (40 nM)	0,587	0,178
TNF α (20 ng/mL)	100	2,850
UNBS1450 (40 nM) + TNF α (20 ng/mL)	42,578	7,761

Figure 25. Les effets de UNBS1450 sur l'activité constitutive de NF- κ B.

Les effets de UNBS1450 sur l'activité basale de NF- κ B ont été déterminés par un Dual-GloTM Luciferase assay kit sur des cellules K562. Les cellules ont été incubées dans du RPMI + 10 % SVF à 37 °C pendant 8 h en présence de UNBS1450. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués d'une façon indépendante. Les résultats sont montrés comme la moyenne \pm un écart-type.

4.8. Etude de l'impact de UNBS1450 sur l'activité liante du facteur de transcription NF- κ B à l'ADN

Dans le but de confirmer les résultats obtenus sur les effets inhibiteurs qu'exerce UNBS1450 sur l'activité TNF α -induite du facteur de transcription NF- κ B, nous avons élargi notre étude sur l'analyse d'une possible capacité de UNBS1450 d'interférer avec la fixation du facteur NF- κ B sur sa région génomique promotrice spécifique. Pour ce faire, nous avons effectué des études de retard sur gel (EMSA–electrophoretic mobility shift assay). Brièvement, nous avons analysé la capacité des facteurs NF- κ B en provenance de protéines nucléaires issues de cellules K562 et Jurkat, prétraitées ou non par UNBS1450 (40 nM) et activées par TNF α (20 ng/mL), de se lier à des sondes ADN radiomarquées comprenant les séquences spécifiques des régions promotrices de NF- κ B (voir Matériel et Méthodes).

La Figure 26 montre d'abord que la présence de TNF α (20 ng/mL) résulte dans la liaison de NF- κ B aux sondes radiomarquées (comparaison entre les voies 1 et 8), ceci dans les cellules K562 et Jurkat non prétraitées. Comme le montrent les échantillons prétraités avec UNBS1450 40 nM et activés par la suite par TNF α (20 ng/mL), UNBS1450 est capable de limiter la liaison de NF- κ B sur l'ADN cible des cellules K562 et Jurkat. Une analyse en cinétique du potentiel inhibiteur de UNBS1450 40 nM nous a permis de voir que les effets de UNBS1450 deviennent particulièrement visibles au bout de 8 h de prétraitement (voies 13 et 14). En accord avec ses résultats, UNBS1450 à lui seul ne favorise pas la liaison de NF- κ B sur sa cible génomique spécifique comme nous pouvons le voir sur la partie gauche de la figure (voies 1 à 7).

Afin de compléter ces observations, nous avons utilisé des anticorps anti-p50 et anti-p65 pour pouvoir identifier la composition du dimère NF- κ B. A l'aide de la Figure 26B, nous montrons que dans le cas d'une activation des cellules K562 et Jurkat par TNF α (20 ng/mL), le dimère NF- κ B est constitué de monomères p50 et p65 ; l'emploi d'un anticorps anti-p50 ou anti-p65 annule la formation de dimères et de par là la liaison du facteur NF- κ B sur son ADN cible. Des expériences de compétition, réalisées avec des sondes à NF- κ B non-radiomarquées, montrent une disparition totale de la bande p50/p65.

Finalemt, nous pouvons retenir que l'emploi de TNF α sur des cellules leucémiques K562 et Jurkat conduit à la formation de dimères NF- κ B p50/p65 et à la liaison de ces derniers sur leurs séquences d'ADN cibles nucléaires, liaison qui a été négativement influencée par UNBS1450 40 nM appliqué préalablement aux cellules pendant 8 à 16 h.

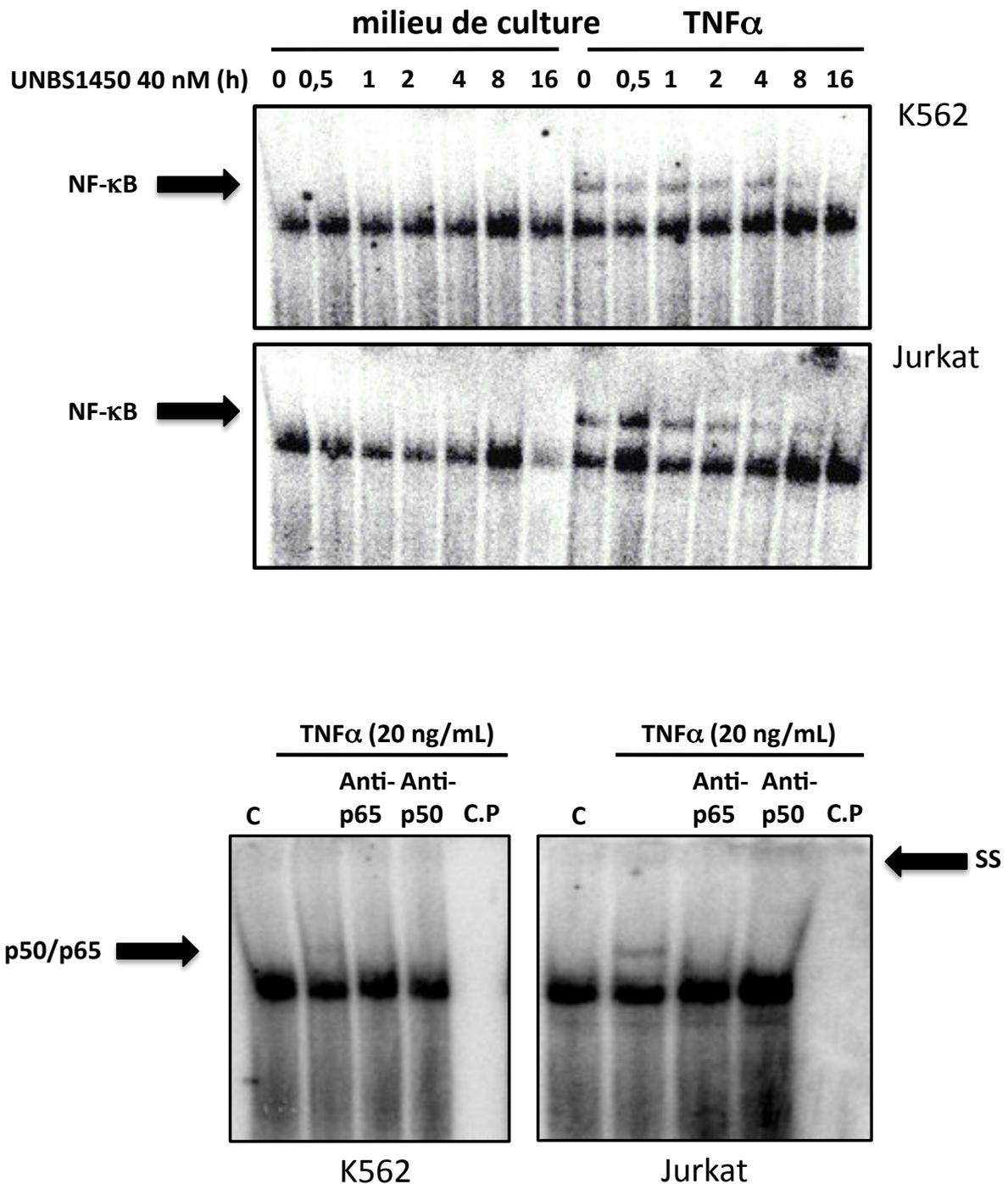


Figure 26. Analyse de l'activité de liaison des facteurs nucléaires des lignées cellulaires leucémiques K562 et Jurkat à la sonde NF-κB consensus.

(A) Des extraits protéiques nucléaires ont été incubés pendant 30 à 45 min avec des sondes NF-κB consensus radiomarquées. Après le temps d'incubation, les mélanges ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 5 % ; les complexes protéines/ADN ont alors été séparés par électrophorèse pendant 2 à 3 h à 16 mA. La révélation a été réalisée par autoradiographie. (B) L'emploi d'anticorps anti-p65 et anti-p50 a pour but de déterminer la nature du complexe protéique/ADN formé.

4.9. Etude des effets de UNBS1450 sur la translocation cytoplasme-noyau de NF- κ B

TNF α -induite

L'activation de NF- κ B (des monomères p65 et p50 dans notre cas) est généralement initiée par la dégradation de son inhibiteur physiologique I κ B α . C'est ainsi que nous avons par la suite étudié l'intégrité de I κ B α , tout comme la translocation de p65 du cytoplasme vers le noyau. Ces études ont été effectuées par Western Blot.

Dans ce but, nous avons utilisé des cellules Jurkat comme décrit préalablement par notre laboratoire (Folmer *et al.*, 2006 ; Folmer *et al.*, 2008). Comme nous l'avons décrit dans la partie Matériel et Méthodes, des cellules Jurkat (2×10^6 cellules/mL) ont été prétraitées pendant 2 h par UNBS1450 (40 nM) avant d'être activées par TNF α (20 ng/mL) pendant 6 h. Comme le montre la Figure 27, dans les cellules non prétraitées, l'action de TNF α conduit à la phosphorylation de I κ B α , suivie de sa dégradation. Etant éliminé, I κ B α ne peut plus retenir dans le cytoplasme les protéines p65, qui sont alors transloquées vers le noyau, phénomène qu'illustre la partie gauche de la figure : dans l'heure qui suit l'activation des cellules Jurkat par TNF α , nous détectons de moins en moins de protéines p65 dans la partie cytoplasmique, tandis que des bandes apparaissent sur les Western Blot réalisés avec des protéines nucléaires. La partie de droite de la figure illustre nos résultats obtenus pour les cellules prétraitées pendant deux heures par UNBS1450 40 nM. Nous pouvons constater que la dégradation apparente de I κ B α est retardée. En conséquence, nous n'observons plus de translocation de p65 du cytoplasme vers le noyau dans les champs de temps ciblés. Dans tous les cas, des anticorps anti-tubuline α (contrôle cytoplasmique), anti-lamine B (contrôle nucléaire) et anti- β -actine (contrôle général) ont été employés pour normaliser les résultats obtenus pour I κ B α , et p65.

Nous pouvons conclure que l'activité inhibitrice exercée par UNBS1450 sur NF- κ B, mise en évidence par une diminution de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et par une activité de liaison réduite de NF- κ B à sa séquence génomique, résulte d'une interférence entre UNBS1450 et la dégradation de I κ B α et par conséquent la translocation de p65 du cytoplasme vers le noyau.

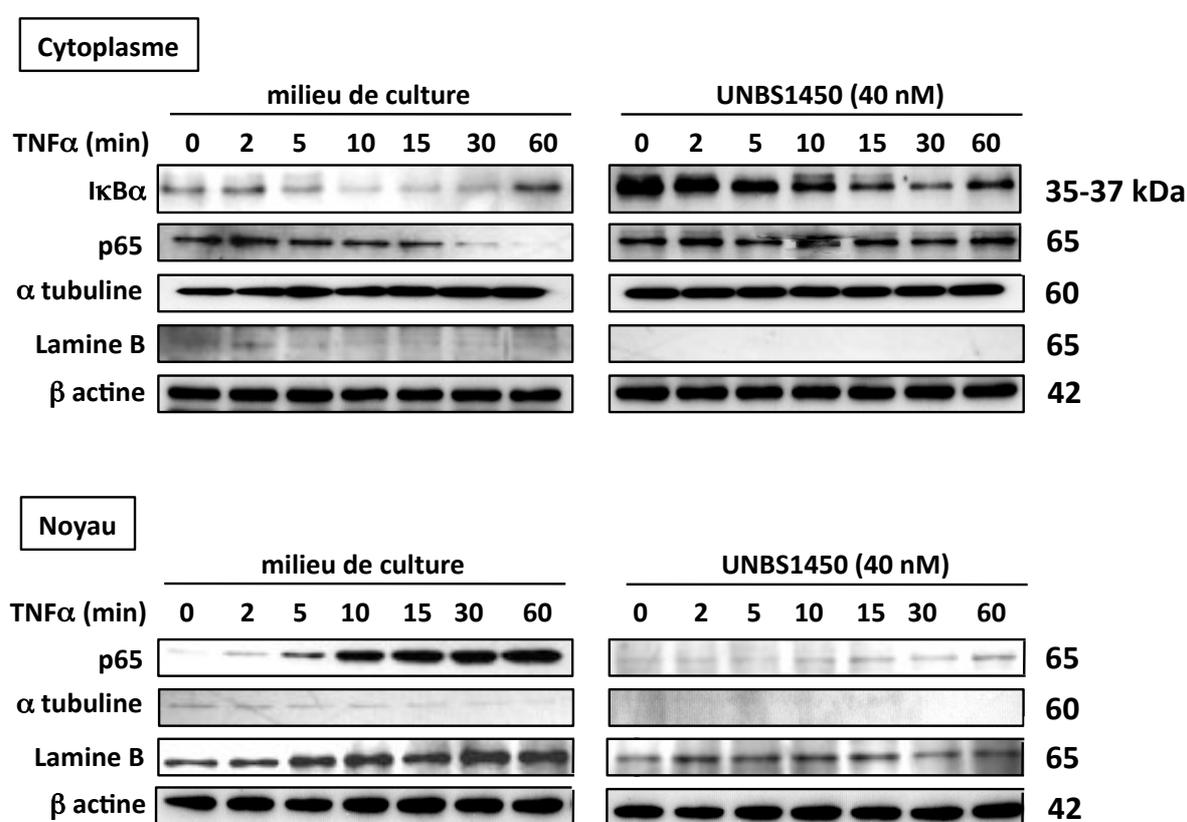


Figure 27. Analyse de l'effet de UNBS1450 sur la dégradation d'IκBα et la translocation de NF-κB.

Des extraits de protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été préparés et fractionnés sur un gel de séparation SDS-PAGE à 10 %. Le contenu protéique a été par la suite transféré sur une membrane et testé sur la présence de IκBα et p65. Une distribution homogène des échantillons a été vérifiée par des Western Blot α-tubuline, lamine B et β-actine. Les résultats montrés sont représentatifs de trois essais réalisés indépendamment.

4.10. Analyse par PCR en temps réel des effets de UNBS1450 sur l'expression constitutive et TNF α -induite de gènes impliqués dans l'activation et la régulation de NF- κ B et sur des gènes dont l'expression est régulée par NF- κ B.

Une transcription reverse a été réalisée sur des ARN totaux extraits de cellules K562 activées ou non par TNF α (20 ng/mL) pendant 6 h, avec ou sans prétraitement de 2 h en présence de UNBS1450 (40 nM), et l'ADNc obtenu a ensuite été analysé par PCR en temps réel comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes (Super Array, RT²ProfilerTM PCR Array System).

La figure 29 constitue une représentation graphique des variations d'expression obtenues par activation par TNF α (20 ng/mL) pour les 84 gènes étudiés, variation exprimée en « fold induction ». Les valeurs prises en considération sont issues des moyennes de trois essais réalisés avec des cultures cellulaires différentes. De cet assortiment de gènes, 45 se retrouvaient activés par le TNF α , leur taux d'induction variant de 1,01 à 90,38. De ces 45 gènes, 19 étaient induits significativement par l'ajout de TNF α , à savoir BCL3, CCL 2, CD40, CSF2, FASL, ICAM1, IKBKE, IL1A, IL-8, IRAK2, LTA, NFkB2, NFkBIA, RELB, TLR2, TLR7, TNF, TNFAIP3 et TNFSF10. Pour ces gènes, le test t affichait des valeurs p comprises entre 0,0164 et 0,0240 ($*p \leq 0,05$). En même temps, l'expression de 39 se retrouvait réprimée par la présence de TNF α , mais aucun gène n'était inhibé de façon significative. Les valeurs de répression étaient comprises entre -1,07 et -2,42.

En préincubant les cellules K562 en présence de UNBS1450 à 37 °C pendant 2 h, nous avons voulu vérifier l'impact de UNBS1450 sur une stimulation des gènes en question par TNF α . Comparé à l'expression constitutive des gènes de la famille NF- κ B des cellules K562 (Figures 30,31), nous pouvons noter que l'ajout de UNBS1450 ne change pas le profil d'expression général par rapport aux résultats précédemment obtenus par l'action de TNF α seul.

En considérant le rapport entre les expressions de gènes stimulés par TNF α en présence de UNBS1450 et de gènes seulement stimulés par TNF α , nous avons pu observer que 4 gènes sont encore stimulés significativement par UNBS1450, à savoir CD40 (3,11), JUN (2,91), TNFAIP3 (2,15) et TNFSF10B (2,02) (Figures 32, 33). UNBS1450 ne permet pas de réprimer la forte induction des gènes CD40, TLR7 et TNF par le TNF α observée

préalablement. Aucun gène n'a montré une diminution significative de son niveau d'expression par l'ajout de UNBS1450.

Un autre point fondamental était l'analyse de l'effet que peut avoir UNBS1450 sur le profil d'expression constitutive que possèdent les cellules K562. Les figures 34 et 35 montrent que 4 gènes varient significativement en faisant le rapport entre leurs expressions UNBS1450-induites et leurs expressions basales ; parmi ces 4, trois se retrouvent activés par UNBS1450, et un seul réprimé. Les gènes JUN, FOS et TLR9 ont montré des taux d'induction de 3,29, de 2,35 et de 5,67 à l'inverse de NOD1 dont l'expression a été réprimée par UNBS1450 (-2,04).

De ces expériences nous pouvons conclure que d'une part UNBS1450 n'inhibe en aucun point l'action de $TNF\alpha$, mais que UNBS1450 est capable de potentialiser les effets d'un hypothétique microenvironnement riche en $TNF\alpha$ en stimulant d'avantage l'expression des gènes CD40, JUN, TNFRSF10B et TNFAIP3 et que d'autre part, comparé au profil d'expression de cellules non stimulées, UNBS1450 est responsable d'une hausse de l'expression de JUN, de FOS et de TLR9 et d'une diminution de l'expression de NOD1. A l'heure actuelle, nous ignorons malheureusement encore quel message il faut percevoir derrière ses résultats qui, dès lors, restent purement descriptifs ; des expériences complémentaires seront nécessaires afin de comprendre les effets qu'UNBS1450 exerce sur ces gènes, notamment sur Jun et Fos.

Symbol	Well	AVG ΔC _t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		2 ^{Δ-ΔC_t}		Fold Difference	T-TEST	Fold Up- or Down- Regulation
		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	p value	Test Sample /Control Sample
AGT	A01	17,57	17,14	5,1E-06	6,9E-06	0,74	0,8451	-1,35
AKT1	A02	6,01	5,59	1,5E-02	2,1E-02	0,75	0,4864	-1,34
ATF1	A03	4,36	4,26	4,9E-02	5,2E-02	0,94	0,7623	-1,07
BCL10	A04	4,31	4,49	5,1E-02	4,4E-02	1,14	0,1446	1,14
BCL3	A05	6,15	9,77	1,4E-02	1,1E-03	12,28	0,0011	12,28
CFB	A06	10,37	10,05	7,5E-04	9,4E-04	0,80	0,6185	-1,25
BIRC2	A07	3,93	4,46	6,6E-02	4,5E-02	1,44	0,0080	1,44
NOD1	A08	8,29	7,93	3,2E-03	4,1E-03	0,78	0,2327	-1,29
CASP1	A09	11,67	11,43	3,1E-04	3,6E-04	0,84	0,5107	-1,19
CASP8	A10	8,88	8,76	2,1E-03	2,3E-03	0,92	0,5287	-1,09
CCL2	A11	3,27	5,61	1,0E-01	2,1E-02	5,03	0,0236	5,03
CD40	A12	10,36	16,39	7,6E-04	1,2E-05	65,25	0,0001	65,25
CFLAR	B01	3,14	3,76	1,1E-01	7,4E-02	1,53	0,1751	1,53
CHUK	B02	4,28	3,95	5,1E-02	6,5E-02	0,79	0,1371	-1,26
CSF2	B03	7,85	10,89	4,3E-03	5,3E-04	8,23	0,0028	8,23
CSF3	B04	17,57	18,04	5,1E-06	3,7E-06	1,38	0,7631	1,38
SLC44A2	B05	7,43	6,97	5,8E-03	8,0E-03	0,72	0,3787	-1,38
EDARADD	B06	10,49	10,35	7,0E-04	7,7E-04	0,91	0,7697	-1,10
EDG2	B07	17,10	18,39	7,1E-06	2,9E-06	2,45	0,3728	2,45
EGR1	B08	6,78	5,50	9,1E-03	2,2E-02	0,41	0,0852	-2,42
ELK1	B09	5,70	5,32	1,9E-02	2,5E-02	0,77	0,1502	-1,30
F2R	B10	6,96	6,86	8,0E-03	8,6E-03	0,93	0,8578	-1,07
FADD	B11	6,80	6,28	8,9E-03	1,3E-02	0,69	0,2785	-1,44
FASLG	B12	15,76	18,23	1,8E-05	3,3E-06	5,52	0,0259	5,52
FOS	C01	8,90	7,93	2,1E-03	4,1E-03	0,51	0,1878	-1,97
GJA1	C02	10,94	10,43	5,1E-04	7,3E-04	0,70	0,0854	-1,43
HMOX1	C03	16,28	17,75	1,3E-05	4,6E-06	2,77	0,4010	2,77
HTR2B	C04	9,04	8,81	1,9E-03	2,2E-03	0,85	0,7208	-1,17
ICAM1	C05	1,89	5,17	2,7E-01	2,8E-02	9,68	0,0008	9,68
IFNA1	C06	17,57	18,39	5,1E-06	2,9E-06	1,77	0,6167	1,77
IFNB1	C07	17,57	18,39	5,1E-06	2,9E-06	1,77	0,6167	1,77
IFNG	C08	16,24	17,76	1,3E-05	4,5E-06	2,86	0,2822	2,86
IKBKB	C09	4,90	5,20	3,3E-02	2,7E-02	1,23	0,1083	1,23
IKBKE	C10	4,23	7,32	5,3E-02	6,2E-03	8,52	0,0000	8,52
IKBKG	C11	7,12	6,86	7,2E-03	8,6E-03	0,84	0,6318	-1,20
IL10	C12	17,09	18,18	7,2E-06	3,4E-06	2,13	0,4580	2,13
IL1A	D01	7,34	10,87	6,2E-03	5,3E-04	11,56	0,0102	11,56
IL1B	D02	9,90	12,47	1,0E-03	1,8E-04	5,96	0,0511	5,96
IL1R1	D03	9,25	8,45	1,6E-03	2,9E-03	0,57	0,3353	-1,75
IL6	D04	6,28	6,97	1,3E-02	8,0E-03	1,60	0,4580	1,60
IL8	D05	2,07	5,25	2,4E-01	2,6E-02	9,01	0,0053	9,01
IRAK1	D06	6,61	5,74	1,0E-02	1,9E-02	0,55	0,2295	-1,83
IRAK2	D07	5,51	8,88	2,2E-02	2,1E-03	10,30	0,0006	10,30
JUN	D08	7,91	7,77	4,1E-03	4,6E-03	0,90	0,7184	-1,11
LTA	D09	8,58	11,88	2,6E-03	2,7E-04	9,86	0,0133	9,86
LTBR	D10	4,21	3,76	5,4E-02	7,4E-02	0,73	0,0010	-1,37
MALT1	D11	5,27	4,86	2,6E-02	3,4E-02	0,75	0,2111	-1,33
MAP3K1	D12	4,84	5,20	3,5E-02	2,7E-02	1,28	0,3300	1,28
MYD88	E01	6,43	5,75	1,2E-02	1,9E-02	0,62	0,0476	-1,61
NLRP12	E02	17,57	18,39	5,1E-06	2,9E-06	1,77	0,6167	1,77
NFKB1	E03	2,29	4,00	2,0E-01	6,3E-02	3,26	0,0001	3,26
NFKB2	E04	9,55	9,44	1,3E-03	1,4E-03	0,93	0,6595	-1,08
NFKBIA	E05	1,61	5,34	3,3E-01	2,5E-02	13,25	0,0000	13,25
PPM1A	E06	5,65	4,93	2,0E-02	3,3E-02	0,61	0,0174	-1,64
RAF1	E07	3,97	3,83	6,4E-02	7,0E-02	0,90	0,4078	-1,11
REL	E08	5,47	6,12	2,3E-02	1,4E-02	1,56	0,0720	1,56
RELA	E09	5,18	4,95	2,8E-02	3,2E-02	0,85	0,5165	-1,18
RELB	E10	9,00	13,98	1,9E-03	6,2E-05	31,44	0,0023	31,44
TRIM13	E11	5,77	5,35	1,8E-02	2,4E-02	0,75	0,2233	-1,34
RHOA	E12	1,76	1,67	2,9E-01	3,1E-01	0,94	0,8063	-1,07
RIPK1	F01	7,14	6,75	7,1E-03	9,3E-03	0,76	0,3344	-1,32
SLC20A1	F02	2,68	1,99	1,6E-01	2,5E-01	0,62	0,3669	-1,62
STAT1	F03	4,40	4,64	4,7E-02	4,0E-02	1,18	0,5935	1,18
TBK1	F04	4,47	4,58	4,5E-02	4,2E-02	1,08	0,1477	1,08
TICAM2	F05	7,79	7,32	4,5E-03	6,3E-03	0,72	0,0085	-1,39
TLR1	F06	12,88	12,37	1,3E-04	1,9E-04	0,70	0,1147	-1,43
TLR2	F07	13,65	16,66	7,8E-05	9,7E-06	8,06	0,0343	8,06
TLR3	F08	17,57	18,39	5,1E-06	2,9E-06	1,77	0,6167	1,77
TLR4	F09	16,20	17,40	1,3E-05	5,8E-06	2,29	0,4507	2,29
TLR6	F10	8,35	7,99	3,1E-03	3,9E-03	0,78	0,5151	-1,29
TLR7	F11	12,08	17,68	2,3E-04	4,8E-06	48,44	0,0001	48,44
TLR8	F12	16,43	17,01	1,1E-05	7,6E-06	1,49	0,5551	1,49
TLR9	G01	16,39	18,12	1,2E-05	3,5E-06	3,31	0,3512	3,31
TMED4	G02	4,67	4,28	3,9E-02	5,2E-02	0,76	0,3299	-1,31
TNF	G03	7,20	13,70	6,8E-03	7,5E-05	90,38	0,0000	90,38
TNFAIP3	G04	4,51	8,57	4,4E-02	2,6E-03	16,66	0,0001	16,66
TNFRSF10A	G05	6,56	5,83	1,1E-02	1,8E-02	0,60	0,1530	-1,66
TNFRSF10B	G06	6,48	6,57	1,1E-02	1,1E-02	1,07	0,8635	1,07
TNFRSF1A	G07	11,90	10,73	2,6E-04	5,9E-04	0,44	0,0625	-2,26
CD27	G08	14,76	15,99	3,6E-05	1,5E-05	2,35	0,1625	2,35
TNFSF10	G09	4,96	8,26	3,2E-02	3,3E-03	9,84	0,0035	9,84
TNFSF14	G10	11,66	12,17	3,1E-04	2,2E-04	1,42	0,2506	1,42
TRADD	G11	6,02	6,04	1,5E-02	1,5E-02	1,01	0,9539	1,01
TICAM1	G12	5,87	6,44	1,7E-02	1,2E-02	1,48	0,0216	1,48
B2M	H01	0,98	1,50	5,1E-01	3,5E-01	1,43	0,1013	1,43
HPRT1	H02	2,86	2,80	1,4E-01	1,4E-01	0,95	0,7344	-1,05
RPL13A	H03	-0,83	-0,81	1,8E+00	1,8E+00	1,01	0,9258	1,01
GAPDH	H04	-1,92	-2,20	3,8E+00	4,6E+00	0,82	0,3438	-1,21
ACTB	H05	-1,09	-1,28	2,1E+00	2,4E+00	0,88	0,5025	-1,14

Figure 28. Effet de TNFα sur l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-κB dans les cellules K562.

Les valeurs indiquées sont représentatives de trois essais indépendants.

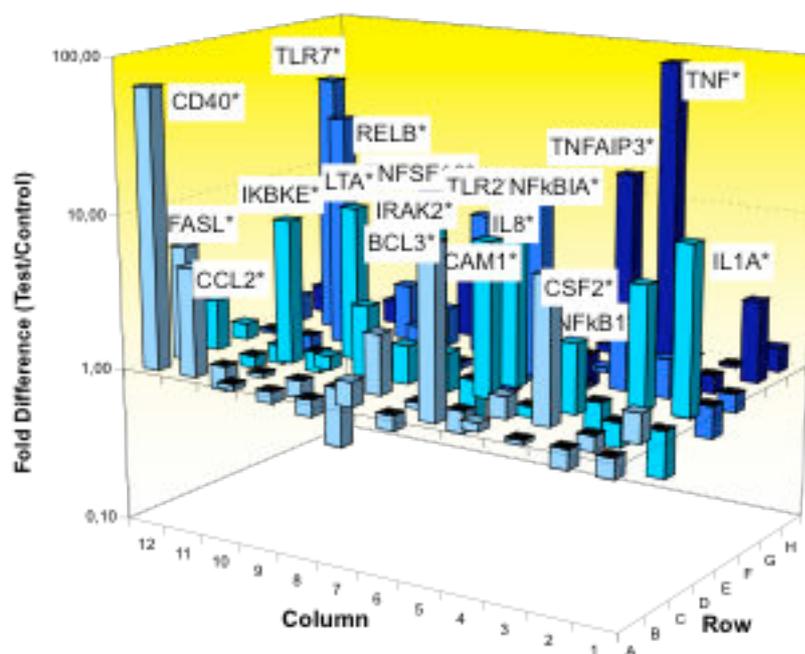


Figure 29. Représentation en 3D des effets de $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules K562.

Représentation en 3D du profil d'expression après induction par $\text{TNF}\alpha$; les résultats sont exprimés en « fold induction » (niveau d'expression $\text{TNF}\alpha$ -induite/niveau d'expression basale, constitutive). Les valeurs indiquées sont représentatives des moyennes de trois essais.

* valeur $p \leq 0,05$

Symbol	Well	AVG ΔC _t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		2 ^Δ -ΔC _t		Fold Difference	T-TEST	Fold Up- or Down- Regulation
		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	p value	Test Sample /Control Sample
AGT	A01	16,85	17,14	8,5E-06	6,9E-06	1,22	0,8573	1,22
AKT1	A02	5,70	5,59	1,9E-02	2,1E-02	0,93	0,8491	-1,08
ATF1	A03	4,24	4,26	5,3E-02	5,2E-02	1,02	0,8775	1,02
BCL10	A04	4,42	4,49	4,7E-02	4,4E-02	1,05	0,6669	1,05
BCL3	A05	5,56	9,77	2,1E-02	1,1E-03	18,44	0,0008	18,44
CFB	A06	10,33	10,05	7,8E-04	9,4E-04	0,82	0,3736	-1,21
BIRC2	A07	3,40	4,46	9,4E-02	4,5E-02	2,08	0,0014	2,08
NOD1	A08	9,15	7,93	1,8E-03	4,1E-03	0,43	0,0001	-2,34
CASP1	A09	12,36	11,43	1,9E-04	3,6E-04	0,52	0,0280	-1,91
CASP8	A10	9,10	8,76	1,8E-03	2,3E-03	0,79	0,0721	-1,27
CCL2	A11	2,46	5,61	1,8E-01	2,1E-02	8,86	0,0195	8,86
CD40	A12	8,73	16,39	2,4E-03	1,2E-05	202,91	0,0001	202,91
CFLAR	B01	2,47	3,76	1,8E-01	7,4E-02	2,45	0,0120	2,45
CHUK	B02	3,95	3,95	6,5E-02	6,5E-02	1,00	0,9829	-1,00
CSF2	B03	7,35	10,89	6,1E-03	5,3E-04	11,67	0,0069	11,67
CSF3	B04	17,71	18,04	4,7E-06	3,7E-06	1,26	0,7245	1,26
SLC44A2	B05	7,40	6,97	5,9E-03	8,0E-03	0,74	0,2055	-1,36
EDARADD	B06	10,13	10,35	8,9E-04	7,7E-04	1,17	0,6486	1,17
EDG2	B07	17,71	18,39	4,7E-06	2,9E-06	1,60	0,5221	1,60
EGR1	B08	6,22	5,50	1,3E-02	2,2E-02	0,61	0,2351	-1,65
ELK1	B09	5,49	5,32	2,2E-02	2,5E-02	0,89	0,4529	-1,13
F2R	B10	7,34	6,86	6,2E-03	8,6E-03	0,71	0,2681	-1,40
FADD	B11	7,34	6,28	6,2E-03	1,3E-02	0,48	0,0697	-2,09
FASLG	B12	17,71	18,23	4,7E-06	3,3E-06	1,43	0,5990	1,43
FOS	C01	7,94	7,93	4,1E-03	4,1E-03	0,99	0,9628	-1,01
GJA1	C02	10,30	10,43	7,9E-04	7,3E-04	1,09	0,6143	1,09
HMOX1	C03	16,52	17,75	1,1E-05	4,6E-06	2,34	0,4442	2,34
HTR2B	C04	8,98	8,81	2,0E-03	2,2E-03	0,89	0,7321	-1,12
ICAM1	C05	0,91	5,17	5,3E-01	2,8E-02	19,13	0,0003	19,13
IFNA1	C06	17,71	18,39	4,7E-06	2,9E-06	1,60	0,5221	1,60
IFNB1	C07	17,71	18,39	4,7E-06	2,9E-06	1,60	0,5221	1,60
IFNG	C08	15,86	17,76	1,7E-05	4,5E-06	3,74	0,0410	3,74
IKKBK	C09	4,73	5,20	3,8E-02	2,7E-02	1,38	0,0260	1,38
IKBKE	C10	3,50	7,32	8,8E-02	6,2E-03	14,14	0,0001	14,14
IKBK	C11	7,00	6,86	7,8E-03	8,6E-03	0,91	0,7623	-1,10
IL10	C12	17,71	18,18	4,7E-06	3,4E-06	1,39	0,6697	1,39
IL1A	D01	5,44	10,87	2,3E-02	5,3E-04	43,15	0,0001	43,15
IL1B	D02	9,62	12,47	1,3E-03	1,8E-04	7,20	0,0302	7,20
IL1R1	D03	8,94	8,45	2,0E-03	2,9E-03	0,71	0,5434	-1,41
IL6	D04	5,98	6,97	1,6E-02	8,0E-03	1,97	0,2440	1,97
IL8	D05	1,70	5,25	3,1E-01	2,6E-02	11,64	0,0030	11,64
IRAK1	D06	6,08	5,74	1,5E-02	1,9E-02	0,79	0,6190	-1,26
IRAK2	D07	5,04	8,88	3,0E-02	2,1E-03	14,30	0,0004	14,30
JUN	D08	6,37	7,77	1,2E-02	4,6E-03	2,64	0,0213	2,64
LTA	D09	6,89	11,88	8,4E-03	2,7E-04	31,66	0,0074	31,66
LTBR	D10	4,15	3,76	5,6E-02	7,4E-02	0,76	0,1757	-1,32
MALT1	D11	5,42	4,86	2,3E-02	3,4E-02	0,68	0,0702	-1,47
MAP3K1	D12	4,48	5,20	4,5E-02	2,7E-02	1,65	0,0989	1,65
MYD88	E01	6,39	5,75	1,2E-02	1,9E-02	0,64	0,0479	-1,56
NLRP12	E02	17,71	18,39	4,7E-06	2,9E-06	1,60	0,5221	1,60
NFKB1	E03	1,74	4,00	3,0E-01	6,3E-02	4,77	0,0002	4,77
NFKB2	E04	8,79	9,44	2,3E-03	1,4E-03	1,57	0,0510	1,57
NFKBIA	E05	1,35	5,34	3,9E-01	2,5E-02	15,94	0,0000	15,94
PPM1A	E06	5,61	4,93	2,0E-02	3,3E-02	0,62	0,0867	-1,60
RAF1	E07	4,08	3,83	5,9E-02	7,0E-02	0,84	0,1104	-1,19
REL	E08	4,69	6,12	3,9E-02	1,4E-02	2,68	0,0007	2,68
RELA	E09	4,99	4,95	3,1E-02	3,2E-02	0,97	0,8572	-1,03
RELB	E10	8,18	13,98	3,5E-03	6,2E-05	55,77	0,0012	55,77
TRIM13	E11	5,46	5,35	2,3E-02	2,4E-02	0,93	0,7641	-1,08
RHOA	E12	1,66	1,67	3,2E-01	3,1E-01	1,01	0,9719	1,01
RIPK1	F01	7,48	6,75	5,6E-03	9,3E-03	0,60	0,0612	-1,67
SLC20A1	F02	2,42	1,99	1,9E-01	2,5E-01	0,74	0,5252	-1,35
STAT1	F03	4,09	4,64	5,9E-02	4,0E-02	1,46	0,1155	1,46
TBK1	F04	4,29	4,58	5,1E-02	4,2E-02	1,23	0,0467	1,23
TICAM2	F05	7,35	7,32	6,1E-03	6,3E-03	0,97	0,7998	-1,03
TLR1	F06	13,28	12,37	1,0E-04	1,9E-04	0,53	0,0000	-1,88
TLR2	F07	13,96	16,66	6,3E-05	9,7E-06	6,50	0,0282	6,50
TLR3	F08	17,51	18,39	5,3E-06	2,9E-06	1,84	0,3627	1,84
TLR4	F09	16,84	17,40	8,5E-06	5,8E-06	1,47	0,6846	1,47
TLR6	F10	8,26	7,99	3,3E-03	3,9E-03	0,83	0,6183	-1,21
TLR7	F11	10,42	17,68	7,3E-04	4,8E-06	153,42	0,0082	153,42
TLR8	F12	16,77	17,01	8,9E-06	7,6E-06	1,17	0,7926	1,17
TLR9	G01	15,83	18,12	1,7E-05	3,5E-06	4,90	0,1853	4,90
TMED4	G02	4,69	4,28	3,9E-02	5,2E-02	0,75	0,2212	-1,33
TNF	G03	6,34	13,70	1,2E-02	7,5E-05	164,81	0,0001	164,81
TNFAIP3	G04	3,41	8,57	9,4E-02	2,6E-03	35,79	0,0001	35,79
TNFRSF10A	G05	5,89	5,83	1,7E-02	1,8E-02	0,96	0,8881	-1,05
TNFRSF10B	G06	5,46	6,57	2,3E-02	1,1E-02	2,16	0,0873	2,16
TNFRSF1A	G07	11,52	10,73	3,4E-04	5,9E-04	0,58	0,2193	-1,74
CD27	G08	15,80	15,99	1,8E-05	1,5E-05	1,14	0,6632	1,14
TNFSF10	G09	4,11	8,26	5,8E-02	3,3E-03	17,81	0,0107	17,81
TNFSF14	G10	10,67	12,17	6,1E-04	2,2E-04	2,83	0,0718	2,83
TRADD	G11	5,79	6,04	1,8E-02	1,5E-02	1,18	0,2333	1,18
TICAM1	G12	5,64	6,44	2,0E-02	1,2E-02	1,74	0,0124	1,74
B2M	H01	0,54	1,50	6,9E-01	3,5E-01	1,94	0,0141	1,94
HPRT1	H02	2,79	2,80	1,4E-01	1,4E-01	1,00	0,9540	1,00
RPL13A	H03	-0,71	-0,81	1,6E+00	1,8E+00	0,93	0,4754	-1,08
GAPDH	H04	-1,80	-2,20	3,5E+00	4,6E+00	0,76	0,1208	-1,32
ACTB	H05	-0,82	-1,28	1,8E+00	2,4E+00	0,73	0,0709	-1,37

Figure 30. Comparaison du profil d'expression TNFα-induite + UNBS1450 de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-κB par rapport à leur profil d'expression constitutive, contrôle dans des cellules K562.

Les valeurs indiquées sont représentatives de trois essais indépendants.

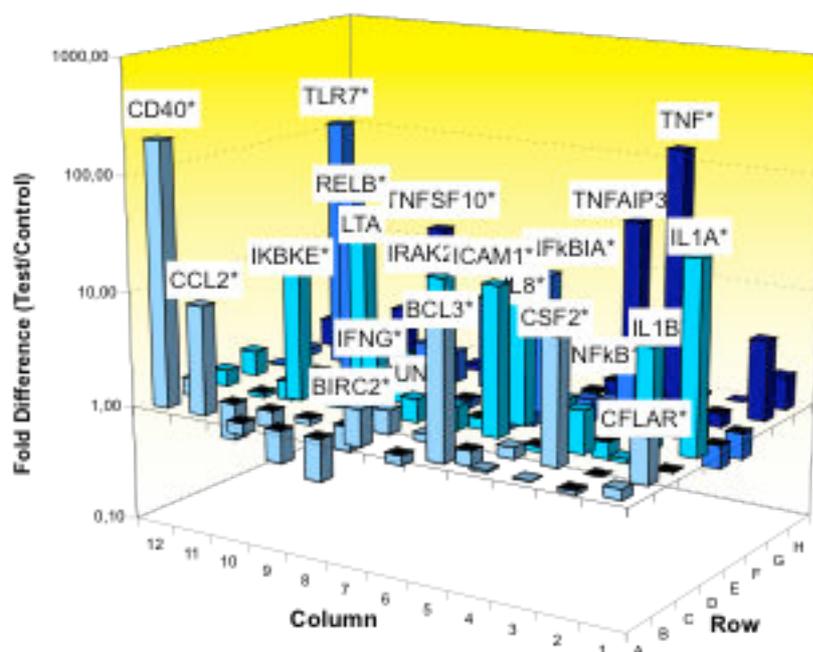


Figure 31. Représentation en 3D des effets de UNBS1450 sur l'induction par TNF α sur l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF- κ B par rapport à l'expression constitutive de ces gènes dans des cellules K562.

Représentation en 3D du profil d'expression après induction par TNF α ; les résultats sont exprimés en « fold induction » (niveau d'expression UNBS1450 + TNF α -induite/niveau d'expression basale, constitutive). Les valeurs indiquées sont représentatives des moyennes de trois essais.

* valeur $p \leq 0,05$

Symbol	Well	AVG ΔC _t (C _t (GOI) - Ave Ct (HKG))		2 ^Δ -ΔC _t		Fold Difference	T-TEST	Fold Up- or Down- Regulation
		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	p value	Test Sample /Control Sample
AGT	A01	16,85	17,57	8,5E-06	5,1E-06	1,65	0,6563	1,65
AKT1	A02	5,70	6,01	1,9E-02	1,5E-02	1,25	0,3056	1,25
ATF1	A03	4,24	4,36	5,3E-02	4,9E-02	1,09	0,7218	1,09
BCL10	A04	4,42	4,31	4,7E-02	5,1E-02	0,93	0,4814	-1,08
BCL3	A05	5,56	6,15	2,1E-02	1,4E-02	1,50	0,1055	1,50
CFB	A06	10,33	10,37	7,8E-04	7,5E-04	1,03	0,9369	1,03
BIRC2	A07	3,40	3,93	9,4E-02	6,6E-02	1,44	0,0109	1,44
NOD1	A08	9,15	8,29	1,8E-03	3,2E-03	0,55	0,0260	-1,82
CASP1	A09	12,36	11,67	1,9E-04	3,1E-04	0,62	0,0280	-1,61
CASP8	A10	9,10	8,88	1,8E-03	2,1E-03	0,86	0,1485	-1,16
CCL2	A11	2,46	3,27	1,8E-01	1,0E-01	1,76	0,4279	1,76
CD40	A12	8,73	10,36	2,4E-03	7,6E-04	3,11	0,0150	3,11
CFLAR	B01	2,47	3,14	1,8E-01	1,1E-01	1,59	0,0486	1,59
CHUK	B02	3,95	4,28	6,5E-02	5,1E-02	1,26	0,1815	1,26
CSF2	B03	7,35	7,85	6,1E-03	4,3E-03	1,42	0,4729	1,42
CSF3	B04	17,71	17,57	4,7E-06	5,1E-06	0,91	0,9376	-1,10
SLC44A2	B05	7,40	7,43	5,9E-03	5,8E-03	1,02	0,9403	1,02
EDARADD	B06	10,13	10,49	8,9E-04	7,0E-04	1,29	0,4048	1,29
EDG2	B07	17,71	17,10	4,7E-06	7,1E-06	0,65	0,7000	-1,53
EGR1	B08	6,22	6,78	1,3E-02	9,1E-03	1,47	0,1535	1,47
ELK1	B09	5,49	5,70	2,2E-02	1,9E-02	1,15	0,1754	1,15
F2R	B10	7,34	6,96	6,2E-03	8,0E-03	0,76	0,4675	-1,31
FADD	B11	7,34	6,80	6,2E-03	8,9E-03	0,69	0,1149	-1,45
FASLG	B12	17,71	15,76	4,7E-06	1,8E-05	0,26	0,1442	-3,85
FOS	C01	7,94	8,90	4,1E-03	2,1E-03	1,94	0,1473	1,94
GJA1	C02	10,30	10,94	7,9E-04	5,1E-04	1,56	0,0276	1,56
HMOX1	C03	16,52	16,28	1,1E-05	1,3E-05	0,84	0,8850	-1,18
HTR2B	C04	8,98	9,04	2,0E-03	1,9E-03	1,04	0,9259	1,04
ICAM1	C05	0,91	1,89	5,3E-01	2,7E-01	1,98	0,0512	1,98
IFNA1	C06	17,71	17,57	4,7E-06	5,1E-06	0,91	0,9376	-1,10
IFNB1	C07	17,71	17,57	4,7E-06	5,1E-06	0,91	0,9376	-1,10
IFNG	C08	15,86	16,24	1,7E-05	1,3E-05	1,30	0,7906	1,30
IKBKB	C09	4,73	4,90	3,8E-02	3,3E-02	1,13	0,3032	1,13
IKBKE	C10	3,50	4,23	8,8E-02	5,3E-02	1,66	0,0361	1,66
IKBKG	C11	7,00	7,12	7,8E-03	7,2E-03	1,09	0,7118	1,09
IL10	C12	17,71	17,09	4,7E-06	7,2E-06	0,65	0,6966	-1,54
IL1A	D01	5,44	7,34	2,3E-02	6,2E-03	3,73	0,0549	3,73
IL1B	D02	9,62	9,90	1,3E-03	1,0E-03	1,21	0,6513	1,21
IL1R1	D03	8,94	9,25	2,0E-03	1,6E-03	1,24	0,6071	1,24
IL6	D04	5,98	6,28	1,6E-02	1,3E-02	1,23	0,6042	1,23
IL8	D05	1,70	2,07	3,1E-01	2,4E-01	1,29	0,4244	1,29
IRAK1	D06	6,08	6,61	1,5E-02	1,0E-02	1,45	0,1530	1,45
IRAK2	D07	5,04	5,51	3,0E-02	2,2E-02	1,39	0,0422	1,39
JUN	D08	6,37	7,91	1,2E-02	4,1E-03	2,91	0,0008	2,91
LTA	D09	6,89	8,58	8,4E-03	2,6E-03	3,21	0,2155	3,21
LTBR	D10	4,15	4,21	5,6E-02	5,4E-02	1,04	0,8275	1,04
MALT1	D11	5,42	5,27	2,3E-02	2,6E-02	0,90	0,5468	-1,11
MAP3K1	D12	4,48	4,84	4,5E-02	3,5E-02	1,29	0,0374	1,29
MYD88	E01	6,39	6,43	1,2E-02	1,2E-02	1,03	0,6329	1,03
NLRP12	E02	17,71	17,57	4,7E-06	5,1E-06	0,91	0,9376	-1,10
NFKB1	E03	1,74	2,29	3,0E-01	2,0E-01	1,46	0,0415	1,46
NFKB2	E04	8,79	9,55	2,3E-03	1,3E-03	1,70	0,0065	1,70
NFKBIA	E05	1,35	1,61	3,9E-01	3,3E-01	1,20	0,2278	1,20
PPM1A	E06	5,61	5,65	2,0E-02	2,0E-02	1,03	0,9136	1,03
RAF1	E07	4,08	3,97	5,9E-02	6,4E-02	0,93	0,5331	-1,08
REL	E08	4,69	5,47	3,9E-02	2,3E-02	1,71	0,0277	1,71
RELA	E09	4,99	5,18	3,1E-02	2,8E-02	1,14	0,5343	1,14
RELB	E10	8,18	9,00	3,5E-03	1,9E-03	1,77	0,0284	1,77
TRIM13	E11	5,46	5,77	2,3E-02	1,8E-02	1,24	0,1828	1,24
RHOA	E12	1,66	1,76	3,2E-01	2,9E-01	1,07	0,6502	1,07
RIPK1	F01	7,48	7,14	5,6E-03	7,1E-03	0,79	0,3617	-1,27
SLC20A1	F02	2,42	2,68	1,9E-01	1,6E-01	1,20	0,5656	1,20
STAT1	F03	4,09	4,40	5,9E-02	4,7E-02	1,24	0,4389	1,24
TBK1	F04	4,29	4,47	5,1E-02	4,5E-02	1,14	0,1048	1,14
TICAM2	F05	7,35	7,79	6,1E-03	4,5E-03	1,35	0,0169	1,35
TLR1	F06	13,28	12,88	1,0E-04	1,3E-04	0,76	0,2026	-1,31
TLR2	F07	13,96	13,65	6,3E-05	7,8E-05	0,81	0,6292	-1,24
TLR3	F08	17,51	17,57	5,3E-06	5,1E-06	1,04	0,9737	1,04
TLR4	F09	16,84	16,20	8,5E-06	1,3E-05	0,64	0,4921	-1,56
TLR6	F10	8,26	8,35	3,3E-03	3,1E-03	1,06	0,8525	1,06
TLR7	F11	10,42	12,08	7,3E-04	2,3E-04	3,17	0,3250	3,17
TLR8	F12	16,77	16,43	8,9E-06	1,1E-05	0,79	0,7836	-1,27
TLR9	G01	15,83	16,39	1,7E-05	1,2E-05	1,48	0,7881	1,48
TMED4	G02	4,69	4,67	3,9E-02	3,9E-02	0,99	0,9511	-1,01
TNF	G03	6,34	7,20	1,2E-02	6,8E-03	1,82	0,1534	1,82
TNFAIP3	G04	3,41	4,51	9,4E-02	4,4E-02	2,15	0,0020	2,15
TNFRSF10A	G05	5,89	6,56	1,7E-02	1,1E-02	1,59	0,0747	1,59
TNFRSF10B	G06	5,46	6,48	2,3E-02	1,1E-02	2,02	0,0258	2,02
TNFRSF1A	G07	11,52	11,90	3,4E-04	2,6E-04	1,30	0,5050	1,30
CD27	G08	15,80	14,76	1,8E-05	3,6E-05	0,49	0,1744	-2,06
TNFSF10	G09	4,11	4,96	5,8E-02	3,2E-02	1,81	0,3928	1,81
TNFSF14	G10	10,67	11,66	6,1E-04	3,1E-04	2,00	0,1178	2,00
TRADD	G11	5,79	6,02	1,8E-02	1,5E-02	1,17	0,3140	1,17
TICAM1	G12	5,64	5,87	2,0E-02	1,7E-02	1,17	0,2606	1,17
B2M	H01	0,54	0,98	6,9E-01	5,1E-01	1,36	0,0079	1,36
HPRT1	H02	2,79	2,86	1,4E-01	1,4E-01	1,05	0,7285	1,05
RPL13A	H03	-0,71	-0,83	1,6E+00	1,8E+00	0,92	0,3758	-1,09
GAPDH	H04	-1,80	-1,92	3,5E+00	3,8E+00	0,92	0,5117	-1,09
ACTB	H05	-0,82	-1,09	1,8E+00	2,1E+00	0,83	0,2012	-1,21

Figure 32. Comparaison du profil d'expression TNFα-induite + UNBS1450 de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-κB par rapport à leur profil d'expression TNFα-induit dans des cellules K562.

Les valeurs indiquées sont représentatives de trois essais indépendants.

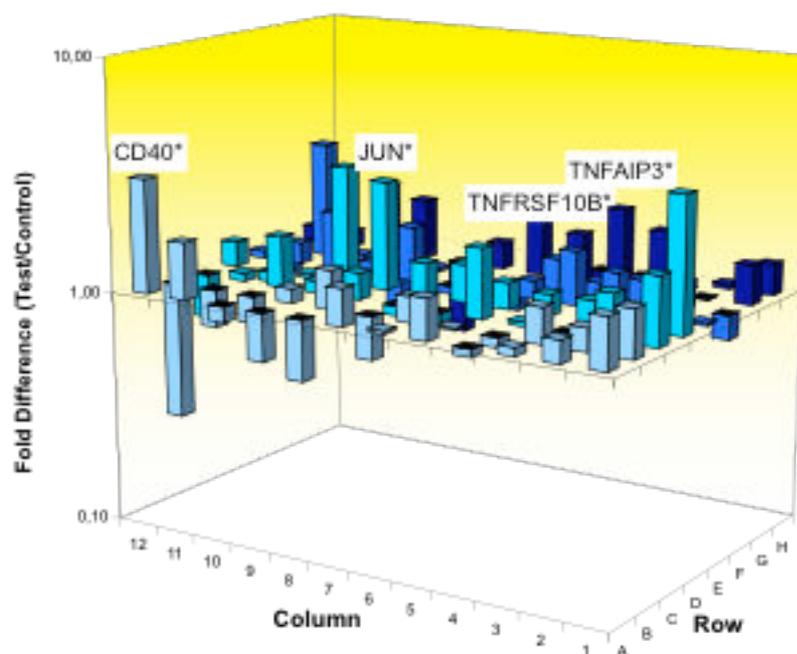


Figure 33. Représentation en 3D des effets de UNBS1450 sur l'induction par $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF- κ B par rapport à l'expression $\text{TNF}\alpha$ -induite de ces gènes dans des cellules K562.

Représentation en 3D du profil d'expression après induction par $\text{TNF}\alpha$; les résultats sont exprimés en « fold induction » (niveau d'expression UNBS1450 + $\text{TNF}\alpha$ -induite/niveau d'expression $\text{TNF}\alpha$ -induit). Les valeurs indiquées sont représentatives des moyennes de trois essais.

* valeur $p \leq 0,05$

Symbol	Well	AVG ΔC _t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		2 ^{Δ-ΔC_t}		Fold Difference	T-TEST	Fold Up- or Down- Regulation
		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	p value	Test Sample /Control Sample
AGT	A01	17,40	17,14	5,8E-06	6,9E-06	0,84	0,8877	-1,20
AKT1	A02	5,10	5,59	2,9E-02	2,1E-02	1,41	0,3910	1,41
ATF1	A03	4,00	4,26	6,3E-02	5,2E-02	1,20	0,3108	1,20
BCL10	A04	4,55	4,49	4,3E-02	4,4E-02	0,96	0,6313	-1,04
BCL3	A05	9,48	9,77	1,4E-03	1,1E-03	1,23	0,6866	1,23
CFB	A06	10,56	10,05	6,6E-04	9,4E-04	0,70	0,1389	-1,43
BIRC2	A07	4,64	4,46	4,0E-02	4,5E-02	0,88	0,3307	-1,13
NOD1	A08	8,96	7,93	2,0E-03	4,1E-03	0,49	0,0244	-2,04
CASP1	A09	11,85	11,43	2,7E-04	3,6E-04	0,75	0,2117	-1,33
CASP8	A10	8,78	8,76	2,3E-03	2,3E-03	0,99	0,9148	-1,01
CCL2	A11	5,85	5,61	1,7E-02	2,1E-02	0,85	0,6028	-1,18
CD40	A12	15,25	16,39	2,6E-05	1,2E-05	2,21	0,1096	2,21
CFLAR	B01	3,52	3,76	8,7E-02	7,4E-02	1,18	0,5044	1,18
CHUK	B02	3,50	3,95	8,8E-02	6,5E-02	1,36	0,1150	1,36
CSF2	B03	11,35	10,89	3,8E-04	5,3E-04	0,73	0,3198	-1,38
CSF3	B04	17,40	18,04	5,8E-06	3,7E-06	1,55	0,5304	1,55
SLC44A2	B05	6,98	6,97	7,9E-03	8,0E-03	0,99	0,9609	-1,01
EDARADD	B06	10,91	10,35	5,2E-04	7,7E-04	0,68	0,3000	-1,47
EDG2	B07	17,40	18,39	5,8E-06	2,9E-06	1,99	0,3896	1,99
EGR1	B08	4,78	5,50	3,7E-02	2,2E-02	1,65	0,2427	1,65
ELK1	B09	5,24	5,32	2,6E-02	2,5E-02	1,05	0,7196	1,05
F2R	B10	7,36	6,86	6,1E-03	8,6E-03	0,71	0,2023	-1,41
FADD	B11	6,82	6,28	8,9E-03	1,3E-02	0,69	0,2464	-1,46
FASLG	B12	17,26	18,23	6,4E-06	3,3E-06	1,96	0,3129	1,96
FOS	C01	6,69	7,93	9,7E-03	4,1E-03	2,35	0,0464	2,35
GJA1	C02	10,41	10,43	7,4E-04	7,3E-04	1,01	0,9500	1,01
HMOX1	C03	17,40	17,75	5,8E-06	4,6E-06	1,27	0,8137	1,27
HTR2B	C04	9,02	8,81	1,9E-03	2,2E-03	0,86	0,5581	-1,16
ICAM1	C05	4,79	5,17	3,6E-02	2,8E-02	1,30	0,2721	1,30
IFNA1	C06	17,40	18,39	5,8E-06	2,9E-06	1,99	0,3896	1,99
IFNB1	C07	17,40	18,39	5,8E-06	2,9E-06	1,99	0,3896	1,99
IFNG	C08	17,40	17,76	5,8E-06	4,5E-06	1,28	0,7213	1,28
IKBK1	C09	5,58	5,20	2,1E-02	2,7E-02	0,77	0,2581	-1,30
IKBKE	C10	7,31	7,32	6,3E-03	6,2E-03	1,01	0,9802	1,01
IKBKG	C11	6,46	6,86	1,1E-02	8,6E-03	1,32	0,4257	1,32
IL10	C12	16,49	18,18	1,1E-05	3,4E-06	3,23	0,0706	3,23
IL1A	D01	10,88	10,87	5,3E-04	5,3E-04	0,99	0,9783	-1,01
IL1B	D02	13,15	12,47	1,1E-04	1,8E-04	0,62	0,4560	-1,60
IL1R1	D03	8,08	8,45	3,7E-03	2,9E-03	1,29	0,7081	1,29
IL6	D04	6,51	6,97	1,1E-02	8,0E-03	1,37	0,5830	1,37
IL8	D05	5,22	5,25	2,7E-02	2,6E-02	1,02	0,9591	1,02
IRAK1	D06	5,10	5,74	2,9E-02	1,9E-02	1,56	0,3463	1,56
IRAK2	D07	9,75	8,88	1,2E-03	2,1E-03	0,55	0,0687	-1,83
JUN	D08	6,05	7,77	1,5E-02	4,6E-03	3,29	0,0264	3,29
LTA	D09	11,63	11,88	3,2E-04	2,7E-04	1,19	0,8521	1,19
LTBR	D10	3,64	3,76	8,0E-02	7,4E-02	1,08	0,5274	1,08
MALT1	D11	5,18	4,86	2,8E-02	3,4E-02	0,80	0,1955	-1,25
MAP3K1	D12	4,73	5,20	3,8E-02	2,7E-02	1,39	0,2715	1,39
MYD88	E01	5,84	5,75	1,8E-02	1,9E-02	0,94	0,7469	-1,06
NLRP12	E02	17,40	18,39	5,8E-06	2,9E-06	1,99	0,3896	1,99
NFKB1	E03	3,81	4,00	7,2E-02	6,3E-02	1,14	0,2173	1,14
NFKB2	E04	9,50	9,44	1,4E-03	1,4E-03	0,96	0,8309	-1,04
NFKBIA	E05	5,60	5,34	2,1E-02	2,5E-02	0,84	0,2052	-1,19
PPM1A	E06	5,14	4,93	2,8E-02	3,3E-02	0,87	0,2648	-1,15
RAF1	E07	3,88	3,83	6,8E-02	7,0E-02	0,97	0,7071	-1,04
REL	E08	5,46	6,12	2,3E-02	1,4E-02	1,58	0,0385	1,58
RELA	E09	5,03	4,95	3,1E-02	3,2E-02	0,94	0,7295	-1,06
RELB	E10	13,40	13,98	9,2E-05	6,2E-05	1,49	0,5459	1,49
TRIM13	E11	5,10	5,35	2,9E-02	2,4E-02	1,19	0,4625	1,19
RHOA	E12	1,59	1,67	3,3E-01	3,1E-01	1,06	0,7969	1,06
RIPK1	F01	7,22	6,75	6,7E-03	9,3E-03	0,72	0,1180	-1,39
SLC20A1	F02	1,58	1,99	3,3E-01	2,5E-01	1,33	0,5277	1,33
STAT1	F03	4,64	4,64	4,0E-02	4,0E-02	1,00	0,9900	1,00
TBK1	F04	4,55	4,58	4,3E-02	4,2E-02	1,02	0,7746	1,02
TICAM2	F05	7,31	7,32	6,3E-03	6,3E-03	1,00	0,9795	1,00
TLR1	F06	12,68	12,37	1,5E-04	1,9E-04	0,80	0,1776	-1,24
TLR2	F07	16,43	16,66	1,1E-05	9,7E-06	1,17	0,8095	1,17
TLR3	F08	17,40	18,39	5,8E-06	2,9E-06	1,99	0,3896	1,99
TLR4	F09	17,40	17,40	5,8E-06	5,8E-06	1,00	1,0000	-1,00
TLR6	F10	7,82	7,99	4,4E-03	3,9E-03	1,12	0,7107	1,12
TLR7	F11	16,90	17,68	8,2E-06	4,8E-06	1,72	0,2464	1,72
TLR8	F12	16,92	17,01	8,1E-06	7,6E-06	1,06	0,8825	1,06
TLR9	G01	15,62	18,12	2,0E-05	3,5E-06	5,67	0,0219	5,67
TMED4	G02	4,29	4,28	5,1E-02	5,2E-02	1,00	0,9798	-1,00
TNF	G03	13,58	13,70	8,2E-05	7,5E-05	1,09	0,7894	1,09
TNFAIP3	G04	8,03	8,57	3,8E-03	2,6E-03	1,46	0,2246	1,46
TNFRSF10A	G05	5,53	5,83	2,2E-02	1,8E-02	1,23	0,4914	1,23
TNFRSF10B	G06	5,94	6,57	1,6E-02	1,1E-02	1,55	0,2432	1,55
TNFRSF1A	G07	10,82	10,73	5,5E-04	5,9E-04	0,94	0,8382	-1,06
CD27	G08	17,04	15,99	7,4E-06	1,5E-05	0,49	0,3909	-2,06
TNFSF10	G09	7,83	8,26	4,4E-03	3,3E-03	1,35	0,7116	1,35
TNFSF14	G10	12,89	12,17	1,3E-04	2,2E-04	0,61	0,1767	-1,65
TRADD	G11	5,89	6,04	1,7E-02	1,5E-02	1,10	0,5842	1,10
TICAM1	G12	6,74	6,44	9,4E-03	1,2E-02	0,81	0,1088	-1,23
B2M	H01	1,26	1,50	4,2E-01	3,5E-01	1,18	0,3609	1,18
HPRT1	H02	2,67	2,80	1,6E-01	1,4E-01	1,09	0,0563	1,09
RPL13A	H03	-0,84	-0,81	1,8E+00	1,8E+00	1,02	0,8537	1,02
GAPDH	H04	-2,02	-2,20	4,1E+00	4,6E+00	0,88	0,4268	-1,13
ACTB	H05	-1,06	-1,28	2,1E+00	2,4E+00	0,86	0,3093	-1,16

Figure 34. Comparaison du profil d'expression UNBS1450-induit de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-κB par rapport à leur profil d'expression constitutif dans des cellules K562.

Les valeurs indiquées sont représentatives de trois essais indépendants.

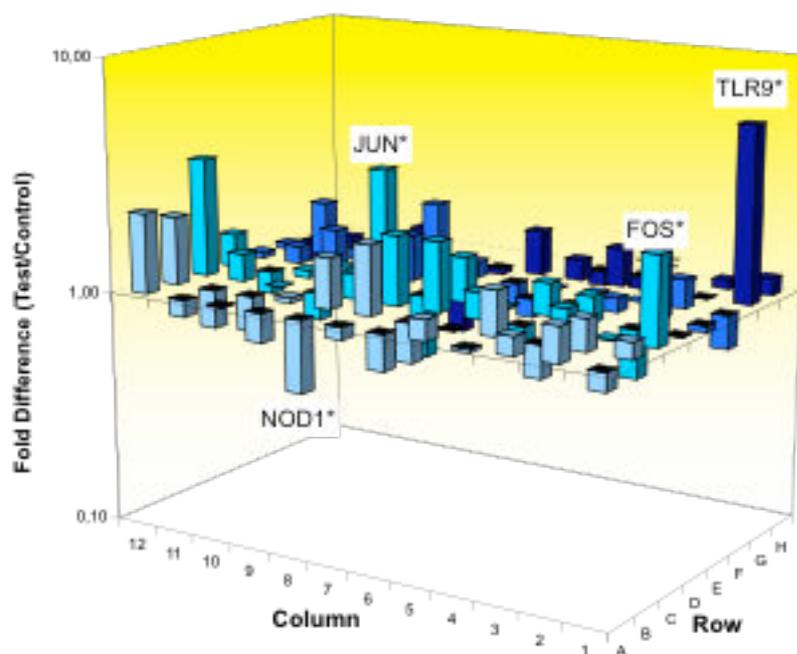


Figure 35. Représentation en 3D des effets de UNBS1450 sur l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF- κ B par rapport à l'expression constitutive de ces gènes dans des cellules K562.

Représentation en 3D du profil d'expression après traitement par UNBS1450 ; les résultats sont exprimés en « fold induction (niveau d'expression après traitement avec UNBS1450/niveau d'expression basale). Les valeurs indiquées sont représentatives des moyennes de trois essais.

* valeur $p \leq 0,05$

4.11. Les conséquences en aval d'une répression de la voie NF- κ B par UNBS1450

Une association entre situation d'inflammation et cancer est bien établie aujourd'hui : le facteur TNF α est en fait un médiateur clé de l'inflammation et du cancer (Balkwill, 2009; Sethi *et al.*, 2008). Comme il a été décrit dans plusieurs études, TNF α , tout comme les cytokines pro-inflammatoires en général, peut être impliqué dans toutes les étapes de la tumorigenèse (Balkwill, 2009). De cette manière, une multitude de gènes propices au développement et à la croissance d'une tumeur sont activés et transcrits, à savoir des gènes comme l'amphiréguline, EGFR et TGF α impliqués dans la prolifération, des gènes à rôle angiogénique comme IL-8 et VEGF ou encore des gènes conduisant à des protéines comme les MMPs, les chemokines ou les intégrines, responsables de l'agressivité voir l'invasivité tumorale.

En incubant différentes lignées cellulaires, à savoir des cellules K562, U937 et Jurkat 24 h en présence de TNF α (20 ng/mL) comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes, nous avons voulu analyser et vérifier ce potentiel inducteur de sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et donc pro-cancérogènes que possède TNF α sur les différentes lignées cellulaires leucémiques prises en considération pour nos études.

Comme le montre la Figure 36, des conditions identiques de stimulation des différentes lignées cellulaires n'ont pas conduit à des résultats similaires. C'est ainsi qu'une activation par TNF α (20 ng/mL) n'a par exemple aucun effet sur les Jurkat en termes de sécrétion d'IL-8 ; les concentrations mesurées en IL-8 restent proches de celles obtenues pour les valeurs contrôles. Par contre, la présence du TNF α induit fortement la sécrétion d'IL-8 par les cellules K562 et U937, avec des concentrations en IL-8 supérieures à 1000 pg/mL. En tenant compte des valeurs obtenues pour les échantillons contrôles, TNF α entraîne une induction d'un facteur supérieur à 9 pour les cellules K562 et même légèrement supérieur à 10 pour les cellules U937.

Ces résultats montrent que nos modèles cellulaires leucémiques sont bien sensibles à un hypothétique microenvironnement tumoral pro-inflammatoire. Pour la suite de nos travaux, nous considérons donc que notre modèle de traitement cellulaire mime effectivement une situation propice au développement de cancers, dont des leucémies. IL-8 nous sert dans

nos études comme exemple de gène stimulé par $\text{TNF}\alpha$ *via* la voie de signalisation NF- κ B, procurant aux cellules leucémiques un caractère plus agressif et résistant.

Vu que l'interleukine-8 est un gène typiquement sous contrôle transcriptionnel de NF- κ B, notre idée était de confirmer les effets observés de UNBS1450 en aval de l'activité du facteur de transcription NF- κ B. Depuis notre étude préliminaire sur l'inductibilité des cellules K562, U937 et Jurkat, nous savons que les cellules K562 et U937 sont sensibles à une stimulation par $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/mL), ce qui est suivi d'une augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'IL-8, à l'inverse des cellules Jurkat qui servent de témoin négatif. Comme précédemment, les cellules ont été prétraitées pendant 2 h par UNBS1450 utilisé à différentes concentrations, allant de 10 à 50 nM, avant d'être activées pendant 24 h par $\text{TNF}\alpha$. La Figure 37A illustre les résultats obtenus pour nos trois lignées cellulaires : nous pouvons voir que pour les cellules K562, des concentrations assez modestes, aux alentours de 10 à 20 nM, sont suffisantes pour ramener la sécrétion en IL-8 à moins de 50 % de celle induite par $\text{TNF}\alpha$ en absence de UNBS1450 : si $\text{TNF}\alpha$ augmente la sécrétion en IL-8 de ≤ 200 pg/mL à ≥ 1200 pg/mL, 10 nM d'UNBS1450 réduisent la sécrétion en IL-8 à 45 % du niveau $\text{TNF}\alpha$ -induit, tandis que UNBS1450 utilisé à concentration maximale (50 nM) réduit la sécrétion à 35 % du taux initialement induit. Nous observons ainsi un seuil d'inhibition maximale pour les cellules K562 : UNBS1450 employé à des concentrations allant de 10 à 50 nM, n'est pas en mesure de réduire de plus 65 % la sécrétion de l'IL-8 suite à une stimulation de l'activité NF- κ B via $\text{TNF}\alpha$. De plus, les niveaux de sécrétion d'IL-8 résultants demeurent nettement plus élevés que ceux observés pour les cellules K562 non activées par $\text{TNF}\alpha$ (≤ 135 pg/mL).

Pour les cellules U937, les résultats obtenus diffèrent de ceux obtenus pour les cellules K562 : comme pour les dernières, une activation de 24 h par $\text{TNF}\alpha$ conduit à une élévation de la sécrétion en IL-8 que UNBS1450 est capable de réprimer partiellement (Figure 37B). Cependant, les cellules U937 sont moins sensibles au prétraitement par UNBS1450. UNBS1450 appliqué à 10 nM n'entraîne pas de diminution significative de la sécrétion d'IL-8. Nous n'avons obtenu une inhibition significative par UNBS1450 de la sécrétion d'IL-8 qu'à partir de 20 nM (28 % d'inhibition). Cependant, pour les concentrations prises en considération, il n'y a pas d'effet seuil comme c'est le cas pour les cellules K562 : UNBS1450 employé à 30 nM entraîne une diminution de 38 %, à 40 nM de 48 et à 50 de 57 %.

Les cellules Jurkat servent ici de témoin négatif : le facteur $\text{TNF}\alpha$ n'étant pas en mesure de stimuler la sécrétion d'IL-8, une préincubation en présence de UNBS1450 ne change en rien ces résultats (les résultats ne figurent pas sur le graphique).

Au final, ces résultats vont de paire avec ceux obtenus lors de l'inhibition de l'activité du facteur de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$: des concentrations de l'ordre de grandeur nanomolaire d'UNBS1450 suffisent pour réduire l'activation $\text{TNF}\alpha$ -induite de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et par conséquent la sécrétion de protéines pro-inflammatoires telles que IL-8. Nous retenons que les cellules K562 sont plus sensibles à un traitement par UNBS1450.

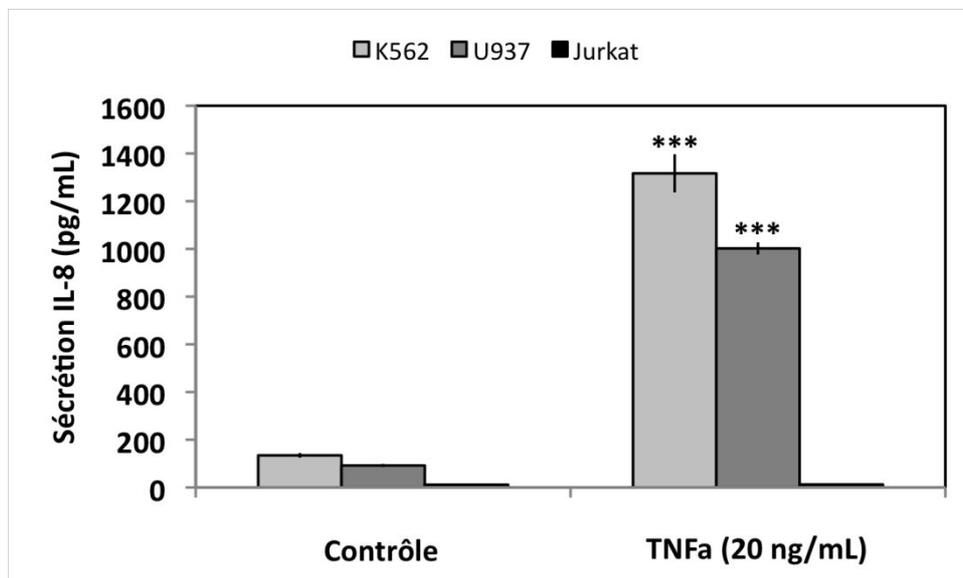


Figure 36. Synthèse d'IL-8 par les K562, U937 et Jurkat.

Les cellules ont été incubées avec du RPMI + 10 % de SVF (Contrôle) ou du RPMI + 10 % de SVF + TNF α (20 ng/mL) pendant 24 h. L'IL-8 a été dosé dans les surnageants de culture par un test ELISA en sandwich. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués d'une façon indépendante. Les résultats sont montrés comme la moyenne \pm un écart-type.

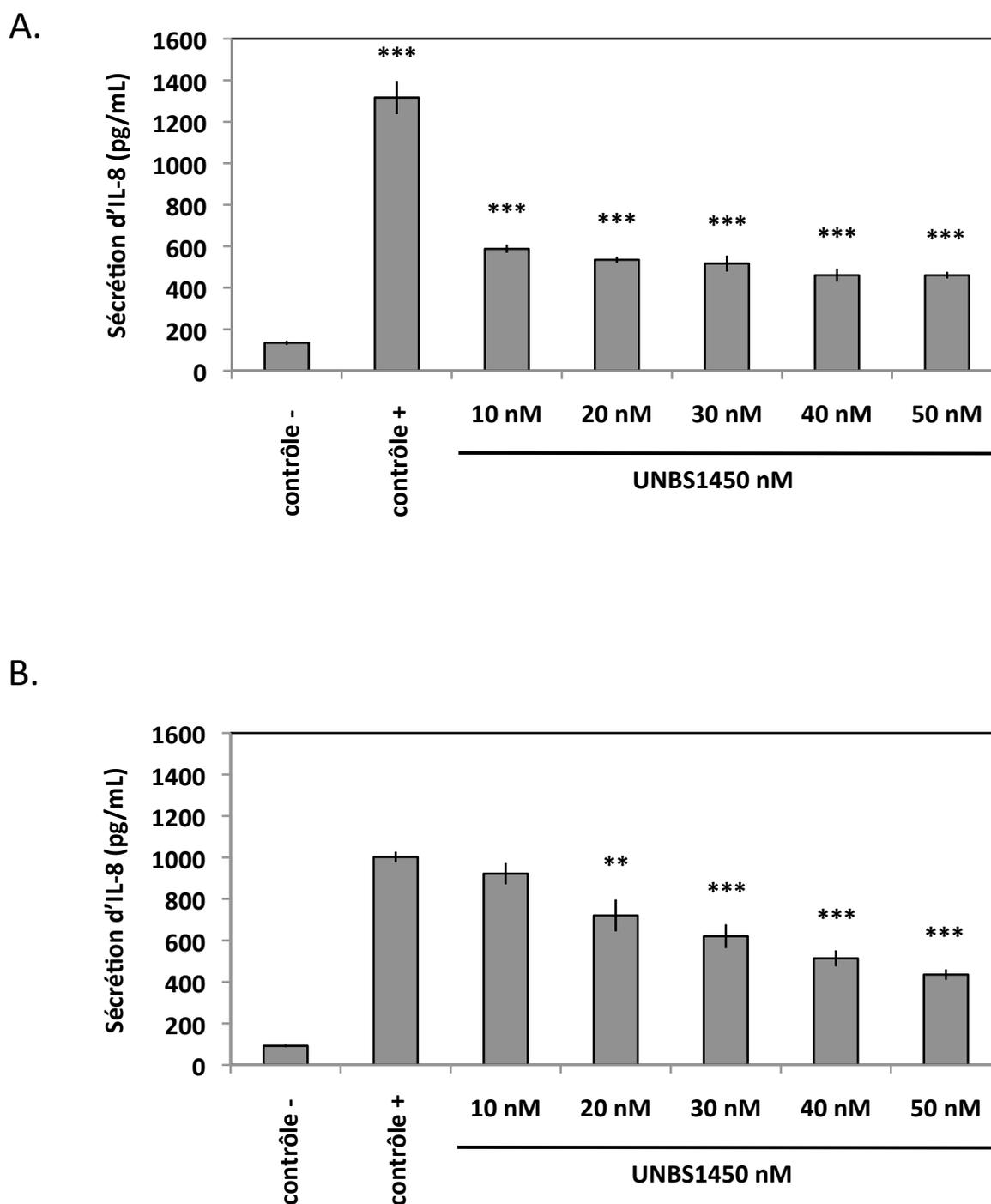


Figure 37. Les effets de UNBS1450 sur la synthèse de l'IL-8.

Les cellules K562 (A) et U937 (B) ont été incubées avec du RPMI + 10 % SVF en présence ou en absence de UNBS1450. L'IL-8 a été dosé dans les surnageants de culture par un test ELISA en sandwich. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais effectués indépendamment. Les résultats sont montrés comme la moyenne \pm un écart-type.

5. DISCUSSION

5.1. Des substances naturelles en tant qu'agents anticancéreux cytotoxiques

À travers toutes les cultures du monde et pendant de nombreuses années, des produits naturels d'origine terrestre, plantes et microorganismes, étaient sources de molécules médicamenteuses aux potentiels antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasites, anti-inflammatoires et anticancéreux. En 1964 un congrès intitulé "Drugs from the Sea" rassemblait pour la première fois des chercheurs pour qui la flore marine constituait un énorme réservoir de produits naturels.

Aujourd'hui la recherche sur des produits naturels, maritimes et terrestres, à potentiels anticancéreux en l'occurrence, constitue un élément essentiel du perpétuel agrandissement du répertoire de médicaments anticancéreux servant d'outils en oncologie ; les produits d'origine naturelle sont aujourd'hui largement répandus dans la thérapie anticancéreuse. De 1981 à 2002 par exemple, parmi tous les médicaments développés, 24 % dérivait d'une substance naturelle (Chin et al., 2006). Par toutes ces substances naturelles, certaines sont connues de posséder des effets cytotoxiques anticancéreux et sont déjà appliquées en clinique depuis des années. En tant qu'exemples, on peut citer : la Vinblastine et la Vincristine, toutes deux isolées à partir *Catharanthus roseus* (Horvath and Ivanyi, 1982), la Camptothécine, isolée depuis *Camptotheca acuminata* (Oberlies and Kroll, 2004) et démontrée d'agir par inhibition sélective de la topoisomérase I, et Paclitaxel originaire de *Taxus brevifolia* (Wall and Wani, 1996).

Prometteur aussi est le fait que de nombreuses substances naturelles à effets anticancéreux se trouvent actuellement dans les phases d'essais cliniques. Plusieurs études effectuées durant la dernière décennie ont par exemple montré que la curcumine, extraite de *Curcuma longa*, une plante herbacée rhizomateuse vivace originaire de l'Asie du sud-est, constitue un puissant agent anticancéreux (Aggarwal et al., 2003). Les études cliniques de phase II ont été effectuées récemment ; les résultats s'avèrent prometteurs. L'épigallocatechine gallate (EGCG) extraite du thé vert en constitue un autre exemple bien connu. Lors d'essais cliniques, EGCG a surtout mis en évidence des effets bénéfiques dans la thérapie de cancers du sein et de la prostate (www.clinicaltrials.gov).

L'intérêt croissant dans les stéroïdes cardiaques en tant que possibles agents thérapeutiques cytotoxiques prend probablement issu d'études épidémiologiques réalisées par Stenkvist *et al.* : ils avaient montré que très peu de patients ayant été sous traitement par des stéroïdes cardiaques sont décédés à cause d'un cancer. La létalité du cancer du sein par exemple, se retrouvait fortement réduite (de 34 % à 6 %) chez des patients sous traitements par des glycosides de *Digitalis* (Stenkvist, 2001). Dans un contexte similaire, il a été démontré que l'apparition de leucémies est significativement moins fréquente au sein d'une population statistique de patients possédant une insuffisance cardiaque sous thérapie par des glycosides cardiaques. A l'instar de *Digitalis*, la bufaline, glycoside cardiaque budadiénolidique largement répandue dans la médecine traditionnelle chinoise, constitue un autre exemple : des résultats prometteurs ont été obtenus dans le traitement de leucémies et d'hépatocarcinomes.

De nombreux travaux de recherche ont mis en évidence des effets anticancéreux des glycosides cardiaques depuis (Mijatovic, 2007; Prassas and Diamandis, 2008; Therien and Blostein, 2000). Parmi les découvertes les plus importantes, on note que les glycosides cardiaques sont capables de bloquer diverses cellules cancéreuses dans la phase G2/M du cycle cellulaire. Weidemann *et al.* ont établi une hypothèse selon laquelle ces observations seraient liées à des altérations non seulement au niveau du métabolisme de substances endogènes du type stéroïde cardiaque mais aussi au niveau d'interactions de ces dernières avec les ATPases Na^+/K^+ (Weidemann, 2005), interactions confirmées par Mijatovic *et al.* (Mijatovic et al., 2007b).

5.2. UNBS1450 induit une mort cellulaire apoptotique des cellules leucémiques K562 et U937 en activant les caspases initiatrices et effectrices, et en réprimant l'expression de Mcl-1

Par nos travaux, nous démontrons que UNBS1450, un stéroïde glycosidique appartenant à la famille des cardénolides, réduit d'une façon significative la viabilité de lignées cellulaires leucémiques, induisant la mort cellulaire par voie apoptotique.

Alors que UNBS1450 avait jusqu'à présent été appliqué à des tumeurs solides (Mijatovic et al., 2007a; Mijatovic et al., 2006b), nous confirmons par nos études que

UNBS1450 a aussi un impact sur la capacité de survie de cellules non adhérentes leucémiques. Comme nous l'avons mis en évidence par immunomarquage avec Annexine V/PI et par coloration des noyaux cellulaires par Hoechst, UNBS1450 conduit à une fragmentation nucléaire et donc à une réduction quantitative des cellules ; UNBS1450 provoque une induction apoptotique. D'après nos analyses par Western Blots, nous avons pu observer que UNBS1450 appliqué à des concentrations nanomolaires est capable d'induire le clivage des caspases initiateuses 8 et 9. De plus, nous avons également pu mettre en avant une induction de clivage de la pro-caspase 7. Ces résultats nous dirigent vers une conclusion hypothétique d'après laquelle UNBS1450 mènerait à une mort cellulaire par apoptose par activation successive voire en parallèle de caspases effectrices comme notamment les caspases 7 et 3.

Une estimation de l'activité proliférative des cellules K562 et U937 en présence de UNBS1450 a révélé que UNBS1450 est capable d'affecter la prolifération cellulaire s'il est appliqué à des doses inférieures à celles nécessaires à l'induction de l'apoptose. Ceci est bien dans la logique de connaissances établies (Mijatovic et al., 2007b).

Par conséquent, nous avons étudié les effets de UNBS1450 sur plusieurs protéines de la famille Bcl-2, ceci dans le but de conclure sur l'éventualité d'une amplification du signal de mort cellulaire à travers une activation des voies apoptotiques intrinsèques mitochondriales (Daniel et al., 2001; Kaufmann and Steensma, 2005). De nombreux travaux de recherche soulignent l'importance de ces protéines dans l'induction de l'apoptose (Arena et al., 2003; Bouillet et al., 1999; Bouillet and Strasser, 2002; Lomonosova and Chinnadurai, 2008). Une perte de l'expression aussi bien qu'une surexpression de protéines de la famille Bcl-2 peuvent, selon leur potentiel pro- ou anti-apoptotique, aboutir à une oncogenèse, en raison d'une élimination déficitaire de cellules malignes. Il est ainsi admis qu'une surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 annule toute induction apoptotique stimulée par TNF α (Henson et al., 2003; Taniai et al., 2004; Zhang and Fang, 2005). C'est ainsi que nous avons analysé par Western Blots les niveaux d'expression de XIAP, membre de la famille des inhibiteurs de l'apoptose IAPs, de Bcl-2 et de Mcl-1, appartenant tous les deux à la sous-famille des protéines anti-apoptotiques Bcl-2. Tandis que les niveaux d'expression de XIAP et de Bcl-2 restent sensiblement identiques quelque soit la durée de traitement avec UNBS1450, nous avons observé une forte diminution de l'expression de Mcl-1 par UNBS1450. Le fait que des concentrations en UNBS1450 remarquablement basses de l'ordre

de grandeur nanomolaire soient suffisantes pour créer l'impact observé sur l'expression de la protéine Mcl-1, suggère que cette protéine anti-apoptotique pourrait jouer un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose par UNBS1450.

Mcl-1 agit en se liant directement aux protéines Bak et Bax qui sont deux membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. En ce qui concerne les protéines de la famille Bcl-2, la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale peut être activée par divers signaux. Des protéines à simple domaine BH3, comme par exemple Bim, Bid, Bad, Noxa et Puma, interagissent avec des membres anti-apoptotiques comme par exemple Mcl-1 ce qui provoque une inhibition des protéines pro-apoptotiques comme Bak et Bax (Kang and Reynolds, 2009). Une répression directe ou indirecte de Mcl-1 conduit à une activation et une oligomérisation des protéines Bak et Bax, entraînant une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et donc un relargage du cytochrome c aboutissant finalement à la mort cellulaire par apoptose (Spierings et al., 2005). Nos résultats suggèrent fortement que cette voie de signalisation soit stimulée par UNBS1450 au sein de lignées cellulaires leucémiques humaines. De plus amples études sont encore nécessaires afin d'établir un lien entre une liaison de UNBS1450 à la sous-unité $\alpha 1$ des ATPases Na^+/K^+ et l'inhibition de l'expression de Mcl-1 avec comme conséquence une induction apoptotique.

5.3. Répression de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par UNBS1450 et possibilité d'un lien entre activité NF- κ B réduite par UNBS1450 et induction apoptotique

Il est aujourd'hui largement établi que le facteur de transcription NF- κ B constitue un facteur anti-apoptotique majeur (Gilmore, 1997; Reuter et al., 2008). Alors qu'à présent UNBS1450 a été essentiellement appliqué à des tumeurs solides (Mijatovic et al., 2007a; Mijatovic et al., 2006b), nous confirmons par nos résultats qu'une désactivation de la voie de signalisation NF- κ B par UNBS1450 existe aussi au sein de cellules leucémiques humaines, comme indiqué par une réduction d'une activité transcriptionnelle induite de NF- κ B, par une activité liante de NF- κ B à ses séquences génomiques cibles, ainsi que par une synthèse réprimée de gènes NF- κ B-dépendants. Une induction TNF α -induite de la translocation du cytoplasme vers le noyau de p65 est fortement diminuée par la présence de UNBS1450, conséquence d'une dégradation réduite de I κ B α .

Cependant, nous ne pouvons pas affirmer que la répression observée par UNBS1450 de la voie de signalisation NF- κ B soit connectée à l'induction apoptotique constatée : UNBS1450 ne montre en effet pas de potentiel inhibiteur sur l'activité constitutive, basale de NF- κ B dans les cellules K562, alors que la mort cellulaire par apoptose est sensiblement induite.

Cela n'empêche pas l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B par UNBS1450 d'être un résultat extrêmement important : à part une expression constitutive de NF- κ B fréquente dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses contribuant à une résistance envers des agents thérapeutiques anticancéreux et une agressivité accrue (Ahn et al., 2008; Karin and Greten, 2005; Wu and Zhou, 2010), il est de nos jours largement établi qu'une sécrétion de TNF α par le microenvironnement tumoral est une caractéristique typique de nombreuses tumeurs malignes ; dans ce contexte, TNF α agit en tant que modulateur de l'activation de processus inflammatoires et d'oncogenèse (Balkwill, 2009; Mantovani, 2009). Par une liaison à des récepteurs situés à la surface de cellules épithéliales et stromales, TNF α peut, soit influencer directement la prolifération et la survie de cellules malignes, soit induire indirectement une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires générales comme TNF α lui-même, IL-1, IL-6 et IL-8 par les cellules stromales voisines, par les macrophages, par les cellules dendritiques et par les fibroblastes (Sethi et al., 2008). Comme cela crée une situation propice à des aberrations génétiques et à une survie et une prolifération accrues de cellules tumorales, une répression par UNBS1450 de la voie de signalisation NF- κ B, TNF α -induite en l'occurrence, constitue un excellent potentiel anticancéreux.

5.4. Prévion d'un possible stress oxydant induit par UNBS1450

Plusieurs processus cellulaires comme le métabolisme énergétique et la défense inflammatoire de l'hôte impliquent des réactions d'oxydations et des réductions. Ces réactions redox, allant du simple transfert d'électrons à la formation de radicaux libres, aux transferts d'hybrides et à des échanges thiol-disulfures, se produisent dans tous les compartiments cellulaires (Winyard et al., 2005).

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, les agents thérapeutiques ciblant le statut redox des cellules tumorales peuvent, soit réduire les

mécanismes de défense des cellules anticancéreuses (Kinnula VL, 2004), soit posséder un fort potentiel oxydant (Fleury et al., 2002; Le Bras et al., 2005) et induire de cette manière une mort cellulaire, notamment en induisant les voies apoptotiques (Tohyama et al., 2004; Tripathi and Hildeman, 2004; Valko et al., 2007). Suite à une première expérience réalisée en association de UNBS1450 et NAC, BSO ou Trolox, nous pouvons voir qu'un prétraitement par NAC inhibe partiellement l'action de UNBS1450 sur les cellules leucémiques K562 (**Figure 38**). NAC procure ainsi aux cellules une synthèse accrue de glutathion, principal protecteur antioxydant intrinsèque.

Cependant, comme la BSO qui prive les cellules en glutathion, et agit donc en tant qu'antagoniste par rapport à NAC, n'accentue pas d'une manière significative l'effet pro-apoptotique de UNBS1450, et comme les effets provoqués par Trolox, antioxydant puissant séquestrant directement les EROs, diffèrent sensiblement de ceux observés pour NAC, nous pouvons hypothétiquement considérer que UNBS1450 serait plutôt capable d'induire un stress oxydant menant à une oxydation de groupements -thiol en disulfides, contribuant finalement à une initiation de l'apoptose. En interagissant avec des dérivés d'acides sulféniques, NAC peut réduire les liaisons disulfures impliquées dans les signalisations redox, et accroît ainsi la réserve cellulaire en scavengers de radicaux libres (Parasassi et al., 2010).

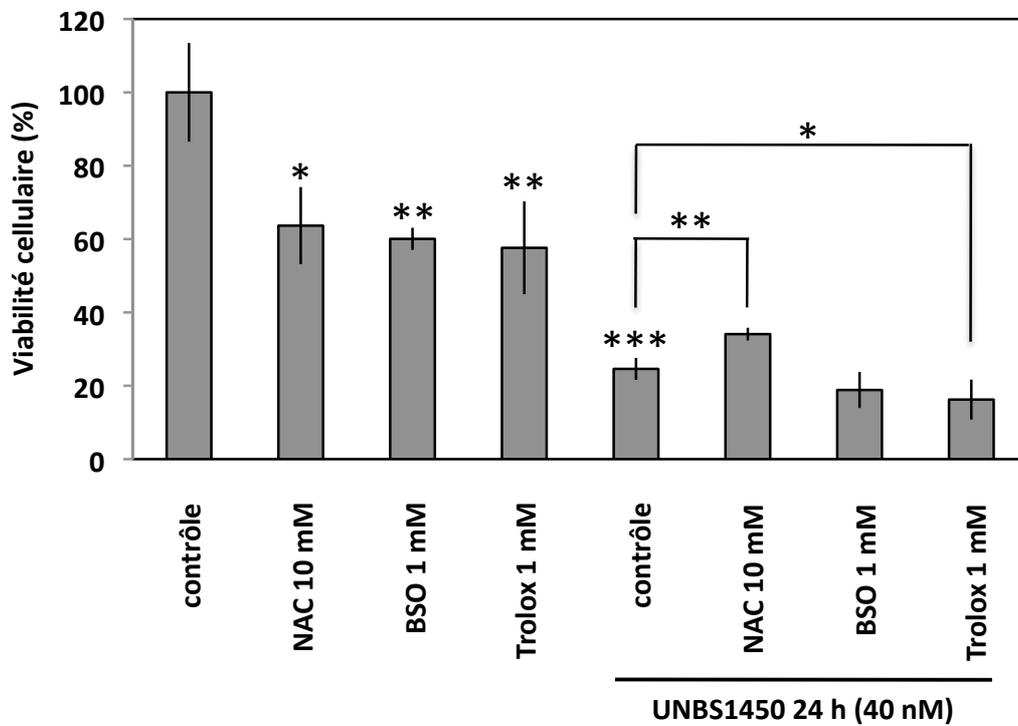


Figure 38. Etude d'un caractère oxydant de UNBS1450 contribuant à l'induction apoptotique.

Cultivées dans du milieu RPMI + 10 % de SVF, 1 % AB à 37 °C, les cellules ont été prétraitées par NAC 10 mM (48 h), BSO 1 mM (24 h) et Trolox 1 mM (1 h) avant d'être stimulées ou non par UNBS1450 40 nM pendant 24 h. Les résultats représentent les moyennes d'une expérience réalisée en triple, \pm les écart-types.

* $p \leq 0,05$

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1. Conclusion

L'ensemble de nos études portant sur les effets de UNBS1450 sur des lignées cellulaires leucémiques tout comme sur des cellules mononucléées de sang périphérique permettent de compléter les connaissances déjà acquises sur les mécanismes par lesquels UNBS1450 inhibe une expansion tumorale en induisant une mort cellulaire. A côté des activités anticancéreuses par autophagie de UNBS1450 (Mijatovic et al., 2008; Mijatovic et al., 2006a), essentiellement observées sur des glioblastomes ou NSCLC, nous démontrons que ce cardénolide semi-synthétique induit d'une façon rapide et effective une mort cellulaire par apoptose de lignées cellulaires leucémiques humaines. Tout en réprimant la voie de signalisation NF- κ B induite, UNBS1450 active la voie apoptotique caspases-dépendante extrinsèque, diminue l'expression de Mcl-1 et active les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax aboutissant ainsi à une mort cellulaire *via* la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale. Comme UNBS1450 ne possède pas d'effet répressif sur l'activité non induite de NF- κ B, nous ne sommes pas en mesure d'établir un lien entre répression de la voie NF- κ B et induction de mort cellulaire apoptotique.

Même si des études complémentaires sont indispensables à une analyse plus complète des cascades de signalisations impliquées, ces résultats montrent pour la première fois que UNBS1450 agit en tant qu'inducteur apoptogénique, avec une spécificité pour les cellules cancéreuses. Cela fait de UNBS1450 un agent anticancéreux prometteur pour de nouveaux traitements thérapeutiques de leucémies et de lymphomes (Figure 39).

6.2. Perspectives

- ✚ Bien que l'observation d'une répression de Mcl-1 et d'une accumulation de Bak et de Bax par microscopie indique une implication de la voie intrinsèque mitochondriale dans la mécanistique pro-apoptotique induite par UNBS1450, des expériences

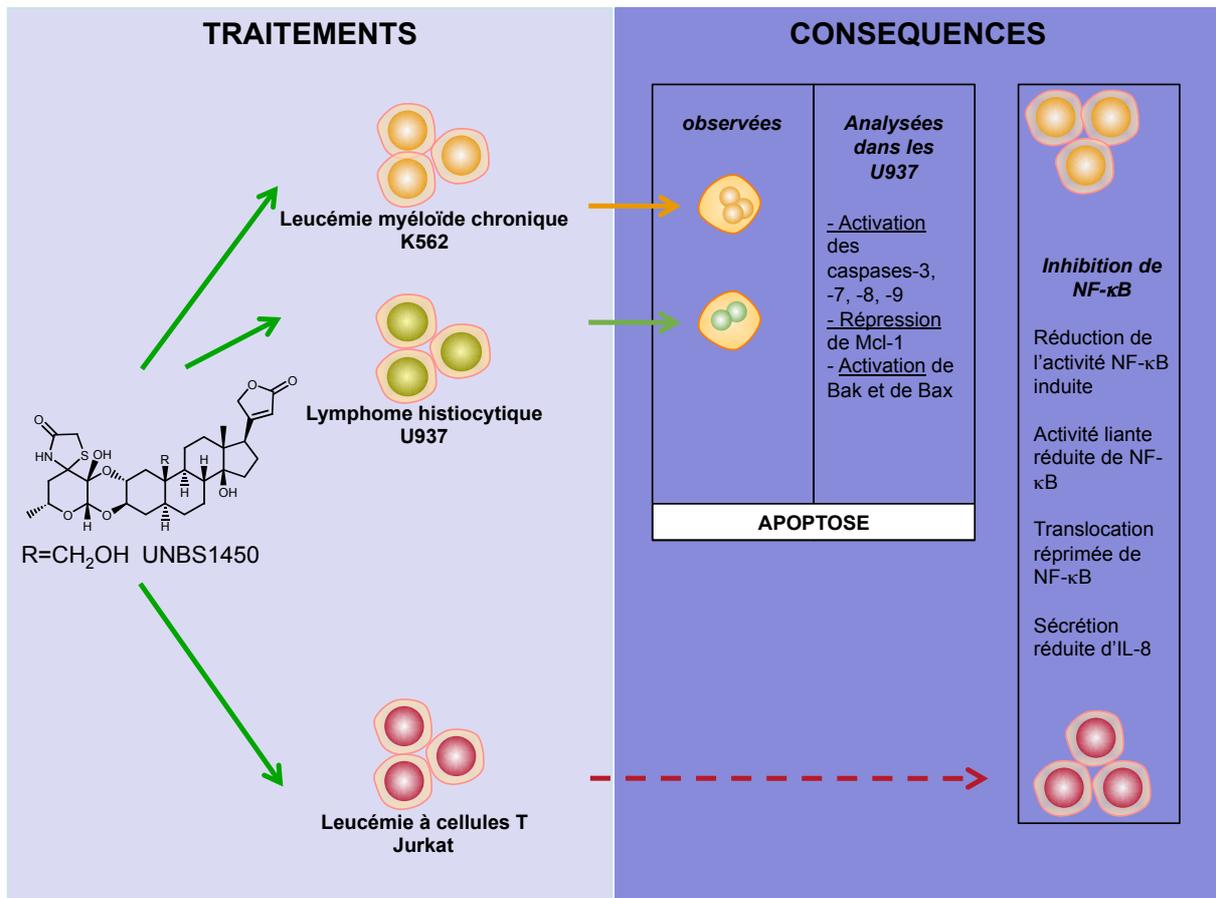


Figure 39. Schéma résumant les résultats obtenus sur les effets de UNBS1450 sur les cellules leucémiques K562, U937 et Jurkat.

Appliqué aux cellules K562 et U937, UNBS1450 conduit à une fragmentation nucléaire, illustrant une entrée en apoptose. Nous avons montré que UNBS1450 induit la voie apoptotique intrinsèque (activation des caspases) mais aussi la voie intrinsèque avec une activation de Bak et de Bax. De plus, UNBS1450 possède un potentiel répresseur sur l'activité induite de la voie de signalisation NF-κB comme nous l'avons illustré avec les cellules Jurkat.

- ✚ supplémentaires sont nécessaires pour détailler d'avantage la cascade de signalisation exacte mise en en cause.
 - Premièrement, il est évidemment nécessaire de confirmer les résultats préliminaires obtenus sur une éventuelle induction d'un stress oxydant par UNBS1450, stress oxydant qui pourrait contribuer à l'activation de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale.
 - Deuxièmement, il paraît intéressant de continuer à étudier l'effet que possède UNBS1450 sur les protéines à simple domaine BH3. Par définition, Bim, Bid, Bad, Noxa et Puma interagissent avec les membres anti-apoptotiques de la famille protéique Bcl-2, contribuant ainsi à une libération de protéines pro-apoptotiques comme Bak et Bax.
 - Troisièmement, il faudrait vérifier que l'activation des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax par UNBS1450 résulte en un relarguage du cytochrome c.
 - Quatrièmement, à l'instar d'une définition plus en détail de l'impact de UNBS1450 sur les protéines impliquées dans la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale, il est également important d'analyser le(s) récepteur(s) par le(s)quel(s) UNBS1450 induit la voie apoptotique extrinsèque aboutissant à l'activation de la caspase-8 comme nous l'avons démontré. Des travaux récents ont mis en évidence une affinité de liaison de UNBS1450 à la sous-unité $\alpha 1$ de l'ATPase Na^+/K^+ . Or nous avons démontré qu'il n'y a pas de lien entre le niveau d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ et le taux d'induction apoptotique atteint dans les cellules leucémiques humaines et les cellules PBMCs.

- ✚ En partant du point de vue que les cellules cancéreuses, leucémiques en l'occurrence, sont caractérisées par une expression constitutive déjà fortement accrue de gènes anti-apoptotiques et pro-inflammatoires, lors des expériences réalisées par PCR en temps réel sur les effets de UNBS1450 sur l'expression de gènes apparentés à la voie de signalisation NF- κ B, nous avons porté notre attention sur le potentiel que possède UNBS1450 sur cette expression constitutive de ces gènes dans les cellules leucémiques K562. Entre autres, l'expression des gènes Jun et Fos a été stimulée. Les rôles joués par Jun et Fos dans la transduction d'une signalisation UNBS1450-induite restent ainsi à déterminer.

- ✚ Nous suggérons par ailleurs de réaliser des études « Wash out » avec UNBS1450. Comme les cardénolides sont connus pour agir très rapidement, avec des valeurs $T_{1/2}$ très restreintes (5 – 10 min), il serait intéressant de réduire les temps de traitement avec UNBS1450 et de vérifier si les effets décrits restent observables.
- ✚ Comme une application clinique possible pour UNBS1450 serait une sensibilisation de cellules cancéreuses résistantes ou peu sensibles envers des traitements classiques, il est utile d'investiguer de possibles effets de synergie entre UNBS1450 et des agents anticancéreux thérapeutiques établis.
- ✚ Finalement, et en vue d'une progression vers des essais cliniques, il est bien entendu indispensable de confirmer nos résultats obtenus sur des cellules primaires leucémiques obtenues de patients.

L'ensemble de ces études permettrait ainsi d'évaluer et de placer UNBS1450 dans le rang d'agents anticancéreux effectifs dans la thérapie de leucémies.

7. BIBLIOGRAPHIE

Adams, J.M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26, 61-66.

Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Ahmadi, A., Polyak, S., and Draganov, P.V. (2009). Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues. *World J Gastroenterol* 15, 61-66.

Ahn, K.S., Sethi, G., and Aggarwal, B.B. (2008). Reversal of chemoresistance and enhancement of apoptosis by statins through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Biochem Pharmacol* 75, 907-913.

Aizman, O., and Aperia, A. (2003). Na,K-ATPase as a signal transducer. *Ann N Y Acad Sci* 986, 489-496.

Aizman, O., Uhlen, P., Lal, M., Brismar, H., and Aperia, A. (2001). Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13420-13424.

Ali, B.H., and Al Moundhri, M.S. (2006). Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chem Toxicol* 44, 1173-1183.

Angell, H. (2008). A study into the potential role of survivin localization in resistance to drug-induced apoptosis. *Biosci Horizons*, 85.

Anto, R.J., Mukhopadhyay, A., Denning, K., and Aggarwal, B.B. (2002). Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* 23, 143-150.

Aperia, A. (2007). New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 261, 44-52.

Arceci, R.J., Sande, J., Lange, B., Shannon, K., Franklin, J., Hutchinson, R., Vik, T.A., Flowers, D., Aplenc, R., Berger, M.S., *et al.* (2005). Safety and efficacy of gemtuzumab ozogamicin in pediatric patients with advanced CD33+ acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 1183-1188.

Arena, V., Martini, M., Luongo, M., Capelli, A., and Larocca, L.M. (2003). Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 91-96.

Armitage, P. (1985). Multistage models of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 63, 195-201.

Arnott, C.H., Scott, K.A., Moore, R.J., Robinson, S.C., Thompson, R.G., and Balkwill, F.R. (2004). Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 23, 1902-1910.

Aronson, J.K. (1986). *An Account of the Foxglove and its Medical Uses 1785-1985; Incorporating a facsimile of William Withering's "An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses" (1785)*. Oxford Press.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.

Ashkenazi, A., and Herbst, R.S. (2008). To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* 118, 1979-1990.

Ashkenazi, A., Holland, P., and Eckhardt, S.G. (2008). Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 26, 3621-3630.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.

Aydemir-Koksoy, A., Abramowitz, J., and Allen, J.C. (2001). Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 276, 46605-46611.

- Bailly, C. (2009). Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem Pharmacol* 77, 1447-1457.
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361-371.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Barbone, D., Yang, T.M., Morgan, J.R., Gaudino, G., and Broaddus, V.C. (2008). Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem* 283, 13021-13030.
- Barwe, S.P., Anilkumar, G., Moon, S.Y., Zheng, Y., Whitelegge, J.P., Rajasekaran, S.A., and Rajasekaran, A.K. (2005). Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Mol Biol Cell* 16, 1082-1094.
- Baylin, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2 *Suppl 1*, S4-11.
- Beissert, S., Bergholz, M., Waase, I., Lepsien, G., Schauer, A., Pfizenmaier, K., and Kronke, M. (1989). Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5064-5068.
- Benz, C.C., and Yau, C. (2008). Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nat Rev Cancer* 8, 875-879.
- Beran, M., Pisa, P., O'Brien, S., Kurzrock, R., Siciliano, M., Cork, A., Andersson, B.S., Kohli, V., and Kantarjian, H. (1993). Biological properties and growth in SCID mice of a new myelogenous leukemia cell line (KBM-5) derived from chronic myelogenous leukemia cells in the blastic phase. *Cancer Res* 53, 3603-3610.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C., Mathison, J., Ulevitch, R., and Cerami, A. (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552-554.
- Bharti, A.C., and Aggarwal, B.B. (2002). Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 64, 883-888.

- Blaustein, M.P. (1974). The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 70, 33-82.
- Blick, M., Sherwin, S.A., Rosenblum, M., and Gutterman, J. (1987). Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 47, 2986-2989.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Kontgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735-1738.
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-1574.
- Boyd, J.A., and Barrett, J.C. (1990). Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmacol Ther* 46, 469-486.
- Brenner, D., and Mak, T.W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 871-877.
- Buck, I., Morceau, F., Cristofanon, S., Reuter, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int J Oncol* 34, 853-860.
- Buckley, C.D., Pilling, D., Henriquez, N.V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., Simmons, D.L., Akbar, A.N., Lord, J.M., and Salmon, M. (1999). RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 397, 534-539.
- Bykov, V.J., Issaeva, N., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2002). Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 23, 2011-2018.
- Carballoso, M., Sacristan, M., Serra, C., and Bonfill, X. (2003). Drugs for preventing lung cancer in healthy people. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002141.
- Carlo-Stella, C., Lavazza, C., Locatelli, A., Vigano, L., Gianni, A.M., and Gianni, L. (2007). Targeting TRAIL agonistic receptors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13, 2313-2317.

- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Cartron, G., Blasco, H., Piantaud, G., Watier, H., and Le Guellec, C. (2007). Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol* 62, 43-52.
- Cemek, M., Buyukokuroglu, M.E., Hazman, O., Konuk, M., Bulut, S., and Birdane, Y.O. (2010). The Roles of Melatonin and Vitamin E Plus Selenium in Prevention of Oxidative Stress Induced by Naloxone-Precipitated Withdrawal in Heroin-Addicted Rats. *Biol Trace Elem Res*.
- Chavez-Blanco, A., Perez-Plasencia, C., Perez-Cardenas, E., Carrasco-Legleu, C., Rangel-Lopez, E., Segura-Pacheco, B., Taja-Chayeb, L., Trejo-Becerril, C., Gonzalez-Fierro, A., Candelaria, M., *et al.* (2006). Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 6, 2.
- Chen, F., Castranova, V., and Shi, X. (2001). New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* 159, 387-397.
- Chen, J., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, G., Qiu, S., and Wang, S. (2006). Design, synthesis, and characterization of new embelin derivatives as potent inhibitors of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 5805-5808.
- Cheng, J.Q., Lindsley, C.W., Cheng, G.Z., Yang, H., and Nicosia, S.V. (2005). The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 24, 7482-7492.
- Coley, W. (1893a). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas : with a report of ten original cases. *Am J Med Sci*, 487-511.
- Coley, W. (1906). Late results of the treatment of inoperable sarcoma by the mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus. *Am J Med Sci*, 375-430.
- Coley, W.B. (1893b). II. Hawkins on Tubercular Peritonitis. *Ann Surg* 17, 462-464.

- Collins, S.J. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemia cells in suspension. *Nature*, 347-349.
- Condorelli, F., Gnemmi, I., Vallario, A., Genazzani, A.A., and Canonico, P.L. (2008). Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 153, 657-668.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Creagan, E.T., Kovach, J.S., Moertel, C.G., Frytak, S., and Kvols, L.K. (1988). A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer* 62, 2467-2471.
- Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A., and Corti, A. (2000). Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat Biotechnol* 18, 1185-1190.
- D'Amelio, M., Tino, E., and Cecconi, F. (2008). The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm Res* 25, 740-751.
- Daniel, D., Susal, C., Kopp, B., Opelz, G., and Terness, P. (2003). Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. *Int Immunopharmacol* 3, 1791-1801.
- Daniel, P.T., Wieder, T., Sturm, I., and Schulze-Osthoff, K. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15, 1022-1032.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Davies, R.J., Sandle, G.I., and Thompson, S.M. (1991). Inhibition of the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase pump during induction of experimental colon cancer. *Cancer Biochem Biophys* 12, 81-94.
- Demiryurek, A.T., and Demiryurek, S. (2005). Cardiotoxicity of digitalis glycosides: roles of autonomic pathways, autacoids and ion channels. *Auton Autacoid Pharmacol* 25, 35-52.
- Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.

- Dewan, S., Sangraula, H., and Kumar, V.L. (2000). Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. *J Ethnopharmacol* 73, 307-311.
- Diaz, Z., Colombo, M., Mann, K.K., Su, H., Smith, K.N., Bohle, D.S., Schipper, H.M., and Miller, W.H., Jr. (2005). Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines. *Blood* 105, 1237-1245.
- DiJoseph, J.F., Armellino, D.C., Boghaert, E.R., Khandke, K., Dougher, M.M., Sridharan, L., Kunz, A., Hamann, P.R., Gorovits, B., Udata, C., *et al.* (2004). Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood* 103, 1807-1814.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., and Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446, 475-482.
- Dudich, E., Semenkova, L., Dudich, I., Denesyuk, A., Tatulov, E., and Korpela, T. (2006). Alpha-fetoprotein antagonizes X-linked inhibitor of apoptosis protein anticaspase activity and disrupts XIAP-caspase interaction. *FEBS J* 273, 3837-3849.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 223, 181-190.
- Duvoix, A., Delhalle, S., Blasius, R., Schnekenburger, M., Morceau, F., Fougere, M., Henry, E., Galteau, M.M., Dicato, M., and Diederich, M. (2004). Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. *Biochem Pharmacol* 68, 1101-1111.
- Egberts, J.H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., *et al.* (2008). Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68, 1443-1450.
- Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Kalden, J.R., Antoni, C., Smolen, J.S., Leeb, B., Breedveld, F.C., Macfarlane, J.D., Bijl, H., *et al.* (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344, 1105-1110.

- Erdmann, E., and Schoner, W. (1973). Ouabain-receptor interactions in (Na + +K +)-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. *Biochim Biophys Acta* 307, 386-398.
- Estrela, J.M., Ortega, A., and Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43, 143-181.
- Faller, L.D. (2008). Mechanistic studies of sodium pump. *Arch Biochem Biophys* 476, 12-21.
- Feinman, R., Siegel, D.S., and Berenson, J. (2004). Regulation of NF-kB in multiple myeloma: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol* 2, 162-166.
- Feldman, R.I., Wu, J.M., Polokoff, M.A., Kochanny, M.J., Dinter, H., Zhu, D., Biroc, S.L., Alicke, B., Bryant, J., Yuan, S., *et al.* (2005). Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J Biol Chem* 280, 19867-19874.
- Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.
- Folmer, F., Blasius, R., Morceau, F., Tabudravu, J., Dicato, M., Jaspars, M., and Diederich, M. (2006). Inhibition of TNFalpha-induced activation of nuclear factor kappaB by kava (*Piper methysticum*) derivatives. *Biochem Pharmacol* 71, 1206-1218.
- Folmer, F., Harrison, W.T., Tabudravu, J.N., Jaspars, M., Aalbersberg, W., Feussner, K., Wright, A.D., Dicato, M., and Diederich, M. (2008). NF-kappaB-inhibiting naphthopyrones from the Fijian echinoderm *Comanthus parvicirrus*. *J Nat Prod* 71, 106-111.
- Folmer, F., Jaspars, M., Solano, G., Cristofanon, S., Henry, E., Tabudravu, J., Black, K., Green, D.H., Kupper, F.C., Aalbersberg, W., *et al.* (2009). The inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by marine natural products. *Biochem Pharmacol* 78, 592-606.
- Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Bohlen, P. (1987). Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5277-5281.
- Fruehauf, J.P., and Meyskens, F.L., Jr. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 13, 789-794.

Galban, S., Fan, J., Martindale, J.L., Cheadle, C., Hoffman, B., Woods, M.P., Temeles, G., Brieger, J., Decker, J., and Gorospe, M. (2003). von Hippel-Lindau protein-mediated repression of tumor necrosis factor alpha translation revealed through use of cDNA arrays. *Mol Cell Biol* 23, 2316-2328.

Gate, L., Paul, J., Ba, G.N., Tew, K.D., and Tapiero, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 53, 169-180.

Gilmore, T.D. (1997). Introduction: The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Semin Cancer Biol* 8, 61-62.

Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K.A., and White, D.W. (1996). Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 13, 1367-1378.

Goto, A., Ishiguro, T., Yamada, K., Ishii, M., Yoshioka, M., Eguchi, C., Shimora, M., and Sugimoto, T. (1990). Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1093-1101.

Gratia, A. (1931). Le phénomène de Schwartzman dans le sarcome du cobaye. *CR Soc Biol*, 427-428.

Gray, P.W., Barrett, K., Chantry, D., Turner, M., and Feldmann, M. (1990). Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7380-7384.

Greijer, A.E., and van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57, 1009-1014.

Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285-296.

Griffith, T.S., and Broghammer, E.L. (2001). Suppression of tumor growth following intralesional therapy with TRAIL recombinant adenovirus. *Mol Ther* 4, 257-266.

Griffiths, J.D., Stark, R.J., Ding, J.C., and Cooper, I.A. (1985). Vincristine neurotoxicity in Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Med J Aust* 143, 305-306.

- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799.
- Haas, M., Askari, A., and Xie, Z. (2000). Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 275, 27832-27837.
- Haas, M., Wang, H., Tian, J., and Xie, Z. (2002). 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* 277, 18694-18702.
- Haefner, B. (2002). NF-kappa B: arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov Today* 7, 653-663.
- Hamlyn, J.M., Blaustein, M.P., Bova, S., DuCharme, D.W., Harris, D.W., Mandel, F., Mathews, M.R., Ludens, J.H. (1991). Identification and characterisation of ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci*, 6259-6263.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harrison, M.L., Obermueller, E., Maisey, N.R., Hoare, S., Edmonds, K., Li, N.F., Chao, D., Hall, K., Lee, C., Timotheadou, E., *et al.* (2007). Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol* 25, 4542-4549.
- Hartmann, J.T., and Lipp, H.P. (2006). Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* 29, 209-230.
- Heller, R.A., Song, K., Villaret, D., Margolskee, R., Dunne, J., Hayakawa, H., and Ringold, G.M. (1990). Amplified expression of tumor necrosis factor receptor in cells transfected with Epstein-Barr virus shuttle vector cDNA libraries. *J Biol Chem* 265, 5708-5717.

- Henson, E.S., Gibson, E.M., Villanueva, J., Bristow, N.A., Haney, N., and Gibson, S.B. (2003). Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 89, 1177-1192.
- Hergenhahn, M., Soto, U., Weninger, A., Polack, A., Hsu, C.H., Cheng, A.L., and Rosl, F. (2002). The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR-LUC cells. *Mol Carcinog* 33, 137-145.
- Horisberger, J.D. (2004). Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* 19, 377-387.
- Hosomi, Y., Gemma, A., Hosoya, Y., Nara, M., Okano, T., Takenaka, K., Yoshimura, A., Koizumi, K., Shimizu, K., and Kudoh, S. (2003). Somatic mutation of the Caspase-5 gene in human lung cancer. *Int J Mol Med* 12, 443-446.
- Huang, M.T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D., and Conney, A.H. (1991). Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res* 51, 813-819.
- Ihenetu, K., Espinosa, R., de Leon, R., Planas, G., Perez-Pinero, A., and Waldbeser, L. (2008). Digoxin and digoxin-like immunoreactive factors (DLIF) modulate the release of pro-inflammatory cytokines. *Inflamm Res* 57, 519-523.
- Ihenetu, K., Molleman, A., Parsons, M., and Whelan, C. (2003a). Pharmacological characterisation of cannabinoid receptors inhibiting interleukin 2 release from human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 464, 207-215.
- Ihenetu, K., Molleman, A., Parsons, M.E., and Whelan, C.J. (2003b). Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur J Pharmacol* 458, 207-215.
- Inbaraj, J.J., and Chignell, C.F. (2004). Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem Res Toxicol* 17, 55-62.
- Jefremov, V., Zilmer, M., Zilmer, K., Bogdanovic, N., and Karelson, E. (2007). Antioxidative effects of plant polyphenols: from protection of G protein signaling to prevention of age-related pathologies. *Ann N Y Acad Sci* 1095, 449-457.

- Jin, Z., McDonald, E.R., 3rd, Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2004). Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 35829-35839.
- Joazeiro, C.A., Anderson, K.C., and Hunter, T. (2006). Proteasome inhibitor drugs on the rise. *Cancer Res* 66, 7840-7842.
- Johnson, S.M., Wang, X., and Mark Evers, B. (2009). Triptolide Inhibits Proliferation and Migration of Colon Cancer Cells by Inhibition of Cell Cycle Regulators and Cytokine Receptors. *J Surg Res*.
- Juncker, T., Schumacher, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochem Pharmacol* 78, 1-10.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15, 1126-1132.
- Kaplan, J.G. (1978). Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annu Rev Physiol* 40, 19-41.
- Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5, 749-759.
- Kaufmann, S.H., and Steensma, D.P. (2005). On the TRAIL of a new therapy for leukemia. *Leukemia* 19, 2195-2202.
- Keenan, S.M., DeLisle, R.K., Welsh, W.J., Paula, S., and Ball, W.J., Jr. (2005). Elucidation of the Na⁺, K⁺-ATPase digitalis binding site. *J Mol Graph Model* 23, 465-475.
- Keller, M., Pignier, C., Egger, M., and Niggli, E. (2007). F90927: a new member in the class of cardioactive steroids. *Cardiovasc Drug Rev* 25, 210-220.
- Kelloff, G.J., Boone, C.W., Steele, V.E., Fay, J.R., Lubet, R.A., Crowell, J.A., and Sigman, C.C. (1994). Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J Cell Biochem Suppl* 20, 1-24.

- Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Boone, C.W., Malone, W.A., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Kopelovich, L., *et al.* (1999). Progress in cancer chemoprevention. *Ann N Y Acad Sci* 889, 1-13.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khan, N., Adhami, V.M., and Mukhtar, H. (2010). Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 17, R39-52.
- Kim, H.S., Lee, J.W., Soung, Y.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, Y.G., Kim, C.J., Jeong, S.W., *et al.* (2003). Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 125, 708-715.
- Kim, R., Emi, M., Matsuura, K., and Tanabe, K. (2007). Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 14, 1-11.
- Kimura, K., Taguchi, T., Urushizaki, I., Ohno, R., Abe, O., Furue, H., Hattori, T., Ichihashi, H., Inoguchi, K., Majima, H., *et al.* (1987). Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 20, 223-229.
- Kimura, Y. (2003). Prevention of Cancer Chemotherapy Drug-Induced Adverse Reaction, Antitumor and Antimetastatic Activities by Natural Products. *Studies in Natural Products Chemistry* 28, 559-586.
- Kinnula VL, C.J. (2004). Superoxide dismutase in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*, 718-744.
- Kitamura, T., Tojo, A., Kuwaki, T., Chiba, S., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989). Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. *Blood* 73, 375-380.
- Klein, E., Ben-Bassat, H., Neumann, H., Ralph, P., Zeuthen, J., Polliack, A., and Vanky, F. (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18, 421-431.

- Klemm, L., Duy, C., Iacobucci, I., Kuchen, S., von Levetzow, G., Feldhahn, N., Henke, N., Li, Z., Hoffmann, T.K., Kim, Y.M., *et al.* (2009). The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 16, 232-245.
- Koenig, U., Sommergruber, W., and Lippens, S. (2005). Aberrant expression of caspase-14 in epithelial tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 309-313.
- Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., and Luczkiewicz, M. (2010). Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food* 13, 255-269.
- Kolkhof, P., Geerts, A., Schafer, S., and Torzewski, J. (2010). Cardiac glycosides potently inhibit C-reactive protein synthesis in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Kometiani, P., Liu, L., and Askari, A. (2005). Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 67, 929-936.
- Kondo, S., Shinomura, Y., Miyazaki, Y., Kiyohara, T., Tsutsui, S., Kitamura, S., Nagasawa, Y., Nakahara, M., Kanayama, S., and Matsuzawa, Y. (2000). Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 60, 4328-4330.
- Kreitman, R.J., Squires, D.R., Stetler-Stevenson, M., Noel, P., FitzGerald, D.J., Wilson, W.H., and Pastan, I. (2005). Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 23, 6719-6729.
- Kreitman, R.J., Stetler-Stevenson, M., Margulies, I., Noel, P., Fitzgerald, D.J., Wilson, W.H., and Pastan, I. (2009). Phase II trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with hairy cell leukemia. *J Clin Oncol* 27, 2983-2990.
- Kumar, S., Dewan, S., Sangraula, H., and Kumar, V.L. (2001). Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *J Ethnopharmacol* 76, 115-118.
- Kumar, V.L., and Shivkar, Y.M. (2004). In vivo and in vitro effect of latex of *Calotropis procera* on gastrointestinal smooth muscles. *J Ethnopharmacol* 93, 377-379.
- Le Bras, M., Clement, M.V., Pervaiz, S., and Brenner, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* 20, 205-219.

- Lefranc, F., Mijatovic, T., Kondo, Y., Sauvage, S., Roland, I., Debeir, O., Krstic, D., Vasic, V., Gailly, P., Kondo, S., *et al.* (2008). Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery* 62, 211-221; discussion 221-212.
- Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., and Nuseir, N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630-632.
- Lemaire, M., Chabot, G.G., Raynal, N.J., Momparler, L.F., Hurtubise, A., Bernstein, M.L., and Momparler, R.L. (2008). Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer. *BMC Cancer* 8, 128.
- Liao, Y.F., Hung, H.C., Hour, T.C., Hsu, P.C., Kao, M.C., Tsay, G.J., and Liu, G.Y. (2008). Curcumin induces apoptosis through an ornithine decarboxylase-dependent pathway in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Life Sci* 82, 367-375.
- Lienard, D., Ewalenko, P., Delmotte, J.J., Renard, N., and Lejeune, F.J. (1992). High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 10, 52-60.
- Lin, H., Juang, J.L., and Wang, P.S. (2004). Involvement of Cdk5/p25 in digoxin-triggered prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem* 279, 29302-29307.
- Link, A., Balaguer, F., and Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol*.
- Liu, L., Abramowitz, J., Askari, A., and Allen, J.C. (2004). Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2173-2182.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S2-19.

- LoPiccolo, J., Blumenthal, G.M., Bernstein, W.B., and Dennis, P.A. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 11, 32-50.
- Lubbert, M., and Minden, M. (2005). Decitabine in acute myeloid leukemia. *Semin Hematol* 42, S38-42.
- Ludke, A.R., Al-Shudiefat, A.A., Dhingra, S., Jassal, D.S., and Singal, P.K. (2009). A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 756-763.
- Luo, J., Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 257-262.
- Madhusudan, S., Foster, M., Muthuramalingam, S.R., Braybrooke, J.P., Wilner, S., Kaur, K., Han, C., Hoare, S., Balkwill, F., Talbot, D.C., *et al.* (2004). A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6528-6534.
- Malik, S.T., Griffin, D.B., Fiers, W., and Balkwill, F.R. (1989). Paradoxical effects of tumour necrosis factor in experimental ovarian cancer. *Int J Cancer* 44, 918-925.
- Malik, S.T., Naylor, M.S., East, N., Oliff, A., and Balkwill, F.R. (1990). Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur J Cancer* 26, 1031-1034.
- Mandl, J., Szarka, A., and Banhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 157, 1097-1110.
- Mantovani, A. (2009). Cancer : Inflaming metastasis. *Nature*, 36-37.
- Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M.J., Semon, D., Muller, R., *et al.* (1985). Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 152, 515-522.
- McConkey, D.J., Lin, Y., Nutt, L.K., Ozel, H.Z., and Newman, R.A. (2000). Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 60, 3807-3812.

McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K.M., Green, D.R., and Cotter, T.G. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179-1187.

McKallip, R.J., Lombard, C., Sun, J., and Ramakrishnan, R. (2010). Plumbagin-induced apoptosis in lymphocytes is mediated through increased reactive oxygen species production, upregulation of Fas, and activation of the caspase cascade. *Toxicol Appl Pharmacol* 247, 41-52.

Melero, C.P., Metarde, M., San Feliciano, A. (2000). A short review on cardiotoxic steroids and their aminoguanidine analogues. *Molecules* 51-81.

Mena-Rejon, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., and Moo-Puc, R. (2009). In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 121, 462-465.

Mijatovic, T., De Neve, N., Gailly, P., Mathieu, V., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Lapeira, J., Decaestecker, C., Facchini, V., and Kiss, R. (2008). Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7, 1285-1296.

Mijatovic, T., Lefranc, F., Van Quaquebeke, E., Van Vynckt, F., Darro, F., and Kiss, R. (2007a). UNBS1450 : A New Hemi-Synthetic Cardenolide With Promising Anti-Cancer Activity. *Drug Development Research* 68, 164-173.

Mijatovic, T., Mathieu, V., Gaussin, J.F., De Neve, N., Ribaucour, F., Van Quaquebeke, E., Dumont, P., Darro, F., and Kiss, R. (2006a). Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia* 8, 402-412.

Mijatovic, T., Op De Beeck, A., Van Quaquebeke, E., Dewelle, J., Darro, F., de Launoit, Y., and Kiss, R. (2006b). The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5, 391-399.

Mijatovic, T., Roland, I., Van Quaquebeke, E., Nilsson, B., Mathieu, A., Van Vynckt, F., Darro, F., Blanco, G., Facchini, V., and Kiss, R. (2007b). The alpha1 subunit of the sodium

pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol* 212, 170-179.

Mijatovic, T.V.Q., E; Delest, B; Debeir, O; Darro, F; Kiss R (2007). Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 32-57.

Milano, G., and Chamorey, A.L. (2002). Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol Int* 19, 177-189.

Minowada, J., Onuma, T., and Moore, G.E. (1972). Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49, 891-895.

Mita, M. (2006). Apoptosis : mechanisms and implications for cancer therapeutics. *Targ Oncol*, 197-214.

Momoi, T. (2004). Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 28, 101-105.

Mone, A.P., Huang, P., Pelicano, H., Cheney, C.M., Green, J.M., Tso, J.Y., Johnson, A.J., Jefferson, S., Lin, T.S., and Byrd, J.C. (2004). Hu1D10 induces apoptosis concurrent with activation of the AKT survival pathway in human chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 103, 1846-1854.

Moore, R.J., Owens, D.M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., *et al.* (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 5, 828-831.

Muschen, M., and Beckmann, M.W. (2000). CD95 ligand expression as a criterion of malignant transformation in breast cancer. *J Pathol* 191, 468-470.

Muschen, M., Warskulat, U., and Beckmann, M.W. (2000). Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med* 78, 312-325.

Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.

- Naylor, M.S., Malik, S.T., Stamp, G.W., Jobling, T., and Balkwill, F.R. (1990). In situ detection of tumour necrosis factor in human ovarian cancer specimens. *Eur J Cancer* 26, 1027-1030.
- Neri, A., Marmioli, S., Tassone, P., Lombardi, L., Nobili, L., Verdelli, D., Civallero, M., Cosenza, M., Bertacchini, J., Federico, M., *et al.* (2008). The oral protein-kinase C beta inhibitor enzastaurin (LY317615) suppresses signalling through the AKT pathway, inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Leuk Lymphoma* 49, 1374-1383.
- Newman, D.J.a.C., G.M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod*, 461-477.
- Nicotera, P., Dypbukt, J.M., Rossi, A.D., Manzo, L., and Orrenius, S. (1992). Thiol modification and cell signalling in chemical toxicity. *Toxicol Lett* 64-65 *Spec No*, 563-567.
- O'Malley, W. (1962). Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with serratia marcescens polysaccharide, and induced tolerance. *J Natl Cancer Inst*, 1169-1175.
- Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D., and Mannel, D.N. (1993). Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 177, 1391-1398.
- Ozvaran, M.K., Cao, X.X., Miller, S.D., Monia, B.A., Hong, W.K., and Smythe, W.R. (2004). Antisense oligonucleotides directed at the bcl-xl gene product augment chemotherapy response in mesothelioma. *Mol Cancer Ther* 3, 545-550.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Pani, G., Galeotti, T., and Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* 29, 351-378.
- Parasassi, T., Brunelli, R., Costa, G., De Spirito, M., Krasnowska, E., Lundeberg, T., Pittaluga, E., and Ursini, F. (2010). Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *ScientificWorldJournal* 10, 1192-1202.

- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184, 1397-1411.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., and Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T.J., and Los, M. (2004). Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol* 26, 82-97.
- Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi-Sivan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinitz, M., Perelberg, A., Soffer, D., and Kotler, M. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J Virol* 78, 9544-9551.
- Podgorski, I., and Sloane, B.F. (2006). Loss of caspase-8 in tumor cells: mechanism to overcome integrin-mediated death? *Mol Interv* 6, 132-136.
- Pohl, C., Hombach, A., and Kruis, W. (2000). Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* 47, 57-70.
- Popivanova, B.K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C., and Mukaida, N. (2008). Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118, 560-570.
- Prassas, I., and Diamandis, E.P. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov* 7, 926-935.
- Price, E.M., and Lingrel, J.B. (1988). Structure-function relationships in the Na,K-ATPase alpha subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. *Biochemistry* 27, 8400-8408.
- Prince, H.M., Bishton, M., and Harrison, S. (2008). The potential of histone deacetylase inhibitors for the treatment of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 49, 385-387.

- Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53, 4290-4302.
- Rahimtoola, S.H. (2004). Digitalis therapy for patients in clinical heart failure. *Circulation* 109, 2942-2946.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., and Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967-969.
- Rao, V.P., Poutahidis, T., Ge, Z., Nambiar, P.R., Horwitz, B.H., Fox, J.G., and Erdman, S.E. (2006). Proinflammatory CD4+ CD45RB(hi) lymphocytes promote mammary and intestinal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* 66, 57-61.
- Ray, L.E. (2009). Podophyllum peltatum and observations on the Creek and Cherokee Indians: William Bartram's preservation of Native American pharmacology. *Yale J Biol Med* 82, 25-36.
- Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.
- Reed, J.C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17, 2941-2953.
- Reuter, S., Charlet, J., Juncker, T., Teiten, M.H., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 436-447.
- Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., and Diederich, M. (2008). Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76, 1340-1351.
- Robak, T. (2008). Alemtuzumab for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 1033-1051.
- Rogers, P. (2002). Overexpression of BCL-XL in a human ovarian carcinoma line : paradoxical effects on chemosensitivity in vitro versus in vivo. *Int J Cancer*, 858-863.

- Rowinsky, E.K., Eisenhauer, E.A., Chaudhry, V., Arbuck, S.G., and Donehower, R.C. (1993). Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol* 20, 1-15.
- Roy, M., Chakraborty, S., Siddiqi, M., and Bhattacharya, R.K. (2002). Induction of Apoptosis in Tumor Cells by Natural Phenolic Compounds. *Asian Pac J Cancer Prev* 3, 61-67.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-337.
- Sanchez, Y., Simon, G.P., Calvino, E., de Blas, E., and Aller, P. (2010). Curcumin Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Potentiates Apoptosis Induction by the Antitumour Drugs Arsenic Trioxide and Lonidamine in Human Myeloid Leukaemia Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Saunders, R., and Scheiner-Bobis, G. (2004). Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur J Biochem* 271, 1054-1062.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Scandalios, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38, 995-1014.
- Schafer, Z.T., Parrish, A.B., Wright, K.M., Margolis, S.S., Marks, J.R., Deshmukh, M., and Kornbluth, S. (2006). Enhanced sensitivity to cytochrome c-induced apoptosis mediated by PHAPI in breast cancer cells. *Cancer Res* 66, 2210-2218.
- Schatzmann, H.J., and Rass, B. (1965). [Inhibition of the active Na-K-transport and Na-K-activated membrane ATP-ase of erythrocyte stroma by ouabain]. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 65, C47-49.
- Schimmer, A.D., and Dalili, S. (2005). Targeting the IAP family of caspase inhibitors as an emerging therapeutic strategy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 215-219.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). 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* 19, 621-626.

Schonfeld, W.e.a. (1985). The lead structure in cardiaque glycosides is 5 β , 14 β -androstan-3 β 14-diol. *Naungun Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 414-426.

Schumacher, M., Cerella, C., Eifes, S., Chateauvieux, S., Morceau, F., Jaspars, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). Heteronemin, a spongean sesterterpene, inhibits TNF alpha-induced NF-kappa B activation through proteasome inhibition and induces apoptotic cell death. *Biochem Pharmacol* 79, 610-622.

Scott, K.A., Moore, R.J., Arnott, C.H., East, N., Thompson, R.G., Scallon, B.J., Shealy, D.J., and Balkwill, F.R. (2003). An anti-tumor necrosis factor-alpha antibody inhibits the development of experimental skin tumors. *Mol Cancer Ther* 2, 445-451.

Segall, L., Javaid, Z.Z., Carl, S.L., Lane, L.K., and Blostein, R. (2003). Structural basis for alpha1 versus alpha2 isoform-distinct behavior of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 278, 9027-9034.

Selby, P., Hobbs, S., Viner, C., Jackson, E., Jones, A., Newell, D., Calvert, A.H., McElwain, T., Fearon, K., Humphreys, J., *et al.* (1987). Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *Br J Cancer* 56, 803-808.

Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 13, 5094-5107.

Shangary, S., Qin, D., McEachern, D., Liu, M., Miller, R.S., Qiu, S., Nikolovska-Coleska, Z., Ding, K., Wang, G., Chen, J., *et al.* (2008). Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3933-3938.

Sharma, P., and Sharma, J.D. (1999). Evaluation of in vitro schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera*--an ethnobotanical approach. *J Ethnopharmacol* 68, 83-95.

Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 21, 99-102.

- Shear, M. (1944). Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice treated with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. *J Natl Cancer Inst*, 461-476.
- Shen, S.S., Hamamoto, S.T., Bern, H.A., and Steinhardt, R.A. (1978). Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. *Cancer Res* 38, 1356-1361.
- Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S., *et al.* (2001). Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 61, 4942-4946.
- Singh, R.K., Tripathi, A.K., Tripathi, P., Singh, S., Singh, R., and Ahmad, R. (2009). Studies on biomarkers for oxidative stress in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2, 285-288.
- Soengas, M.S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, H.S., Park, W.S., Kim, S.Y., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, Y.G., Kim, C.J., Park, Y.G., *et al.* (2003). Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* 22, 8048-8052.
- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Jang, J., Park, Y.G., Park, W.S., Nam, S.W., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2005). CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* 65, 815-821.
- Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Park, W.S., Nam, S.W., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2006). Mutational analysis of proapoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS* 114, 292-297.
- Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U., and Green, D.R. (2005). Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 310, 66-67.

- Sporn, M.B., Dunlop, N.M., Newton, D.L., and Smith, J.M. (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 35, 1332-1338.
- Spriggs, D., Imamura, K., Rodriguez, C., Horiguchi, J., and Kufe, D.W. (1987). Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6563-6566.
- Srinivas, P., Gopinath, G., Banerji, A., Dinakar, A., and Srinivas, G. (2004). Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Mol Carcinog* 40, 201-211.
- Stenkvist, B. (2001). Cardenolides and cancer. *Anticancer Drugs* 12, 635-638.
- Strout, M.P., and Schatz, D.G. (2009). Imatinib resistance and progression of CML to blast crisis: somatic hypermutation AIDing the way. *Cancer Cell* 16, 174-176.
- Tamm, I. (2008). AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 638-646.
- Taniai, M., Grambihler, A., Higuchi, H., Werneburg, N., Bronk, S.F., Farrugia, D.J., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2004). Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 64, 3517-3524.
- Taurin, S., Dulin, N.O., Pchejetski, D., Grygorczyk, R., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2002). c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism. *J Physiol* 543, 835-847.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6, 529-535.
- Tepper, C.G., and Seldin, M.F. (1999). Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 94, 1727-1737.

- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584, 2981-2989.
- Timmer, T., de Vries, E.G., and de Jong, S. (2002). Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 196, 125-134.
- Tohyama, Y., Takano, T., and Yamamura, H. (2004). B cell responses to oxidative stress. *Curr Pharm Des* 10, 835-839.
- Tolcher, A.W., Mita, M., Meropol, N.J., von Mehren, M., Patnaik, A., Padavic, K., Hill, M., Mays, T., McCoy, T., Fox, N.L., *et al.* (2007). Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J Clin Oncol* 25, 1390-1395.
- Tourkina, E., Gooz, P., Oates, J.C., Ludwicka-Bradley, A., Silver, R.M., and Hoffman, S. (2004). Curcumin-induced apoptosis in scleroderma lung fibroblasts: role of protein kinase cepsilon. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 28-35.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., and Tak, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117, 244-279.
- Trevisi, L., Visentin, B., Cusinato, F., Pighin, I., and Luciani, S. (2004). Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 716-721.
- Triantafyllidis, J.K., Nasioulas, G., and Kosmidis, P.A. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res* 29, 2727-2737.
- Tripathi, P., and Hildeman, D. (2004). Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis* 9, 515-523.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Van Quaquebeke, E., Simon, G., Andre, A., Dewelle, J., El Yazidi, M., Bruyneel, F., Tuti, J., Nacoulma, O., Guissou, P., Decaestecker, C., *et al.* (2005). 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* 48, 849-856.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., and Vanden Berghe, T. (2010). The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 3, re4.
- Vangestel, C., Van de Wiele, C., Mees, G., and Peeters, M. (2009). Forcing cancer cells to commit suicide. *Cancer Biother Radiopharm* 24, 395-407.
- Vassilev, L.T. (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 13, 23-31.
- Virchow, R. (1863). Die krankhaften Geschwulste.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wang, J., Velotta, J.B., McDonough, A.A., and Farley, R.A. (2001). All human Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1336-1343.
- Wang, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., Hyrc, K., Yang, A., Goldberg, M.P., Choi, D.W., and Yu, S.P. (2003). Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Sci* 116, 2099-2110.
- Weidemann, H. (2005). Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development -- a hypothesis. *Front Biosci* 10, 2165-2176.
- Welsh, S.J., Koh, M.Y., and Powis, G. (2006). The hypoxic inducible stress response as a target for cancer drug discovery. *Semin Oncol* 33, 486-497.

Winyard, P.G., Moody, C.J., and Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30, 453-461.

Wu, Y., and Zhou, B.P. (2010). TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 102, 639-644.

Xie, X., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, J., Matusik, R.J., Slawin, K.M., and Spencer, D.M. (2001). Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 61, 6795-6804.

Xie, Z., and Askari, A. (2002). Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 269, 2434-2439.

Xie, Z., and Cai, T. (2003). Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 3, 157-168.

Yan, L., Anderson, G.M., DeWitte, M., and Nakada, M.T. (2006). Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 42, 793-802.

Yang, J.K. (2008). FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 49, 19-27.

Younes, A., Garg, A., and Aggarwal, B.B. (2003). Nuclear transcription factor-kappaB in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 44, 929-935.

Yuan, Z., Cai, T., Tian, J., Ivanov, A.V., Giovannucci, D.R., and Xie, Z. (2005). Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol Biol Cell* 16, 4034-4045.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., and Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60, 6-20.

Zhang, C., Li, B., Zhang, X., Hazarika, P., Aggarwal, B.B., and Duvic, M. (2010). Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients' PBMCs: potential role for STAT-3 and NF-kappaB signaling. *J Invest Dermatol* 130, 2110-2119.

Zhang, H.Z., Kasibhatla, S., Wang, Y., Herich, J., Guastella, J., Tseng, B., Drewe, J., and Cai, S.X. (2004). Discovery, characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay. *Bioorg Med Chem* 12, 309-317.

- Zhang, L., and Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12, 228-237.
- Zhang, S., Malmersjo, S., Li, J., Ando, H., Aizman, O., Uhlen, P., Mikoshiba, K., and Aperia, A. (2006a). Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. *J Biol Chem* 281, 21954-21962.
- Zhang, W., Zhang, H., and Xing, L. (2006b). Antisense oligonucleotide of hypoxia-inducible factor-1alpha suppresses growth and tumorigenicity of lung cancer cells A549. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26, 448-450.
- Zhou, F.L., Zhang, W.G., Wei, Y.C., Meng, S., Bai, G.G., Wang, B.Y., Yang, H.Y., Tian, W., Meng, X., Zhang, H., *et al.* (2010). Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 285, 15010-15015.
- Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., and Pittman, R.N. (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151, 483-494.
- Ziegler, D.S., and Kung, A.L. (2008). Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol* 20, 97-103.



UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells

Tom Juncker¹, Claudia Cerella¹, Marie-Hélène Teiten¹, Franck Morceau, Marc Schumacher, Jenny Ghelfi, François Gaascht, Michael Schnekenburger, Estelle Henry, Mario Dicato, Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2010

Accepted 27 August 2010

Keywords:

UNBS1450

NF- κ B

Apoptosis

Cardenolide

Cancer

ABSTRACT

Cardiac steroids are used to treat various diseases including congestive heart failure and cancer. The aim of this study was to investigate the anti-leukemic activity of UNBS1450, a hemi-synthetic cardenolide belonging to the cardiac steroid glycoside family. Here, we report that, at low nanomolar concentrations, UNBS1450 induces apoptotic cell death. Subsequently, we have investigated the molecular mechanisms leading to apoptosis activation. Our results show that UNBS1450 inhibits NF- κ B transactivation and triggers apoptosis by cleavage of pro-caspases 8, 9 and 3/7, by decreasing expression of anti-apoptotic Mcl-1 and by recruitment of pro-apoptotic Bak and Bax protein eventually resulting in cell death.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Most anti-cancer drugs are isolated from natural sources or are at least bearing close structural relationships to natural compounds. Both, marine and terrestrial organisms are considered today as important sources for novel lead compounds.

Non-cardiotonic steroid glycosides obtained from the tropical plant *Calotropis procera* possess anti-cancer potential via binding to the $\alpha 3\beta 1$ Na⁺/K⁺-ATPase isozymes. The cardenolide UNBS1450 (Fig. 1A) has been analyzed *in vitro* as well as *in vivo* on non small cell lung cancer (NSCLC) and glioblastoma xenograft mice models [1,2]. UNBS1450 is a chemically modified form of 2-oxovoruscharin, a derivative of voruscharin; despite its already promising anti-cancer potential, the high toxicity of 2-oxovoruscharin required chemical modifications to improve tolerance *in vivo* [3]. The improved hemi-synthetic compound UNBS1450 revealed itself to be significantly less toxic when compared to its mother compound and in the same time was proven to be even more potent in cancer therapy: with an average MTD of up to 120 mg/kg, chronic administration increased mouse survival and reduced glioblastoma cell migration. Mijatovic et al. showed that UNBS1450-mediated antitumor activity is due to activation of non-apoptotic cell death mechanisms in Na⁺/K⁺-ATPase $\alpha 1$ over-

expressing glioma cells [4]. UNBS1450 has the capacity to disorganize nucleolar structure and functions via impairment of cyclin-dependent kinase and c-Myc expressions accompanied by disorganization of cancer cell-specific perinucleolar bodies. This non-apoptotic cancer cell death was a new cardenolide-induced mechanism of antitumor action [5] and this drug was described to be able to circumvent glioblastoma resistance to apoptosis [6].

Nuclear factor (NF)- κ B has been shown previously to be implicated in (1) cell death (apoptosis), (2) cell adhesion, (3) cell proliferation, (4) innate- and adaptive-immune response and (5) cancer development. This dimeric protein complex can both induce and repress gene expression, by binding to DNA sequences found in promoter and enhancer regions. NF- κ B hetero- and homodimers can be constituted of five different family members: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) and p52/p100 (NF- κ B2) [7]. In the absence of an extrinsic cell signal, NF- κ B dimers remain sequestered in the cytoplasm, inactivated by the NF- κ B inhibitor I κ B. Upon cell stimulation by cytokines, proliferating agents, carcinogens or physical stress, I κ B phosphorylation by the I κ kinase (IKK) frees the NF- κ B dimer, then rapidly translocating into the nucleus and transactivating more than 550 genes.

Deregulation of NF- κ B leads to various pathologies including chronic inflammations and cancer [8]. NF- κ B has become a major target in drug engineering. To date, a number of natural NF- κ B inhibitors are being investigated, many of them being plant-derived isoprenoids and polyphenols.

As NF- κ B is responsible for increased cell resistance towards possible cytotoxic treatments currently applied in clinics, apoptosis

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.

E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

¹ These authors contributed equally to this work.

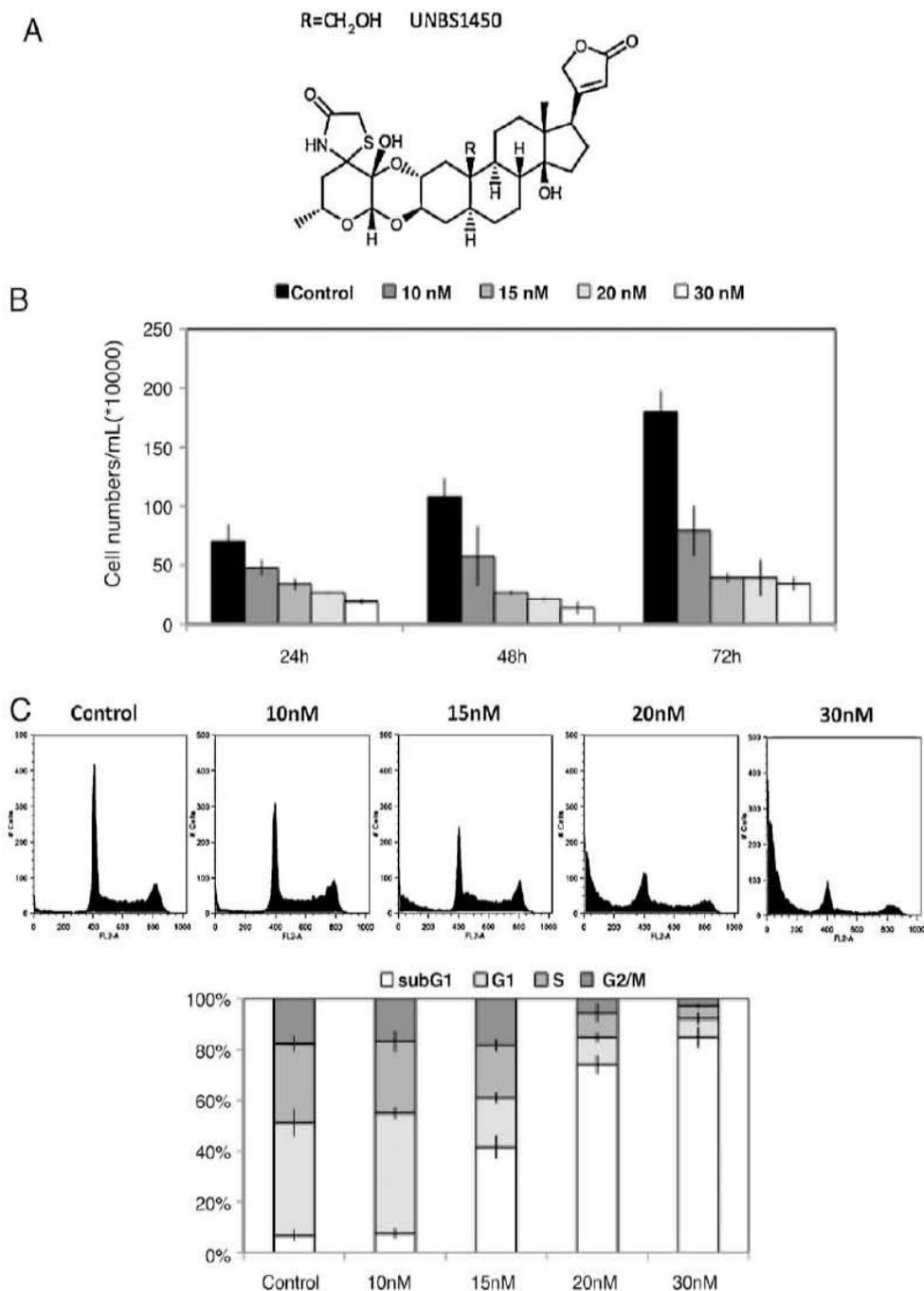


Fig. 1. UNBS1450 induces apoptotic cell death in U937 cells. (A) Molecular structure. (B) Analysis of UNBS1450-induced cell death was performed by Trypan Blue staining after 24, 48 and 72 h of treatment with UNBS1450 at 10, 15, 20 and 30 nM. (C) Cell cycle analysis after 24 h of incubation time with indicated concentrations. (D) Hoechst staining (upper panel) and quantification (lower panel) of the fraction of cells presenting fragmented nuclei. (E) Flow cytometry analysis after 24 h of incubation time at indicated concentrations. (F) Analysis of PBMCs viability after UNBS1450 treatment. PBMCs were seeded at 2×10^6 , then after 24 h treated for 24 h with various concentrations (0–100 nM) of UNBS1450. Cells were then stained either by Trypan Blue (upper panel) or by Hoechst (panel below) to analyze either cell integrity or apoptosis induction. The data shown here were representative for three independent experiments.

induction through NF- κ B inhibition and/or extrinsic and intrinsic pathway activation is considered as a main aim in cancer research. Apoptosis induction through NF- κ B inhibition and subsequent extrinsic and intrinsic cell death pathway activation is considered a main target in cancer research. During apoptosis induction, many different activation cascades eventually lead to caspase-3 or -7 cleavage and subsequent cell death [9].

In the absence of concluding investigations of anti-cancer effects of UNBS1450 in human leukemia cells, we hereby analyzed the effect of UNBS1450 on activation of cell death mechanisms and NF- κ B pathway inhibition in human leukemia cells and demonstrate for the first time that nanomolar concentrations of UNBS1450 induce canonical apoptotic cell death mechanisms.

2. Material and methods

2.1. Compounds and purification

TNF α was purchased from Sigma–Aldrich (Bornem, Belgium) and dissolved to a concentration of 10 mg/mL in PBS 1 \times supplemented with 0.5% (w/v) BSA according to the manufacturer's instructions.

UNBS1450 was a gift of Unibioscreen (Pr Robert Kiss, Brussels, Belgium): the compound, with a molecular weight of 605.8 g and received as dry powder, was solubilized in 52.95% DMSO (Sigma–Aldrich, Bornem, Belgium) and then further diluted to 5% DMSO/95% H₂O to get working aliquots with a concentration of 5 mM.

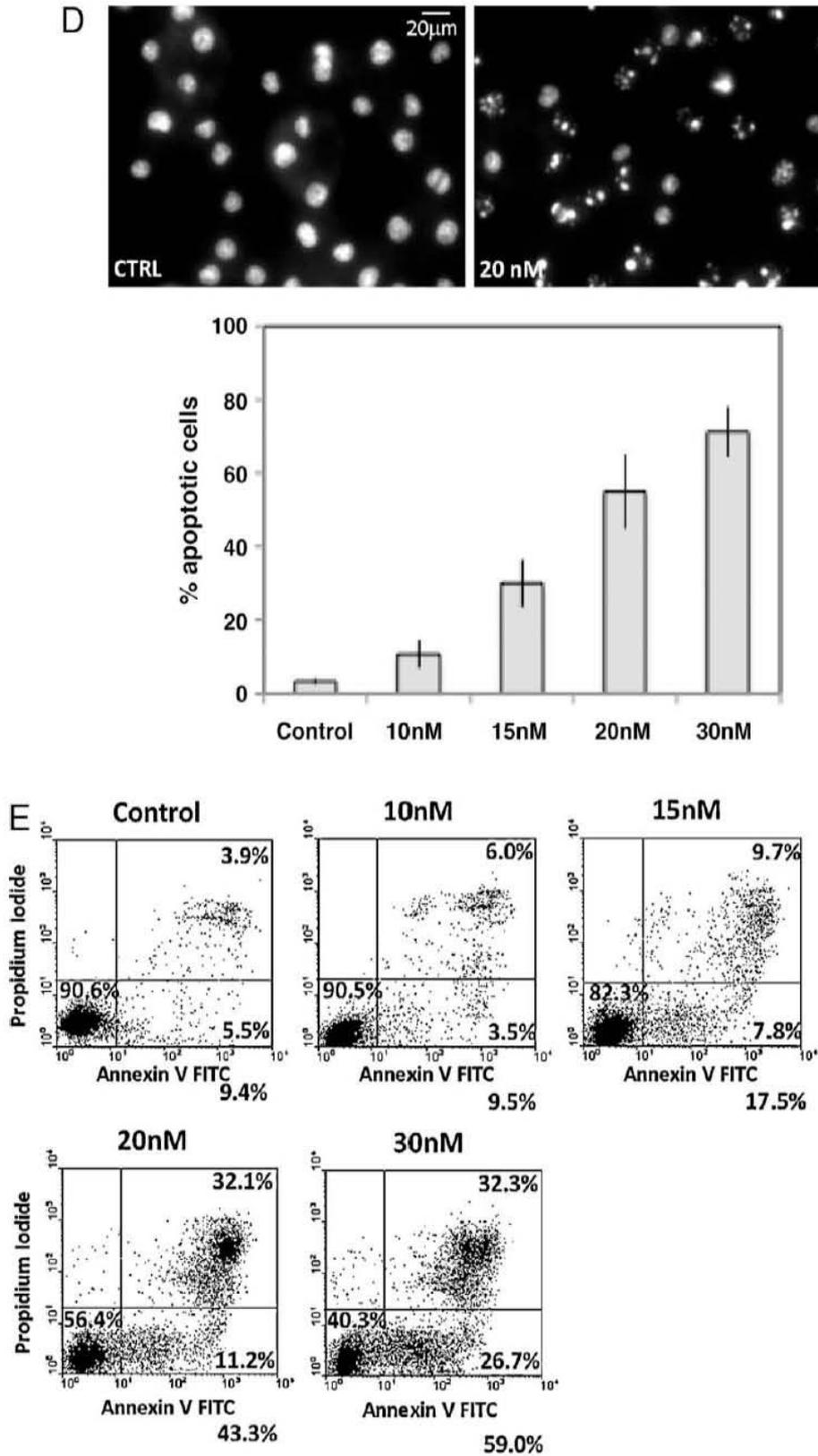


Fig. 1. (Continued).

Both were frozen at -20°C . Control cells were treated with equivalent amounts of DMSO.

2.2. Cell culture

K562 (human chronic myelogenous leukemia), U937 (histiocytic lymphoma), Jurkat (T-cell leukemia), Raji (Burkitt's Lymphoma), Hel (erythroleukemia), Molt (human acute lymphoblastic leukemia), Meg01 (human megacaryoblastic cells), HL60 (human promyelo-

cytic leukemia), TF1 (erythroleukemia) and KBM5 (chronic myelogenous leukemia) cells (DSMZ) were cultured in RPMI medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Lonza, Verviers, Belgium) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (BioWhittaker, Verviers, Belgium) at 37°C and 5% of CO_2 . At T_0 cells had been pre-treated with UNBS1450 at various concentrations. At $T_0 + 2$ h cells were activated by $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/mL).

Healthy blood samples were kindly donated as buffy coats by the Red Cross (Luxembourg, Luxembourg). By applying diluted (1/3)

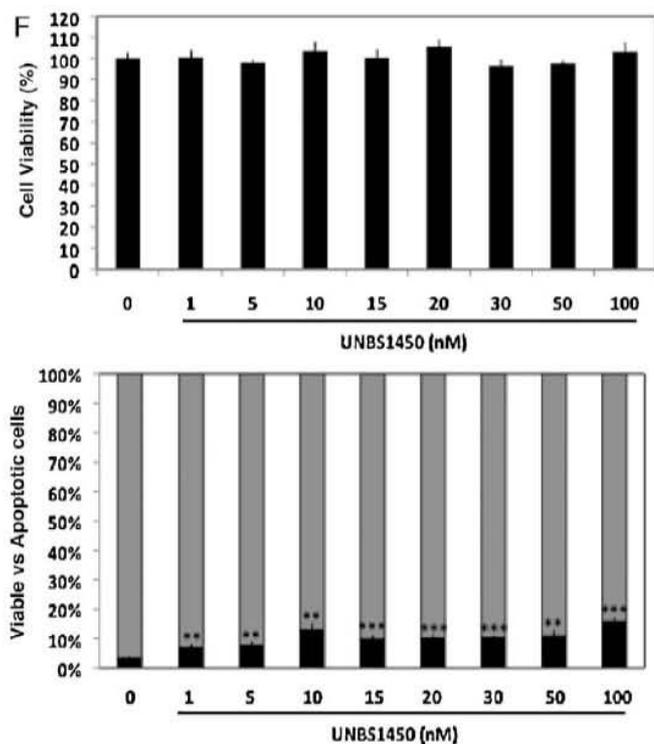


Fig. 1. (Continued).

blood onto a Ficoll layer followed by centrifugation (400 × g, 20 min), mononuclear cells were isolated and collected. The isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were kept in culture at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h before they were subjected to treatments.

2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Both, K562 and Jurkat cells, cultured in growth medium (RPMI, 10% FCS) at a concentration of 3 × 10⁵ cells/mL, were pre-treated or not for 2 h with UNBS1450, respectively at 40 nM and 20 nM before being activated by TNFα (20 ng/mL) for 6 h. Cells were then harvested and washed twice in PBS 1×; supernatants were discarded and cell pellets were stored overnight at –80 °C. Nuclear protein extractions were performed as described previously before being stored at –80 °C [10]. The oligonucleotide NF-κBc (consensus NF-κB site) (Eurogentec, Liège, Belgium) (5'-AGTTGAGGG-GACTTCCAGGC-3') and its complementary sequence were used as probe. After being hybridized, the probes were radiolabelled using [*γ*-³²P]ATP (MP Biomedicals, Illkirch, France) and the EMSA assay was realized according to conditions established before [10].

2.4. Transient transfection and luciferase reporter gene assay

K562 and Jurkat cells were transiently transfected as described previously [10]. For each electroporation we used 5 μg of a luciferase reporter gene construct containing five repeats of a consensus NF-κB site (Stratagene, Genomics Agilent, Diegem, Belgium) and 5 μg of a *Renilla* luciferase plasmid (Promega, Leiden, Netherlands). Cells were resuspended in normal culture medium (RPMI, 10% FCS) after electroporation and cultured at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. After the required incubation time, cells were harvested and resuspended in fresh growth medium (RPMI, 10% FCS) to a final concentration of 3 × 10⁵ cells/mL and pre-treated for 2 h with UNBS1450 40 nM for K562 and 20 nM for Jurkat. Activation with 20 ng/mL of TNFα for 6 h followed the pre-treatment. After the 8 h of total challenge, 75 μL of Dual-Glo™ luciferase reagent (Promega, Leiden, Netherlands) were added to 75 μL of the cellular suspension for 10 min incubation at 22 °C before luciferase activity measurement. Further on, 75 μL of

Dual-Glo™ Stop&Glo® Reagent (Promega, Leiden, Netherlands) were added for 10 min at 22 °C to the cell suspension to assay *Renilla* activity. An Orion microplate luminometer (Berthold) was used to measure luciferase and *Renilla* activity. The results are expressed as a ratio of arbitrary units of firefly luciferase activity normalized to *Renilla* luciferase activity.

2.5. Cell viability assessment

Percentages of cell survival were evaluated using Promega's CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Leiden, Netherlands) kit, according to the manufacturer's instructions. Alternatively, Trypan Blue staining was used to determine cell integrity. Data were normalized to the control and reported as percentage of viable cells.

2.6. Analysis of apoptosis

2.6.1. Analysis of nuclear fragmentation

Percentages of apoptotic cells, quantified as the fraction of apoptotic nuclei, were assessed by fluorescence microscopy (Leica-DM IRB microscope, Leucit, Luxembourg) upon staining with the DNA-specific dye Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) as previously described [11]. The fraction of cells with nuclear apoptotic morphology was counted (at least 300 cells in at least three independent fields). The images were analyzed using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>).

2.6.2. Flow cytometric analysis (Annexin V-FITC/propidium iodide staining) of phosphatidylserine exposure

At the indicated times and doses of treatment, K562, U937 and Jurkat cells were assayed for phosphatidylserine exposure, by using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Stained samples were analyzed by FACS (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Data were recorded using the CellQuest software (<http://www.bdbiosciences.com/features/products>) for further analysis.

2.7. Extraction of cellular proteins

After indicated incubation times with UNBS1450 and TNFα, K562, U937 and Jurkat cells were lysed; nuclear and cytoplasmic extracts were prepared according to Duvoix et al. [10].

2.8. RT-PCR analysis

Isolation of total RNA was performed using a NucleoSpin® (Macherey–Nagel, Hoerdt, France) kit. One microgram of total RNA were submitted to reverse transcription (RT) using Oligo(dT) primers (SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen, Fisher Scientific, Tournai, Belgium). The resulting RT products were used as templates for PCR amplification using SYBR® Green (Power SYBR Green PCR Master mix 1×, Applied Biosystems, Halle, Belgium) and Na⁺/K⁺-ATPase α-subunit mRNA specific primers (F: 5'-CTA-CCT-GGC-TTG-CTC-TGT-CC-3'; R: 5'-GCT-GAC-TCA-GAG-GCA-TCT-CC-3') (Eurogentec, Liège, Belgium). The amount of cDNA synthesized was evaluated by amplification of the GAPDH gene (F: 5'-ACA-GTC-AGC-CGC-ATC-TTC-TT-3'; R: 5'-ACG-ACC-AAA-TCC-GTT-GAC-TC-3') (Eurogentec, Liège, Belgium) as a standard. After amplification, the PCR products were separated on a 2% agarose gel.

2.9. Immunofluorescence staining

U937 cells were fixed and permeabilised according to the manufacturer's instructions using the BD Cytofix/Cytoperm Kit

(Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium). Incubations with primary antibodies were performed in BD Perm/Wash solution for 1 h at room temperature with 10 mg/ml of one of the following antibodies: anti-Bax (6A7) [mouse, monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Boechout, Belgium)], anti-Bak (AB-1) [mouse, monoclonal, (Calbiochem, Leuven, Belgium)], both recognizing active/activated forms of the proteins. After washing twice with PBS, cells were incubated with the corresponding secondary antibody at concentrations of 8 mg/ml at room temperature for 30 min on a shaking Platform (mouse, Alexafluor 488, green fluorescence; rabbit or mouse, Alexafluor 568, red fluorescence; Invitrogen/Molecular Probes, Merelbeke, Belgium). After two additional washing steps with PBS, cells were counterstained with Hoechst 33342 (DNA specific, blue fluorescence) and monitored by fluorescence microscopy (Olympus, Hamburg, Germany). The images were analyzed and elaborated using the Cell^M software (Olympus Soft Images Solutions GMBH, Germany).

2.10. Western blot analysis

Proteins of total extracts were separated by size using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 10%), transferred onto nitrocellulose membranes and blocked with 5% non-fat milk in phosphate buffered saline (PBS)-Tween overnight. Equal loading of samples was controlled using β -actin or lamin B and α -tubulin for cytosolic and nuclear extracts.

Blots were incubated with primary antibodies: anti-p1K β (1/3000, Cell Signaling 9246, Bioké, Leiden, Netherlands), anti-I κ B α (1/500, Santa Cruz SC-371, Tebu-Bio, Boechout, Belgium), anti-p50 (1/5000, Santa Cruz SC-7178X), anti-p65 (1/5000, Santa Cruz SC-8008), anti- α -tubulin (1/5000, Calbiochem CP06, VWR, Leuven, Belgium), anti-lamin- β (1/1000, Santa Cruz SC-6216), anti- β -actin (1/10000, Sigma-Aldrich A5441, Bornem, Belgium), anti-caspase-3 (1/5000, Cell Signaling 9668), anti-caspase-7 (1/1000, Cell Signaling 9494), anti-caspase-8 (1/1000, Cell Signaling 9746), anti-caspase-9 (1/1000, Cell Signaling 9502), anti-XIAP (1/1000, BD Pharmingen 610763, Erembodegem, Belgium), anti-Bcl-2 (1/2000, Calbiochem OP60) and anti-Mcl-1 (1/1000, Cell Signaling 4572). All antibodies were diluted in a PBS-Tween solution containing 5% of bovine serum albumin (BSA) or 5% of milk according to the providers' protocols. After incubation with primary antibodies, membranes were washed 3 \times 10 min with PBS-Tween, followed by an incubation of 1 h at RT with the corresponding secondary (HRP-conjugated) antibodies. After washing 3 \times 10 min with PBS-Tween, specific immunoreactive proteins were visualized by autoradiography using the ECL Plus Western Blotting Detection System Kit[®] (GE Healthcare, Roosendaal, Netherlands).

2.11. Elisa

IL-8 concentrations in culture supernatants of activated K562, U937 and Jurkat cells were measured by sandwich ELISA (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom). According to the manufacturer's guide, 50 μ L of cell supernatants were added together with 100 μ L of assay diluent to anti-IL-8 pre-coated wells, followed by 2 h of incubation at RT. After washing, a polyclonal peroxidase-conjugated anti-IL-8 antibody was added for another 60 min at RT. Colorimetric visualization and protein dosage were rendered possible by addition of the H₂O₂ and TMB (tetramethylbenzidine) containing substrate. After 30 min of reaction at RT, in the dark, the enzymatic reaction was stopped by H₂SO₄ and optical densities were measured at a wavelength of 450 nm.

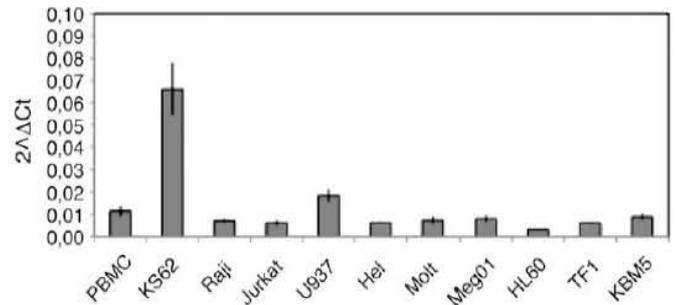


Fig. 2. Na⁺/K⁺-ATPase subunit α 1 mRNA quantification. Na⁺/K⁺-ATPase subunit α 1 mRNA content of untreated PBMCs and a wide panel of hematological cancer cell lines including K562, Jurkat and U937 cells was transcribed and then quantified by RT-PCR. The quantification of three independent experiments is expressed in brute 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} values \pm S.D.

2.12. Statistical analysis

Data is expressed as mean \pm S.D. and its significance degree was analyzed by Student's *t*-tests. *P*-values below 0.05 were considered as statistically significant.

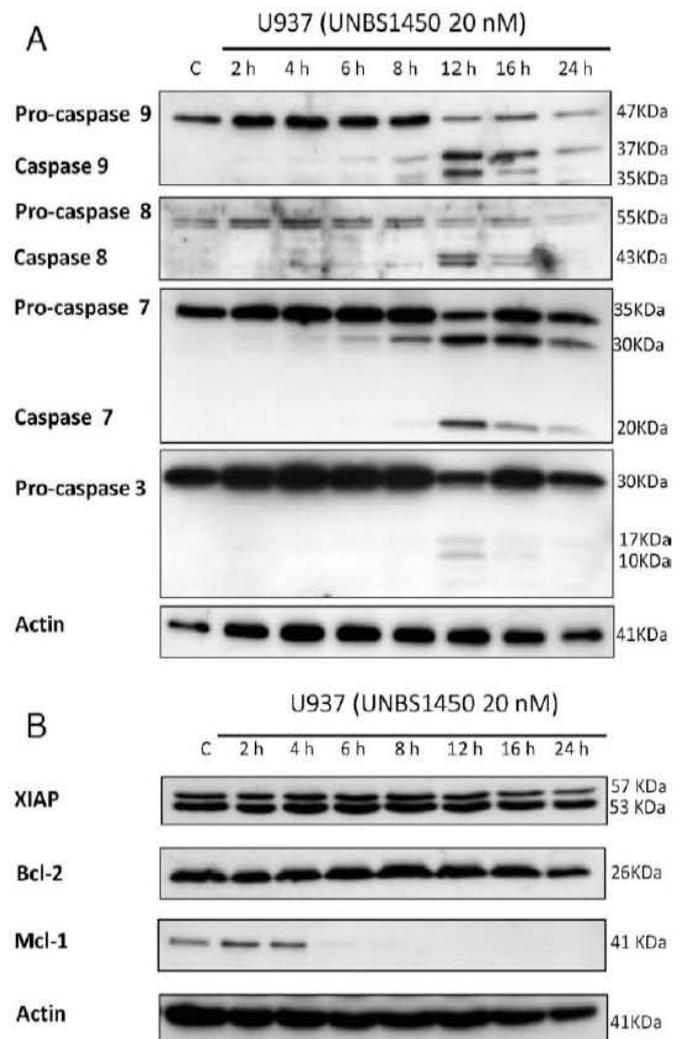


Fig. 3. (A) Caspase activation. U937 cells were incubated in RPMI + 10% FCS \pm UNBS1450 20 nM up to 24 h. Western blot analysis of UNBS1450-induced cleavage of pro-caspases-9, -8, -7 and -3. (B) Analysis of expression levels of anti-apoptotic proteins. UNBS1450-induced expression level alterations of XIAP, Bcl-2 and Mcl-1. The data shown here were representative for three independent experiments.

3. Results

3.1. UNBS1450 induces apoptosis in human leukemia cells

We first evaluated the effect of UNBS1450 on the cell growth of chronic myeloid leukemia K562, histiocytic lymphoma U937 and acute T-cell leukemia Jurkat. Cells were treated for 24, 48 and 72 h with different concentrations of UNBS1450 and their culture concentrations estimated by Trypan Blue exclusion assay. As reported in Fig. 1B, UNBS1450 deeply affected cell growth in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of 13.37 ± 2.1 nM in U937.

To disentangle whether the effects of UNBS1450 were due to an impact on cell viability rather than an effect on cell metabolism and, therefore growth, we performed at first a cell cycle analysis to detect and quantify the presence of any sub-G1 phase. The analysis reported in Fig. 1C showed that UNBS1450 lead to accumulation of cells in a sub-G1 phase in a dose-dependent manner, significantly starting from 15 nM, thus confirming that UNBS1450 induced cell death. From 20 nM to 30 nM, UNBS1450 increasingly drove U937 cells into a sub-G1 phase (Fig. 1C).

Next, we investigated the nature of cell death induced by UNBS1450, first by analyzing alterations in cell morphology by Hoechst staining and fluorescence microscopy (Fig. 1D, top). As

shown, the nuclei of U937 cells treated with UNBS1450 underwent morphological alterations typically occurring during apoptosis [11]. Fig. 1D (bottom) shows the quantification of apoptosis after UNBS1450 treatment, as estimated by counting the fraction of cells stained with Hoechst and presenting fragmented nuclei. Annexin V/PI double staining confirmed apoptotic cell death (Fig. 1E) starting from 15 nM, thus giving similar results to Hoechst analysis.

In order to generalize our effects, we used K562 cells and observed similar findings. Again, UNBS1450 reduced cell proliferation in a dose- and time-dependent manner with an IC_{50} value of 32.65 ± 3.10 nM at 48 h (Supplemental Fig. 1A). Cell cycle analysis (Supplemental Fig. 1B) showed that an incubation time of 48 h in the presence of UNBS1450 50 nM drove a fraction of cells into a sub-G1 phase while overall cell status remained rather unchanged; G1 and G2/M phases still showed control-comparable patterns. Hoechst staining indicated fragmented cell nuclei of cells dying via apoptosis (Supplemental Fig. 1C). FACS analysis for the exposure of phosphatidylserine/plasma membrane integrity by Annexin V/PI analysis confirmed the activation of an apoptotic program (Supplemental Fig. 1D). Similar effects of UNBS1450 on cell death induction were observed in Jurkat T cells (Supplemental Fig. 2A and B).

Concerning the specificity of UNBS1450 for cancer cells, we further analyzed the effects of UNBS1450 on normal, healthy PBMCs (Fig. 1F). After 24 h of incubation time, PBMCs had been treated by

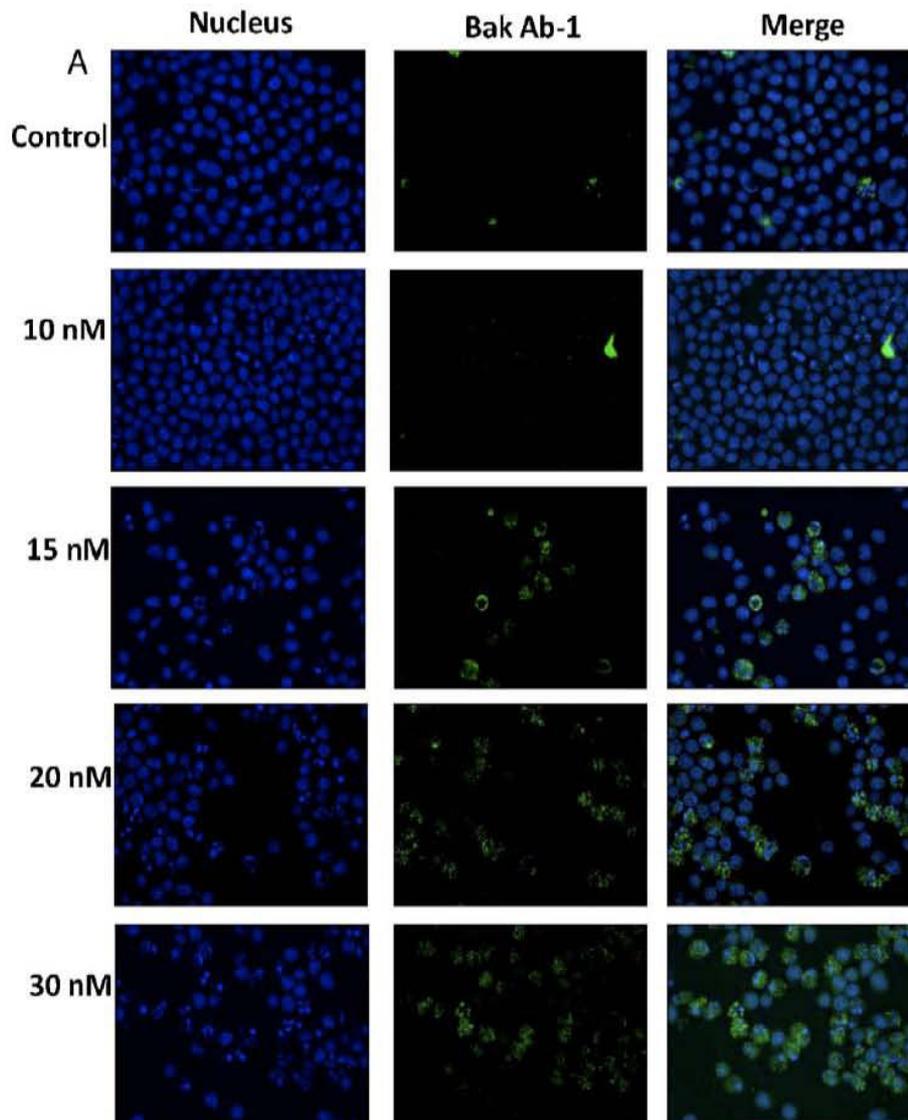


Fig. 4. UNBS1450 enables Bak/Bax activation. U937 cells were incubated for 24 h in RPMI + 10% FCS in presence or in absence of UNBS1450. Bak (A.) and Bax (B.) activation status were assessed by using primary antibodies specifically targeting activated forms of Bak (Ab-1; Calbiochem) and Bax (6A7; Santa Cruz). Counterstaining was done by Hoechst staining to assess apoptotic nuclei. The data shown here were representative for three independent experiments with similar results.

various concentrations of UNBS1450 (0–100 nM) for 24 h. Sample volumes were then divided: Trypan Blue staining was performed to assess cell integrity (upper panel) whereas Hoechst staining allowed determination of apoptotic percentages (lower panel). Altogether, UNBS1450 did not change cell permeability to Trypan Blue thus allowing us to conclude that cell viability of PBMCs is not compromised by UNBS1450. These results were confirmed by quantification of apoptotic cells: only a weak effect was observed at 100 nM ($\leq 16\%$) which was not comparable to what we obtained in leukemia cell lines ($>60\%$ for UNBS1450 at 30 nM in U937; Fig. 1D).

As it has been shown that the $\alpha 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPases is a target for UNBS1450 [2] and that it is frequently overexpressed in solid tumor cells where UNBS1450 is severely inhibiting proliferation [2], we compared $\alpha 1$ subunit mRNA expression levels of a panel of hematological cancer cell lines to those of normal healthy PBMCs (Fig. 2). Our results indicate all cell lines express the corresponding mRNA but that only K562 produces significantly higher amounts compared to PBMCs ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ values of 0.06 versus 0.011, respectively, * S.D.). For all other cell lines, subunit $\alpha 1$ specific mRNA levels were not significantly different compared to PBMCs.

3.2. Effect on anti-apoptotic cell signaling pathways

We subsequently investigated whether UNBS1450 was able to trigger a caspase-dependent apoptotic cell death (Fig. 3A). To this purpose, a kinetic analysis (0–24 h) was performed on U937 cells treated with UNBS1450 at 20 nM. We demonstrated that UNBS1450 at 20 nM induced the cleavage of the pro-caspases-9 and -8 starting after 12 h of incubation time. The executor pro-caspases-3 and -7, were cleaved into active caspase-3 and 7 (Fig. 3A).

Induction of apoptosis can be triggered by both inhibition of anti-apoptotic- and/or by activation of pro-apoptotic mechanisms. Here, overall expression of XIAP and Bcl-2 were not influenced by UNBS1450 (Fig. 3B). The expression level of Mcl-1 however, another anti-apoptotic Bcl-2 family member, was sensibly affected by the treatment with UNBS1450 as a strong reduction in the protein level was noticeable after 4 h of treatment while after 12 h of treatment, no expression level was detectable anymore.

3.3. Activation of pro-apoptotic mechanisms

We then analyzed *in situ* the activation status of pro-apoptotic Bak and Bax in U937 cells, untreated and treated with 10–30 nM of

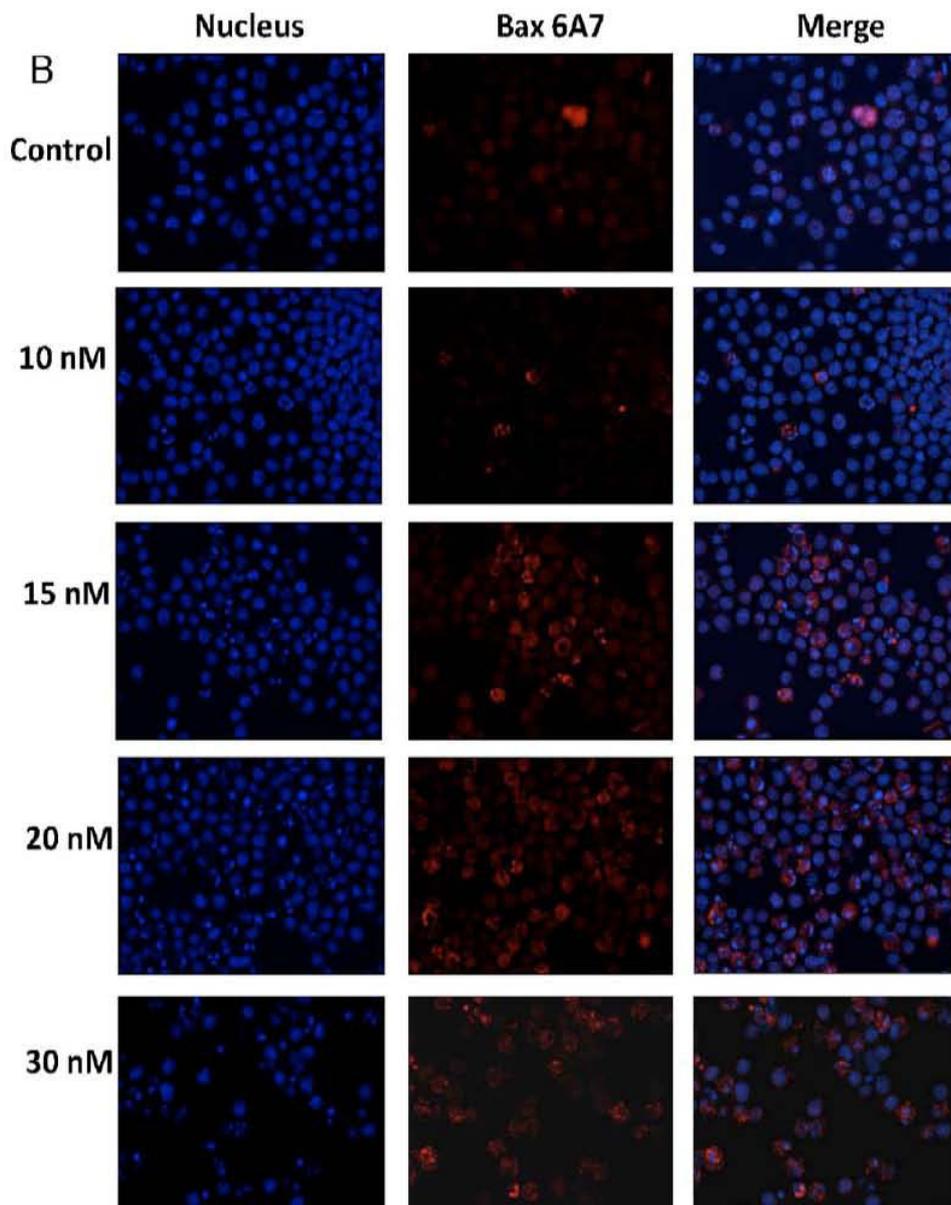


Fig. 4. (Continued).

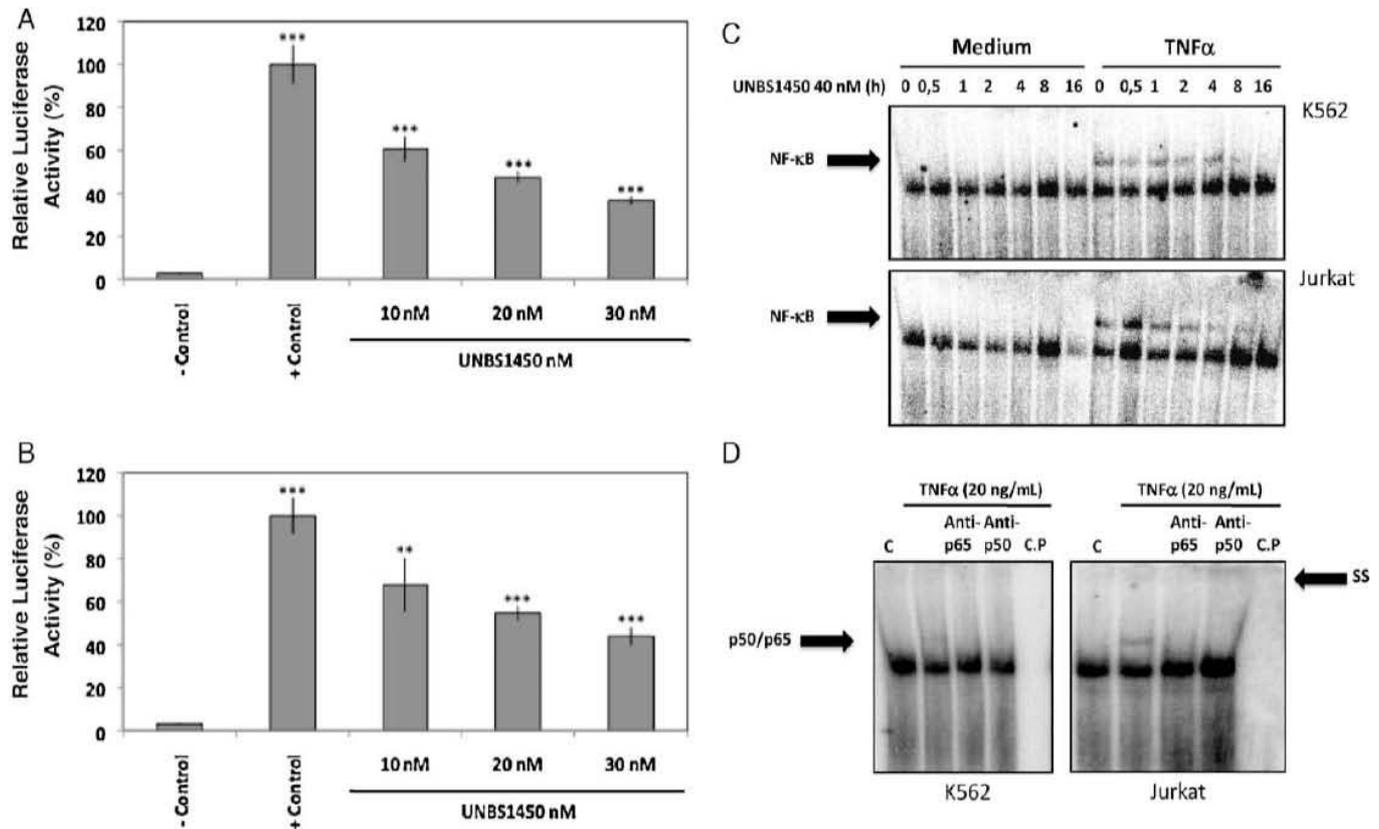


Fig. 5. Inhibition by UNBS1450 of TNF α -induced NF- κ B activation. (A) K562 and (B) Jurkat cells were pretreated with UNBS1450 at various concentrations from 10 to 50 nM and incubated for 2 h, followed by TNF α addition (20 ng/ml) and an additional incubation period of 6 h. Results are represented as the ratio of the measured luminescence of the firefly luciferase vector divided by the measured luminescence of the *Renilla* plasmid. Untreated cells were used as a negative control, cells treated with TNF α only as a positive control. Results are presented as mean \pm S.D. of 3 individual measurements performed in triplicates. (C) Effect of UNBS1450 on the binding affinity of NF- κ B was assessed by an EMSA on the K562 and Jurkat cell lines. The data shown here were representative for three independent experiments with similar results. (D) For supershift/immunodepletion experiments, the nuclear extracts and labelled probes were incubated in the reaction mixture for 30 min on ice prior to a 30 min incubation with 2 μ g of anti-p50 or anti-p65 antibodies. SS designates supershifted bands. (E) Jurkat cells were incubated with UNBS1450 (40 nM) for 2 h, followed by a TNF α (20 ng/ml) activation for the indicated time periods. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared, fractionated on a 10% SDS-page gel, transferred to a membrane and then tested for I κ B α and p65. Protein loading and purity of nuclear/cytoplasmic extracts were verified by lamin B and α -tubulin Western blots. Data shown are representative for three independent experiments with similar results. K562 (F), and U937 (G) cells were incubated for 2 h in RPMI + 10% FCS in presence or in absence of various concentrations (10–50 nM) of UNBS1450 before being activated by TNF α during 22 h. After 24 h of incubation IL-8 concentrations in supernatants were measured. Untreated cells served as negative control whereas cells activated by TNF α only were used as a positive control. The data shown here were representative for three independent experiments with similar results.

UNBS1450, by using antibodies specifically recognizing activated forms of both pro-apoptotic Bcl-2 family members. Immunostained cells were counterstained with Hoechst to detect apoptotic nuclei. Bak resulted activated by treatments with 15 nM UNBS1450 and higher (Fig. 4A). Similar results were observed for activated Bax (Bax 6A7) (Fig. 4B). As expected, both activated Bak and Bax co-localized with cells presenting fragmented, apoptotic nuclei, witnessing apoptotic cell death triggered by UNBS1450 a hemi-synthetic cardenolide originally from the plant *C. procera*.

3.4. Inhibition of NF- κ B pathway activation

NF- κ B transcription factor is well known to act as an inhibitor of apoptotic cell signaling specifically via transactivation. Moreover Mijatovic et al. [12] already provided first insights into UNBS1450-induced inhibition of NF- κ B activation. Here we observed that UNBS1450 reduced TNF α -driven NF- κ B activation in a dose-dependent manner in K562 and Jurkat cells (Fig. 5A and B). As illustrated in Table 1, UNBS1450 has however no repressing effect on constitutive, basal NF- κ B activity in K562 cells.

In order to further confirm the inhibitory effect of UNBS1450 on the TNF α -induced NF- κ B signaling pathway, we realized EMSA. Fig. 5C clearly shows that UNBS1450, at a concentration of 40 nM inhibits TNF α -induced NF- κ B–DNA binding. By applying various

pre-treatment times from 0 to 16 h, we obtained a complete inhibition after 8 h of pre-incubation. Incubation with p50 and p65 antibodies enabled us to identify the NF- κ B dimer composition as p50 and p65. Similar results were obtained for Jurkat cells (Fig. 5D).

NF- κ B activation is generally initiated by the degradation of its natural inhibitor I κ B α ; we thus assessed I κ B α integrity as well as the translocation of p65 from the cytoplasm to the nucleus by Western blot analysis (Fig. 5E). Both degradation of I κ B α as well as translocation of p65 into the nucleus, were analyzed by Western blot. In control cells without UNBS1450 pre-treatment, I κ B α degradation was observed after 10 min of TNF α stimulation; consequently, p65 translocation to the nucleus was observed in parallel. In contrast, the presence of UNBS1450 inhibited TNF α -induced degradation of I κ B α and considerably prevented the translocations of p65 into the nucleus (Fig. 5E, right panel).

To further investigate the influence of UNBS1450 on downstream NF- κ B signaling in K562, U937 and Jurkat cells, we chose IL-8 as it was described that this gene product is under the control of NF- κ B. We observed that UNBS1450-pre-treated cells produced significantly lower quantities of IL-8 (less than 600 pg/mL) compared to TNF α only activated K562 cells (1300 pg/mL) (Fig. 5F). Similar results were obtained for U937 (Fig. 5G). Unstimulated U937 cells produced low amounts of IL-8 (92 pg/mL) and TNF α activation resulted in increased IL-8 release (1002 pg/mL). A significant

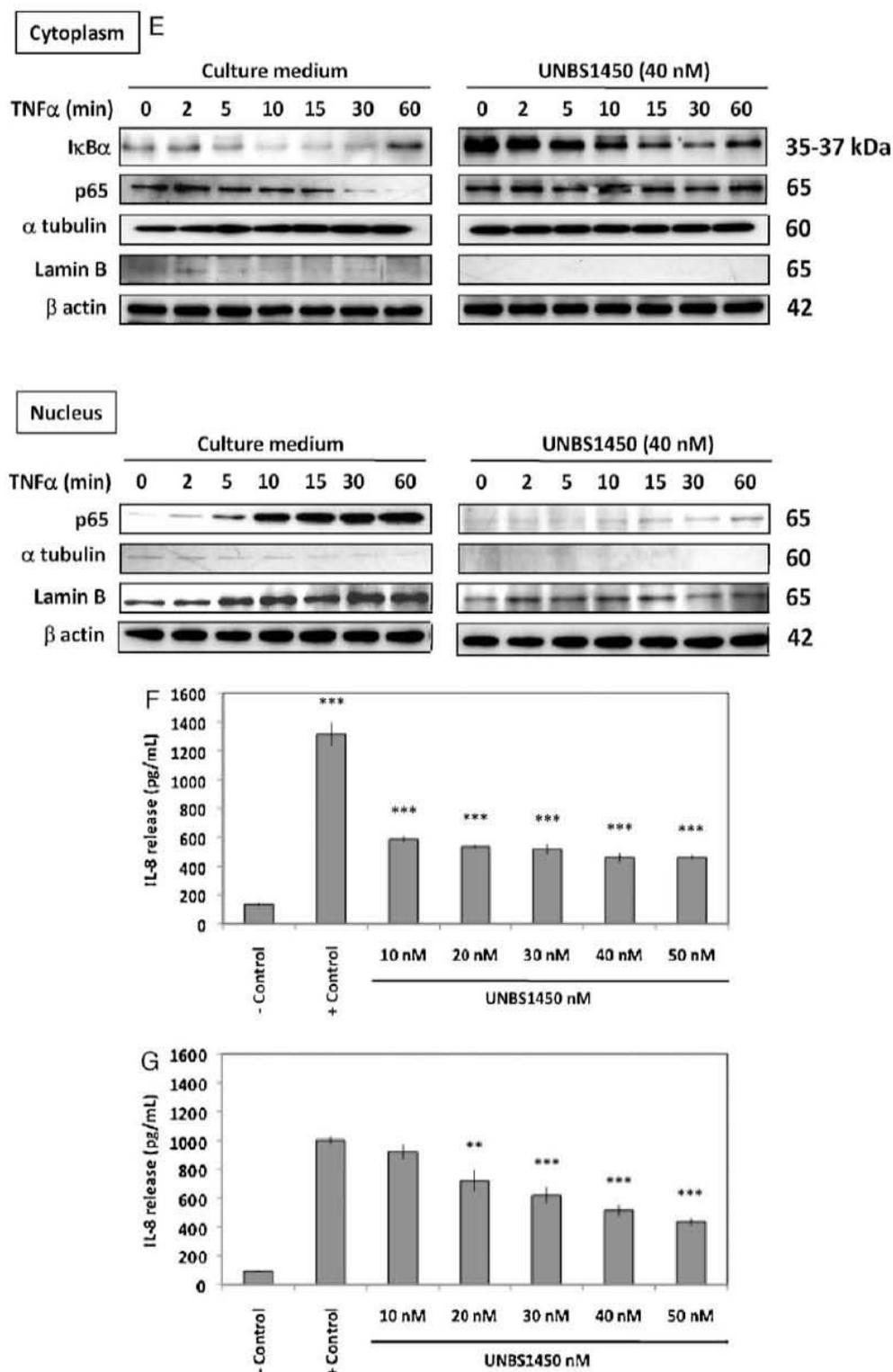


Fig. 5. (Continued).

inhibition was obtained after UNBS1450 treatment at 20 nM (IL-8 release: 721 pg/mL). In Jurkat cells, TNFα stimulation could not trigger IL-8 release; neither did UNBS1450 show any significant effect on IL-8 release (results not shown).

Table 1
Effect of UNBS1450 (40 nM) on basal and TNFα-induced NF-κB activity.

K562	R.L.A. (%)	S.D. (%)
Untreated	0.574	0.147
UNBS1450 (40 nM)	0.587	0.178
TNFα	100	2.850
UNBS1450 (40 nM) + TNFα	42.578	7.761

4. Discussion

We show here that UNBS1450, belonging to the cardenolide family of the steroid cardiac glycosides, efficiently reduces viability of leukemia cancer cell lines by inducing apoptotic cell death. We focused our efforts on possible modifications of inflammation and cell death induction by UNBS1450. To this purpose, we used chronic myeloid leukemia K562, histiocytic lymphoma U937 as well as acute T-cell leukemia Jurkat cells stimulated by TNFα as a model of investigation to mimic pro-inflammatory surroundings stimulating the NF-κB transcription factor.

While UNBS1450 has so far mainly been applied on solid tumors [1,12], we hereby confirm that deactivation of NF-κB

activity through UNBS1450 is also true in human leukemia cells as indicated by reduced induction of NF- κ B transcriptional activity, reduced binding to target DNA as well as repressed synthesis of NF- κ B-dependent genes. TNF α -induced p50/p65 dimer translocation to the nucleus is strongly reduced in the presence of UNBS1450 due to repressed I κ B α degradation.

We also analyzed the impact of UNBS1450 on leukemia cell survival capacity. As finally indicated by increased Annexin V/PI staining, fragmented nuclei after Hoechst staining and thus reduced cell numbers, UNBS1450 is beneficial to an apoptosis induction. We observed that nanomolar concentrations of UNBS1450 were able to induce the cleavages of the initiator caspases 8 and 9 as shown by Western blot. Furthermore, we obtained a cleavage induction of the pro-caspase-7, leading to hypothetical thoughts that UNBS1450 might induce apoptosis by processing and concomitant activation of executors caspases such as caspase-7 and caspase-3. Consequently, we assessed expression levels of various Bcl-2 family proteins in order to conclude on a possible amplification of the death signal through activation of the intrinsic mitochondrial cell death pathways [13,14]. The analysis of cell proliferation in the presence of UNBS1450 in both cell lines investigated reveals that the compound is able to affect cell proliferation at concentrations lower than those requested to induce apoptosis (see Fig. 1B and Supplemental Fig. 1A). This is in line with previous findings [15] and prompts to elucidate in the future whether this cytostatic potential may be also implicated in determining the cytotoxic effect.

Several studies underline their pivotal role [16] in apoptosis induction [17–19]. Loss of expression as well as over-expression of Bcl-2 family genes, depending on the pro- or anti-apoptotic potential, can lead to oncogenesis by decreased malignant cell death. It is for instance known that over-expression of anti-apoptotic Bcl-2 or Mcl-1 disables apoptosis induced by TNF-related ligands [20–22]. Consequently, we assessed by Western blot the expression levels of XIAP, a member of the inhibitor of apoptosis family, and Bcl-2 as well as Mcl-1, each a member of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily. Whereas expression levels remained unaltered for XIAP and Bcl-2 in the presence of UNBS1450, Mcl-1 was found to be strongly down-regulated by UNBS1450. Combined to the fact that noticeably low concentration levels in a nanomolar range were largely sufficient to influence the expression of Mcl-1 in the observed manner suggests this anti-apoptotic protein may play a major role in apoptosis induction due to UNBS1450.

Mcl-1 acts by directly binding to Bak and Bax proteins that are two pro-apoptotic Bcl-2 family members. From the perspective of the Bcl-2 family proteins, the intrinsic apoptosis pathway is initiated by various signals. BH3-only proteins such as Bim, Bid, Bad, Noxa or Puma engage with anti-apoptotic members such as Mcl-1 to relieve inhibition of Bak and Bax as reviewed by Kang and Reynolds [23]. Direct or indirect repression of Mcl-1 expression results in Bak and Bax activation and oligomerization eventually leading to mitochondrial outer membrane permeabilization and cell death through apoptosis [24]. Our results strongly suggest this pathway to be stimulated by UNBS1450 in human leukemia cell lines. Further point-by-point investigations are necessary to elucidate the exact molecular cascades closing the gap between Na⁺/K⁺-ATPase binding of UNBS1450 and Mcl-1 expression inhibition and thus apoptosis induction.

Today, NF- κ B is considered by most as a key anti-apoptotic factor [25,26]. Besides frequent constitutive expression of NF- κ B in various human cancer cell lines, contributing to the onset of drug resistance of tumor cells or to increased aggressiveness [27–29], it is well documented nowadays that TNF α release by the tumor microenvironment is a characteristic of many malignant tumors and acts as a sort of a master switch between activation of inflammatory

processes and oncogenesis [8,30]. Through its receptors both on epithelial and stromal cell membranes, TNF α either directly influences cell proliferation and malignant cell survival or indirectly drives surrounding stromal cells, macrophages, dendritic cells and fibroblasts into releasing general inflammatory cytokines such as TNF α itself, IL-1, IL-6 and IL-8 [31]. Altogether, this creates a beneficial situation for the onset of genetic alterations and enhanced survival and proliferation of the tumor cells.

As a conclusion, we hereby further described the mechanism by which UNBS1450 inhibits tumor expansion by cell death induction. As an addition to existing knowledge of anti-cancer activities of UNBS1450 due to autophagy [4,5] mainly on human glioblastoma and NSCLC, we demonstrate here that this hemi-synthetic cardenolide rapidly and effectively induces cell death through apoptosis in human leukemia cell lines. While down-regulating induced NF- κ B pathway, UNBS1450 activates the extrinsic caspase-dependent apoptotic pathway, represses the expression of Mcl-1, activating pro-apoptotic Bak and Bax and eventually leading to cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. However, we do not have obvious evidence that a downregulation of the NF- κ B pathway is linked to the observed induction of apoptosis as UNBS1450 does not show any inhibitory activities on constitutive NF- κ B activity in K562 cells where induced apoptosis is significant.

While additional analysis thus remain requested to further analyze signaling cascades involved, these findings show for the first time that UNBS1450 acts as an apoptogenic inducer, specifically affecting cancer cell lines. This makes of UNBS1450 a promising candidate as a new potential anti-cancer drug for leukemia and lymphoma treatments.

Acknowledgments

This work was supported by Télévie, the “Fondation de Recherche Cancer et Sang” and “Recherches Scientifiques Luxembourg” asbl. TJ is the recipient of an AFR grant (Fonds National de la Recherche Luxembourg). CC, FM, MHT and MS were supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). FG was a recipient of RedCat grant. The authors thank “Een Häerz fir Kriibskrank Kanner” association and the Action Lions “Vaincre le Cancer” for generous support. Further support was received from the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg and the European Union (ITN “RedCat” 215009 and Interreg IVa project “Corena”). Print costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2010.08.025.

References

- [1] 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;68:164–73.
- [2] 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;62:211–21 (Discussion 21–22).
- [3] 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.
- [4] 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;8:402–12.

- [5] 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;7:1285–96.
- [6] Lefranc F, Mijatovic T, Kiss R. The sodium pump could constitute a new target to combat glioblastomas. *Bull Cancer* 2008;95:271–81.
- [7] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49–62.
- [8] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:361–71.
- [9] Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* 2000;28:56–61.
- [10] Duvoix A, Delhalle S, Blasius R, Schnekenburger M, Morceau F, Fougere M, et al. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1101–11.
- [11] Cerella C, Scherer C, Cristofanon S, Henry E, Anwar A, Busch C, et al. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al2S4). *Apoptosis* 2009;14:641–54.
- [12] 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;5:391–9.
- [13] Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001;15:1022–32.
- [14] Kaufmann SH, Steensma DP. On the trail of a new therapy for leukemia. *Leukemia* 2005;19:2195–202.
- [15] 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;212:170–9.
- [16] Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008;27(Suppl. 1):S2–19.
- [17] Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286:1735–1738.
- [18] Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:91–6.
- [19] Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins – evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002;115:1567–74.
- [20] Henson ES, Gibson EM, Villanueva J, Bristow NA, Haney N, Gibson SB. Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 2003;89:1177–92.
- [21] Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, et al. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 2004;64:3517–24.
- [22] Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE, Hersey P. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett* 2000;482:193–9.
- [23] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1126–32.
- [24] Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005;310:66–7.
- [25] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680–4.
- [26] 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;76:1340–51.
- [27] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5:749–59.
- [28] Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Reversal of chemoresistance and enhancement of apoptosis by statins through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Biochem Pharmacol* 2008;75:907–13.
- [29] Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2010;102:639–44.
- [30] Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis. *Nature* 2009;36–7.
- [31] Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 2008;13:5094–107.



Commentary

UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death

Tom Juncker, Marc Schumacher, Mario Dicato, Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2008

Accepted 29 January 2009

Keywords:

Calotropis procera

Cardenolide

Na⁺/K⁺ ATPase

UNBS1450

Nuclear factor κB (NF-κB)

Apoptosis

Autophagy

ABSTRACT

Despite significant progress in oncology therapeutics in the last decades, the urge to discover and to develop new, alternative or synergistic anti-cancer agents still remains. For centuries it has been known that the coarse shrub *Calotropis procera* is a very promising source of ascaricidal, schizonticidal, anti-bacterial, anthelmintic, insecticidal, anti-inflammatory, anti-diarrhoeal, larvicidal and cytotoxic chemicals. Different compounds like norditerpenic esters, organic carbonates, the cysteine protease procerain, alkaloids, flavonoids, sterols as well as numerous types of cardenolides have provided this plant for centuries with scientists' interest. The chemical class of cardenolides and their related bioactivity evaluation and structure–activity relationship (SAR) studies pointed out their therapeutic utility and led to the discovery of promising drug candidates. Recently the cardiotoxic steroid UNBS1450 **01** (derived from 2-oxovoruscharin **02**) from *C. procera* was shown to additionally exert an anti-cancer activity. UNBS1450 **01** has been proven to be a potent sodium pump inhibitor, showing anti-proliferative and cell death-inducing activities. This anti-cancer potential of UNBS1450 **01** is achieved by disorganization of the actin cytoskeleton after binding to the sodium pump at the cellular membrane, by inducing autophagy-related cell death, by repressing NF-κB activation as well as by down-regulating c-Myc in cancer cells. We aim to review pharmacologically important chemical extracts from *C. procera* and focus more specifically on the anti-cancer activities of UNBS1450 **01**.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. *Calotropis procera* as a source of natural drugs1.1. *C. procera*

According to literature, the origin of synthetic drugs development lies within the upcoming of The Industrial Revolution. The potentially more active synthetic products and the increasing economic power of pharmaceutical companies were the main reasons for a preference for these new products compared to the natural compounds from mineral, plant and animal sources used for ages.

However, a significant number of these synthetic drugs are obtained from natural precursors; it is even estimated that 11% of the drugs considered as basic and essential by the World Health Organisation (WHO) are strictly of plant origin. Digoxin, quinine, quinidine, vincristine, vinblastine, atropine, morphine and codeine might be the most prominent. Furthermore, according to Yue-Zhong Shu, 60% of current or future anti-tumor and anti-infectious drugs are of natural origin [1].

C. procera, a member of the Asclepiadaceae, is a woody, broadleaf evergreen coarse shrub, 3–5 m tall, widely growing in the tropics. It is distributed in arid to semi-arid regions of the Caribbean, Central America, South America, Africa, India and Israel, mainly appearing on plains and in the uplands. For decades, *C. procera*, also referred to as “The Apple of Sodom” has been used especially in traditional folk medicine because of its pharmacologically active compounds found in its roots, bark, leaves and mainly in its latex which exudates from damaged leaves. Meanwhile, chemical extracts from *C. procera* have been shown to have ascaricidal, schizonticidal, anti-bacterial, anthelmintic, insecticidal, anti-inflammatory, anti-diarrhoeal, larvicidal, cytotoxic and analgesic effects, thus explaining a growing demand in today's medical research for the different parts of the plant [2–5].

1.2. The latex of *C. procera*

More than 12,000 plant species contain latex, a milky fluid in which occurs a wide range of proteins, and for some 1000 species also *cis*-polyisoprene that is the polymeric hydrocarbon of rubber [6]. As the latex is abundant in the green parts of the plant, it is thought to be produced and accumulated as a defense strategy against viruses, fungi and insects. Indeed, besides proteins

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.

E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

involved in rubber biosynthesis, latex fluids have been shown to contain proteins implicated in plant defense and oxidative metabolism [7,8]. Today, latex is considered as a promising source of pharmacologically active molecules that might be chemically modified to improve their effectiveness.

With regards to *C. procera*, although the pharmacological potential of its latex has well been proven, only few active latex molecules have been identified until today; most often latex is either used as an entity or is only poorly processed, mainly in order to eliminate rubber compounds. Usually, the crude latex from *C. procera* is collected from non-cultivated plants by small incisions near the younger leaves and is mixed 1:1 (v/v) into distilled water. The material is then kept under constant, gentle, agitation in order to prevent it from precipitating. It is maintained at room temperature until being centrifuged at $5000 \times g$, 10 min at 4 °C. The precipitated material is pooled apart while the supernatant is further dialysed using membranes of 8000 Da cut-off, thus keeping the protein fraction, before being lyophilized. Generally, authors use both, the dialysis liquid containing low molecular weight compounds, called the dialysis latex (DL), and the non-dialyzable latex (NDL) obtained after exhaustive dialysis and containing concentrated proteins.

Soares et al. were among the first to show benefic, antinociceptive effects of fractionated latex (NDL) [9]. After acetic acid induced writhes in mice, the latex was capable of inhibiting up to 100% the abdominal constrictions in a dose-dependant manner (12.5–50 mg/kg). Morphine was used as a positive control (54.5% of inhibition). Similar results were obtained for formalin-induced paw licking for a hot plate test. In contrast to morphine, they found that the opioid antagonist naloxone did not alter the latex-induced antinociceptive effect.

In 2006, Freitas et al., went a bit further and discovered pro- and anti-inflammatory potentials of dialysed and non-dialysable latex [10]; dialysed latex of *C. procera* was shown to increase induced leukocyte, especially neutrophil, migration whereas anti-inflammatory and anti-nociceptive activities were associated to non-dialysable latex.

Since *C. procera* has been known to be effective against several human diseases, the aim of the work of Ramos et al., was to elucidate larvicidal activities of different fractions of the plant's latex [11]. Their evaluation was based on egg hatching and larval development of *Aedes aegypti*. A 10 mg/mL concentration of NDL was able to completely block egg hatching; the inhibiting potential of the DL fraction was significantly lower as a 5 times greater concentration (50 mg/mL) was needed in order to achieve 0% of egg hatching. Both, NDL as well as DL, also triggered severe larvae mortality in a dose and exposure time-dependent manner. Chromatography analysis revealed different protein and amino acids of NDL and DL latex, thus delivering promising outlooks for future preparations of *C. procera* latex as a larvicidal compound.

In contrast to latex fractionation, some authors used air dried latex; in most examples, latex was extracted from the aerial parts of the plant before being dried under shade (DL, dried latex).

After being triturated 1:1 with gum acacia, DL administrated orally to albino rats and guinea pigs inhibited carrageenan and Freund's adjuvant-induced edema as well as granuloma formation. Further anti-inflammatory activities of DL resulted in fluid exudation inhibition and in reduced UV-induced erythema onset [12]. Similar results were obtained by Arya and Kumar. Shade dried DL, Soxhleted to get methanolic extracts and triturated with gum acacia as seen before, showed anti-inflammatory activity against histamine, serotonin, compound 48/80, bradykinin and prostaglandin mediated inflammatory reactions in induced rat paw edema [13]. The same research team also demonstrated that DL, triturated this time in normal saline, is able to play an antioxidant and anti-hyperglycemic role in alloxan-induced diabetes in rats

[14]. Contradictory to these findings, there is some evidence that DL is also capable of inducing pro-inflammatory effects. In 2003, Shivkar et al. proved DL to be able to produce dose-dependent inflammatory responses resulting in rat paw edema similar to carrageenan. Further studies suggested biogenic amines, especially histamine, to be involved in DL driven inflammation [15].

Similarly, by extracting DL sequentially with petroleum ether and methanol followed by a silica gel chromatography fractionation, Choedon et al. applied a DL treatment on X15-*myc* transgenic, hepatocellular carcinoma developing mice [16]. Not only did they discover an *in vivo* chemopreventive effect of DL, they also noticed that DL has cytotoxic effects on Huh-7 and COS-1 cancer cell lines. By chromatography separation, they isolated a polar fraction responsible for the observed cytotoxic potential. Apoptosis analysis revealed induced DNA fragmentation as a mechanism.

1.3. Ethanolic, methanolic and aqueous extracts

Phytochemically, the plant has been investigated since the 1960s, especially for cardenolides [17,18], triterpenoids [19,20], anthocyanins [21] and hydrocarbons [22]. Besides the use of plant latex, aqueous, methanolic, ethanolic and other organic plant extracts from different parts of the plant, namely flowers, buds, roots, stems and leaves, were among the very first approaches to develop natural drugs for classical and alternative medicine. In 1979, Malik and Chughtai described antimicrobial activity against pathogenic bacteria [23]. Moreover, organic extracts of *C. procera* were also shown to possess nematocidal [24,25], larvicidal [26], anti-fertility [27] and even anti-cancer potentials [28,29]. In 1987, Mascolo et al. further elucidated the biological properties of *C. procera* and, using ruminant animal models, discovered anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and antipyretic activities in extracts from *C. procera* flowers. In the late 1980s, Fenado et al. established a standard method to get crude aqueous extracts (CAE) from powdered *C. procera* flowers [30]. Similarly, in 1994 Asuzu and Onu managed to get crude methanolic extracts (CME) from *C. procera* using a Soxhlet apparatus [31]. Others used filtered ethanolic extracts to elucidate the plant's pharmacological potential [32,33].

Meanwhile, the ethanolic extracts of flowers, buds, roots, stems and leaves were discovered to have a schizontocidal potential *in vitro*. The different fractions of *C. procera* showed dose-dependant inhibitory effects on chloroquine sensitive and resistant *Plasmodium falciparum* strains. Antimalarial screening had been performed according to the method of Ang et al. [34]; parasitaemia had been adjusted to 1–1.5% before different concentrations of *C. procera* fractions were added. After an incubation time of 36 h, each sample was analysed under the microscope.

Furthermore, both, aqueous and methanolic extracts of powdered *C. procera* flowers, were shown to possess time-dependent anthelmintic activities *in vitro* [35]. Based on nematode egg counting in sheep feces, the authors confirmed their observed results *in vitro*: a maximum of 88.4% egg reduction (ECR, egg count percent reduction) had been recorded in sheep treated with CAE and 77.8% in sheep treated with crude powder. CME had been proven to be less effective.

Besides further insecticidal properties [36], organic *C. procera* extracts also possess interesting cytotoxic effects. Compared to the reference compound cisplatin (IC_{50} 0.9 μ g/mL), Smit et al. demonstrated that ethanolic flos extracts (IC_{50} 1.4 μ g/mL) have potent growth inhibition capacities when used on COLO 320 tumor cells.

More specific spectral data analysis of organic extracts of the plant revealed the presence of a norditerpenyl ester, calotroterpenyl, two pentacyclic triterpenoids, calotropursenyl acetate and

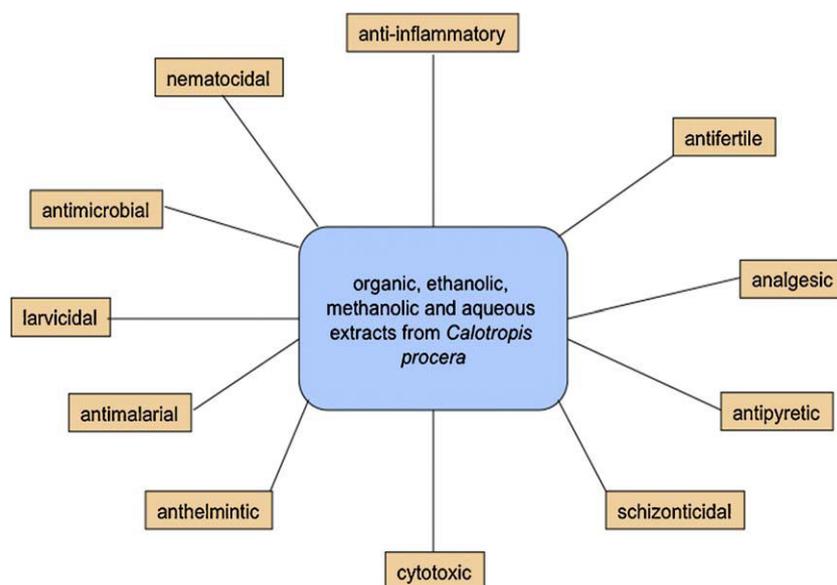


Fig. 1. Illustrative representation of the different pharmacologically important potentials of *Calotropis procera* extracts.

calotropfriedelenyl acetate as well as an organic carbonate, namely 2-propenyl-2'-hydroxyethyl carbonate [37,38] (Fig. 1).

1.4. Procerain

By further method standardizations and working condition optimizations, the next step in characterizing the plant's pharmaceutical potentials consisted in the isolation of new, specific and pharmacologically important proteins and compounds, especially with an enzymatic activity.

By default, plants are usually rich sources of various kinds of proteases, enabling protection, development of the plant, ripening of its fruits [39], nutritional reserve, degradation of seed storage proteins thus allowing germination [40], activation of proenzymes as well as elimination of defective proteins [41]. Proteolytic enzymes from plant sources, are of interest for the pharmaceutical research as they have been proven to be active over wide ranges of temperature and pH [42]. Consequently, an important number of proteases have been isolated from lattices, fruits and seeds. Among these, most belong to the cysteine super family, one of five catalytic types of proteases [43]. Concerning the different *Calotropis* species, since 1979 it has been known that the latex of *Calotropis gigantea* contains four cysteine proteases, namely Calotropin FI, FII, DI and DII [44]. More recently, Dubey et al. purified a new cysteine protease from *C. procera*, named procerain.

Procerain was isolated by applying a 50% ammonium fractionation of crude, gumless latex followed by CM-sepharose and SP-sepharose cation exchange chromatographies. Different physical and chemical properties were then analysed: an SDS-PAGE electrophoresis revealed an average M_r of 28.8 kDa for procerain, putting it in the common molecular mass range of 20–35 kDa for plant cysteine proteases. No carbohydrate could have been determined by the phenol sulfuric acid method [45] thus differing procerain from glycoproteins. An isoelectric point of 9.32, defined by isoelectric focusing on polyacrylamide gel, indicates a predominance of basic amino acid residues. Total amino acid analysis revealed the presence of seven cysteines, one free and six forming disulfides [46], eight tryptophan and twenty tyrosine residues. In addition to proteolytic activity against different natural substrates such as casein, azocasein, azoalbumin and haemoglobin, procerain also showed hydrolytic activity against synthetic substrates. The enzyme's activity was best over a broad pH 7.0–9.0 range and together with its high stability with respect

to temperature, denaturants and organic solvents, this makes it a very useful tool for food and pharmaceutical industry.

1.5. Cardenolides

Since the 1960s it has been known that the principal toxic components in *C. procera*, capable of causing death in mammals when reaching high concentrations, are cardenolides [47]. Chemically, cardenolides, cardiac glycosides named after their capacity to influence heart beat, are 5 β H,14 β -hydroxy α,β -unsaturated γ -lactones widely distributed in plants. In 1983, Erdman was among the first to measure individual nutrient and cardenolide concentrations in unextracted as well as in extracted *C. procera* [48]. Several cardenolides were positively identified: ascleposide, calactin, calotoxin, calotropin, calotropagenin, coroglaucigenin, proceroside, usharidin and uzarigenin. Recently, with the aim to use cardenolides as potential anti-cancer agents, the list of cardiotoxic glycosides found in *C. procera* has been enlarged by 2-oxovoruscharin **02**, a derivative of voruscharin [49]. However, due to its high toxicity observed in mice, chemical modifications were necessary in order to improve tolerance *in vivo*. The outcome, named UNBS1450 **01**, not only showed reduced toxicity, but also a severely increased therapeutic anti-cancer activity [50].

Fig. 2 gives a short overview of how *C. procera* can be used in pharmaceutical science, either by applying rather simple methods, to extract for example latex, or by more sophisticated approaches seeking to isolate specific compounds like cardenolides.

2. Bioactivity of cardenolides

2.1. Effect of cardenolides on the sodium pump

Frequently named sodium pump, the Na,K-ATPase is an integral-membrane protein with both an enzymatic and a transporter function: in the conformational state E1, the phosphorylated protein binds three intracellular Na⁺. These Na⁺ ions are then released into the extracellular fluid, in exchange to 2 external K⁺ ions and phosphate formation (state E2). With the Na⁺/K⁺ gradient being implicated in the regulation of animal cell volume, in lyses prevention, in membrane potential control, in pH homeostasis and in energy delivery for ion transport, the sodium pump is essential for cell viability and is thus ubiquitously expressed throughout the different tissues [51,52].

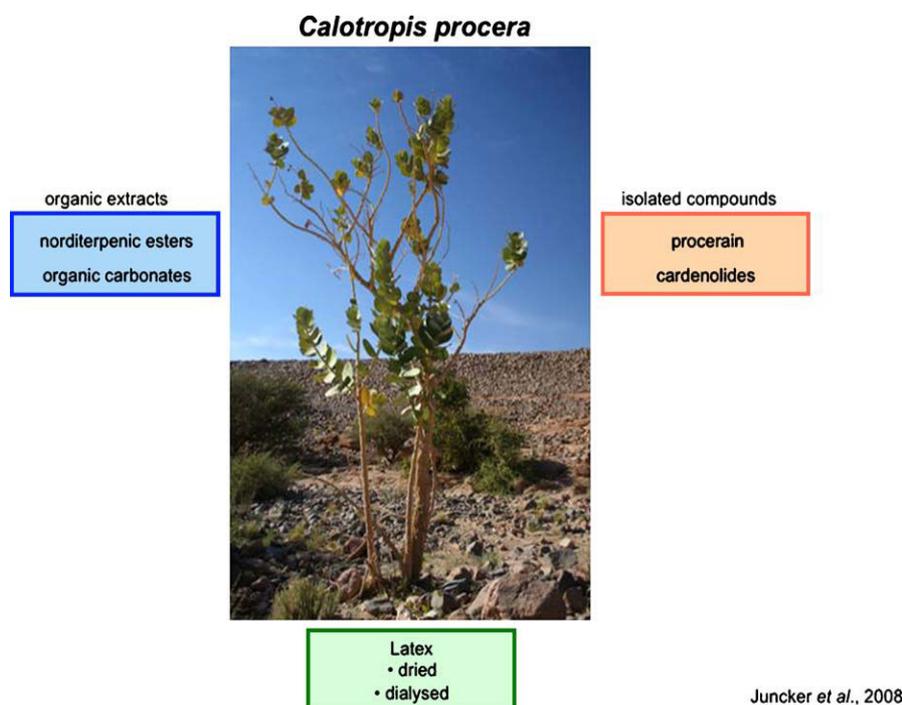


Fig. 2. *Calotropis procera* cartoon showing the three main approaches for using the plant's intrinsic pharmaceutical potential.

The Na,K-ATPase is a heterodimer formed of an α and β subunit. The α subunit, with a molecular mass of 106 kDa, contains a ten segment transmembrane domain (M) and three different cytosolic domains, namely a nucleotide binding domain (N) binding ATP, a phosphorylation domain (P) and an actuator domain (A). The abundantly glycosylated β subunit of 40 kDa has a single transmembrane segment, a short intracellular N-terminal and a larger extracellular site. In contrast to the catalyzing α subunit, the β subunit is required for the biogenesis and activity of the holoenzyme. A third subunit FXD has been reported to be associated to the α and β subunits in some tissues.

Endogenous and exogenous cardiac glycosides, for example cardenolides, act by binding to extracellular H₁–H₂, H₃–H₄ and H₅–H₆ loops of the catalytic α subunits of sodium pumps. It had been shown that these cardenolide compounds are tightly fixed to the E2 conformational enzyme state, leading to inactivation [53]. E2-phosphoenzyme-cardiotonic compound complexes were found to be formed irreversibly. With varying K_d values, the inhibition complexes are probably internalized and degraded. Inhibitors of the Na⁺,K⁺ transporter lead to an increase of the cytosolic Na⁺ concentration and are thus influencing the thermodynamics of the Na⁺,Ca²⁺ exchange pump finally resulting in an increased Ca²⁺ concentration in sarcoplasmic reticulum [54] (Na⁺-Lag hypothesis).

However, recent studies suggest that this Na⁺ pump inhibition is not necessary to obtain an inotropic effect on myocytes [55]. By interacting with cardiac glycosides, the Na⁺–K⁺ pump complex has been shown to act as a signalosome. Various intracellular signaling pathways are responsive to cardiac glycoside binding; Ca²⁺ could play the role of a second messenger, the phosphatidylinositol 3'-kinase and protein kinase B can be activated as well as the SRC-EGFR-RAS-RAF-ERK cascade. In this way, cardiac glycosides may influence cell proliferation, cell differentiation and finally cell death by apoptosis (Fig. 3).

2.2. Cardenolide derivatives and their structure–activity relationship

Recently, Toxicaroside D **03**, isolated via bioassay-guided fractionation from an ethanolic stem extract of the rainforest tree

Antiaris toxicaria, exhibited cell proliferation inhibition in different cancer cell lines together with 10 other cardenolides purified from the same source. Concerning structure–activity relationship, a reduction of 19-CHO and mono-glycosidation of the 3-hydroxy group resulted in a higher cytotoxicity to different cancer cell lines by factor 2 and over 100 respectively. In contrast, a β -hydroxylation of carbon 12 reduced the induction of apoptosis [56]. However, an additional acetoxy group did not modify the cytotoxicity [57,58]. These observations had been confirmed in a previous publication [57]. Structural modification of the core unit as an additional alcohol group or an epoxy group at C8 or a double bond between C16 and C17 led to a decrease of cytotoxicity [58]. Additionally, Ueda et al. isolated 15 cardenolides from the Vietnamese medicinal plant *Streptocaulon juvenas*. They proved that di-glycosidation did not alter or even decrease the activity. Hence, the hydroxyl groups at C1 and C5 were important for the anti-proliferative property. These authors concluded that bioactivity of the isolated cardenolides-set depends on the hydrophilicity of the sugar unit linked to C3-OH because a free hydroxyl C2' and acetylating of C3'OH reduced the cytotoxicity [57].

The research group of O'Doherty developed a novel stereoselective synthetic method to glycosylate the aglycone core units of cardenolides. The comparative study of the synthesized mono-, di- or tri-saccharide derivatives **05–07** of digitoxigenin **04** showed that the linkage of a monosaccharide increased the bioactivity [59], which confirmed the previously described studies by Yao and Kadota [56,57]. The higher anti-proliferative properties of the tri-saccharide derivatives of digoxin and gitoxin underlined this result [60]. In detail, the stereocenter at C2' of the sugar unit plays a crucial role in cytotoxicity, as the unnatural epimers of the cardenolides lose almost their complete apoptotic activity against cancer cells [61].

The anti-inflammatory bioactivity of cardenolides proved to be sensible on chemical modifications of the core unit. Although, an additional acetoxy function at C16 does not alter the observed properties, an additional alcohol group at C8, modification of the C14 hydroxyl group or a double bond between C16 and C17 resulted in a lower anti-inflammatory activity [58].

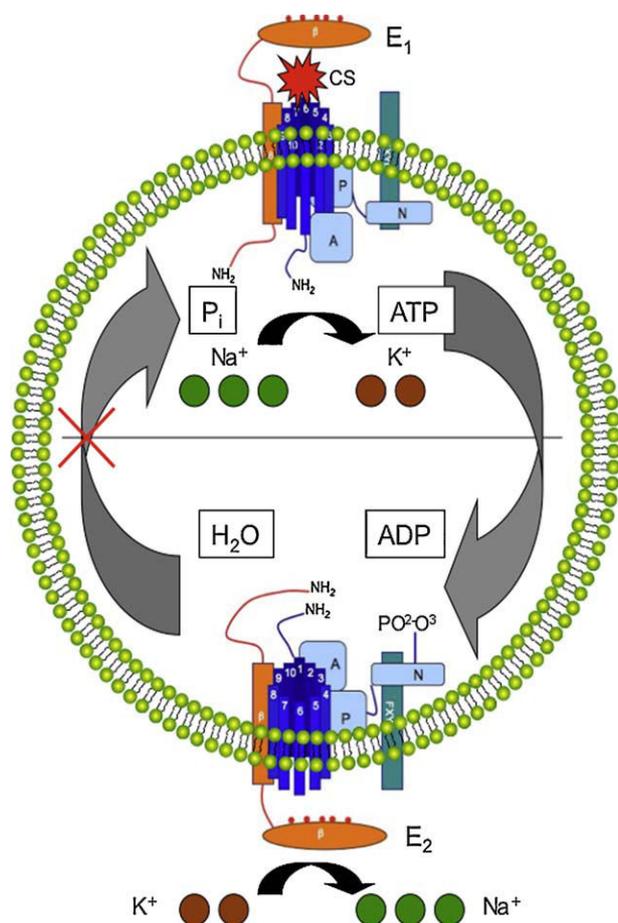


Fig. 3. Schematic representation of Na^+/K^+ ATPase inhibition by cardenolides. Two conformationally different states are known for the Na^+/K^+ ATPase: in E1, enzyme phosphorylation on the phosphorylation domain P enables intracellular binding of 3 Na^+ in exchange for 2 K^+ , thus leading to state E2. The 3 Na^+ are released in the extracellular fluid whereas 2 new K^+ are imported. Through hydrolysis, the enzymatic complex returns to state E1 with P_i release. Cardenolides (CS) like cardenolides become tightly bound to the different extracellular loops (H_1 – H_2 , H_3 – H_4 , H_5 – H_6) of the enzymatic α subunit. The holoenzyme is blocked in state E2, no further ion exchange is possible.

A low anti-proliferative activity is not necessary for the reversal of multi-drug resistance (MDR) as one cardenolide, even exhibiting a cytotoxicity at a concentration range up to 77 mM, might serve as potential future lead MDR-cancer reversal agent due to the calcein accumulation in MDR human ovarian cancer 2780AD cells [58]. This compound had been isolated first by Neumann and its structure determination had been carried out by the research teams of Reichstein and Yamauchi [62–64] (Figs. 4 and 5).

Interestingly, in the case of the hemi-synthetic derivative **01** of 2''-oxovoruscharin **02**, the reduction of the carboxyl function into a primary alcohol did not result in a higher cytotoxicity but the *in vivo* toxicity was reduced by factor 10 [49] (Fig. 4).

The design of novel anti-cancer drugs derived from natural products is still a matter in the development of potent cancer therapeutics. There is still a need and potential in further investigation of natural sodium pump inhibitors.

2.3. Pharmaceutical activity of cardenolides

With chronic heart failure being a widespread health problem in modern society, there is an urge for new therapy drugs. According to today's knowledge, arterial hypertension and coronary artery disease are among the main causes for the development of heart failure diseases. Constant exposure to high concentrations of hypertension-producing hormones like epi-

nephrine, drives both, cardiac and arterial myocytes into molecular remodeling for example by internalizing β -adrenergic receptors, by altering G protein expressions, by lowering K^+ channel expressions and by increasing $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumps, thus favoring severely reduced intracellular Ca^{2+} concentrations [65].

Exogenous as well as endogenous cardiac glycosides act according to the Na^+ -Lag hypothesis: as seen before, partial inhibition of the Na^+/K^+ pump by these cardiac glycosides results in higher Na^+ concentrations leading to increased Ca^{2+} concentrations thus increasing cardiac output. Certain vertebrates endogenously produce cardiac glycosides with a steroid core, namely the cardenolides Ouabain and Digoxin as well as the Bufadienolides Marinobufagenin, Telocinobufagin and 19-Norbufalin. Moreover, since the 1990s there is increasing interest in the possible role of the sodium pumps in myocytic hypertrophy [66]. On *in vitro* myocyte cultures, inhibition of Na^+/K^+ -ATPases by cardiotonic compounds like ouabain resulted in increased contractility, growth, protein synthesis, early proto-oncogene responses, AP-1 and NF- κ B transcription factor activations thus explaining the beneficial effect of digitalis, another cardiotonic steroid, on heart failure. Despite being the oldest drug in cardiovascular medicine, digitalis is still being used in contemporary heart failure treatments.

Due to cardiotonic steroid-induced signaling pathways, the various endogenously synthesized cardiac glycosides constitute a new class of steroid hormones, regulating blood pressure, arterial tension and insulin release.

Because of the evidence that cardiac glycosides might influence cell proliferation and differentiation and that cancer cells have enhanced Na^+/K^+ activity, further studies trying to elucidate the effects of cardiac glycosides on tumor growth came up. In 2001, Stenkvist discovered a reduced death rate (6% versus 34%) of breast cancer patients when treated for a long period (22 years) with digitalis glycosides [67]. In the same context, leukemia has been shown to be less frequent in a group of patients treated with cardiac glycosides for heart failure. Also bufalin, a bufadienolide cardiac glycoside, has been used for ages in Chinese medicine to treat hepatocarcinoma and leukemia. Meanwhile, numerous studies indicated that cardiac glycosides are able to block several cancer cell types in the G_2/M cell cycle phase [68,69]. In order to further evaluate the cytotoxic effects of cardiac glycosides, it is of great importance to develop non-cardiotonic cardiac glycosides. UNBS1450 **01**, a semi-synthetic derivative of 2-oxovoruscharin **02**, one of the first non-cardiotonic compounds, first described in 2005, just entered phase I of clinical trials (Table 1).

3. UNBS1450 and its anti-cancer activity

3.1. The impact of UNBS1450 on the Na^+/K^+ -ATPase isozymes

Several isozyme forms are known for Na^+/K^+ -ATPases, depending on tissue and cell type: 4α and 3β isoforms have been identified so far. Until today, severely increased expression of the $\alpha 1$ subunit has been associated to the clinical patterns of non-small cell lung cancers (NSCLC) and glioblastoma [70,71].

For both studies, sodium pump inhibition assays were performed using a heterologous protein expression system. Given the advantage of producing high amounts of recombinant Na^+/K^+ -ATPases, baculovirus-transfected Sf-9 insect cells expressing $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ isozymes were used to analyse the inhibitory capacities of several cardenolides, among which UNBS1450 **01**. When compared to ouabain and digoxin, UNBS1450 **01** showed a greater Na^+/K^+ -ATPase isozyme inhibitory potential. The $\alpha 3\beta 1$ dimer was mostly affected by an UNBS1450 inhibition,

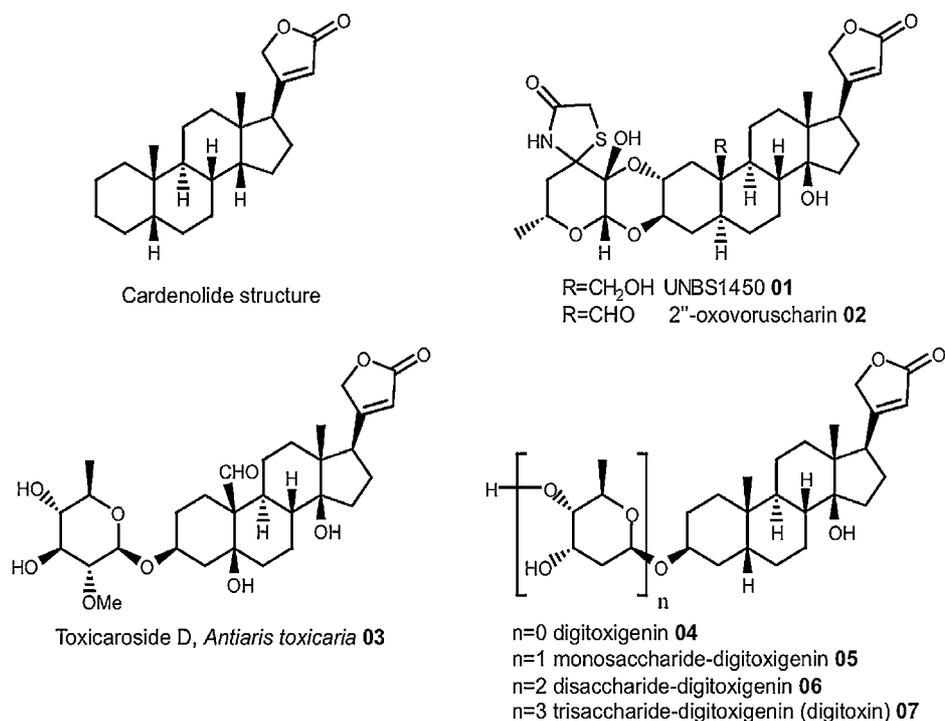


Fig. 4. Chemical structure of a small selection of natural sodium pump inhibitors and its analogues.

with a determined K_i of 3.2 nM. The $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ isozymes were also inhibited by UNBS1450 **01**, but to a lesser extent, with K_i values of 15 and 160 ± 70 nM respectively. Compared to classic cardenolides, the double-linked sugar moiety as well as the trans-conformational steroid structure seem to further potentiate the inhibitory activity of UNBS1450 **01**, rendering this cardenolide especially promising for additional anti-cancer studies based on modified cell proliferation, differentiation and cell death by inhibited sodium pump driven signaling.

According to recent findings, sodium pump signaling through UNBS1450 **01** binding leads to disorganization of the actin cytoskeleton, increased non-apoptotic cell death by autophagy, down-regulation of c-Myc in cancer cells, NF- κ B deactivation and general modifications of the nucleolar morphology.

3.2. The impact on the NF- κ B signaling pathway

As many typical cancer cell lines, A549, non-small cell lung cancer cells, show constitutive NF- κ B pathway activation, and thus become able to escape cell death by apoptosis, necrosis, autophagy, senescence, mitotic catastrophe and paraptosis [72]. NF- κ B activation favors multi-drug resistant cancer development.

Mijatovic et al. were among the very first to investigate a possible repressive potential of cardiotonic steroids and especially cardenolides on constitutive NF- κ B activation [73]. In their work they used a new hemi-synthetic derivative of 2-oxovoruscharin **02**, a compound recently identified by themselves in *C. procera* and isolated by liquid chromatography from methanolic extracts from the root barks of *C. procera*. In contrast to stereotype cardenolides, the chemically modified 2-oxovoruscharin named UNBS1450 **01** shows a double-linked sugar moiety and a trans-conformational steroid core.

As a first result, they managed to show that UNBS1450 **01** is able to influence NF- κ B activity in human A549 cells. In fact, a 24-h treatment with UNBS1450 **01** with a concentration of 10 nM was sufficient to point out induced accumulation of I- κ B β , however not of I- κ B α . For the latest, phosphorylation levels were decreased after 4–8 h post-treatment. The expression of cdc34, an enzyme implicated in I- κ B α ubiquitination, was also decreased. Further NF- κ B binding (Trans-AM) as well as NF- κ B reporter gene (luciferase reporter plasmid construct pNF- κ B-Luc) assays confirmed the *in vitro* inhibitory potential of UNBS1450 **01** on A549 tumor cells. Secondly, preliminary *in vivo* studies revealed increased survival of A549 orthotopic xenograft-bearing nude

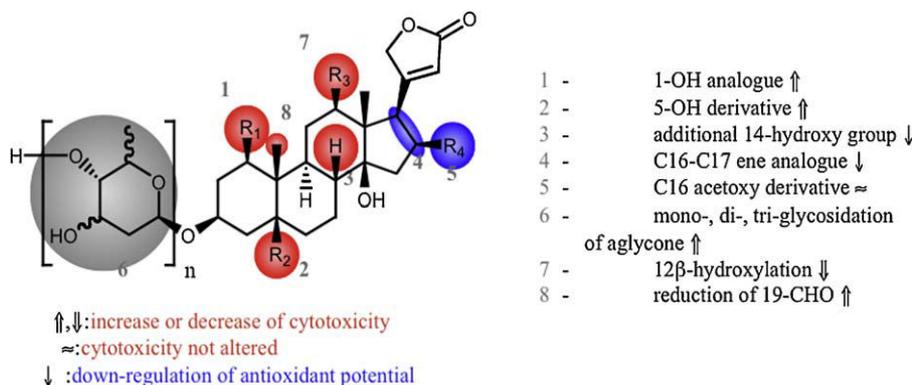


Fig. 5. SAR studies on analogues of natural sodium pump inhibitors. Summary of structure–activity relationship (SAR) results of natural sodium pump inhibitors and derivatives concerning the observed anti-cancer cytotoxicity and anti-oxidant properties. The pharmacophores identified during the studies are highlighted in colour [49,56–64].

Table 1
Main endogenous and exogenous cardenolides and their pharmaceutical activity.

Digoxin	Partial inhibition of the Na ⁺ –K ⁺ pump leading to increased intracellular Ca ²⁺ concentrations; increased contractility and metabolism in myocytes <i>in vitro</i>	Endogenous
Marinobufagenin		
19-Norbufalin		
Ouabain		
Telocinobufagin		
Bufalin	Beneficial effect in hepatocarcinoma and leukemia treatment Still in use for heart failure treatments	Exogenous
Digitalis		
UNBS1450		
	One of the first non-cardiotonic cardenolides; promising anti-cancer potentials	

mice when treated with different concentrations of the maximum tolerated dose of UNBS1450 **01**.

3.3. The effect of UNBS1450 on cell proliferation and cancer

Starting with *in vitro* anti-proliferation assays in 2005, Van Quaquebeke et al. analysed cytotoxicity levels of several cardenolides, among which UNBS1450 **01**, on 57 human cancer cell lines; for each compound average IC₅₀ values were determined by MTT assays after 72 h of incubation. As reference drugs, a tubulin inhibitor (taxol) and a topoisomerase I inhibitor (SN-38) were chosen. Concerning the individual sensitivity of each human cancer cell line, significant differences were observed between UNBS1450 **01**, taxol and SN-38 suggesting a different antitumor mechanism for UNBS1450 **01**. In terms of average growth inhibition however, UNBS1450 **01** was proven to be as potent as taxol, with a mean IC₅₀ of 2.7 nM for UNBS1450 **01** and 2.5 nM for taxol. SN-38 was significantly less potent. Furthermore, when applied on multi-drug resistant tumor bladder cells, UNBS1450 **01** showed rather astonishing capacities in inhibiting cell growth: vincristine and adriamycin resistant tumor cells forced taxol to reach concentrations of 10,000 nM to become cytotoxic whereas UNBS1450 **01** became effective at 45 nM. Complementary to these data, UNBS1450 **01** also showed cytotoxic effects on rat glioma, mouse mammary carcinoma and melanoma cells but at a far less extent when compared to UNBS1450 **01** anti-tumor effects in human cancer cells. This feature could relate to the double mutation observed in the α 1 subunit of rodent sodium pump.

More recently, the observed findings were confirmed: UNBS1450 **01** is also capable of repressing *in vitro* growth of A549 tumor cells as well as growth and migration of glioblastoma cell lines.

UNBS1450's *in vivo* anti-cancer activity has been investigated so far by tumor growth analysis in xenograft models. Generally, by administering UNBS1450 **01** chronically to nude mice bearing orthotopic xenografts of NSCLC and glioblastoma cell lines, cytotoxicity of this hemi-synthetic cardenolide has been determined by intraperitoneal or *per os* injections. In both cases, the maximum tolerated dose (MTD) had been previously elucidated acutely in healthy mice. When compared to classical cardenolides such as ouabain and digoxin as well as to its precursor, 2-oxovoruscharin **02**, UNBS1450 **01** showed significantly increased MTD values: for ouabain and digoxin, MTD values were 5 and 10 mg/kg respectively, whereas for UNBS1450 **01** the MTD value raised up to 120 mg/kg. As a result, chronic administration of UNBS1450 **01** was realized with different concentrations, from a 32- to an 8-fold reduced MTD [73]. Interestingly, UNBS1450 **01** at concentrations from 5 to 20 mg/kg was proven to be able to increase grafted mice survival. In control mice, about 20 days were sufficient to bring the mouse population down to 45%. In contrast, mice which had been

chronically administrated (12 times) with 10 mg/kg of UNBS1450 **01** showed best results, with a population down to 45% only after 40 days. Higher concentrations (20 mg/kg) seemed to be less encouraging since the outcome was less promising than for 10 mg/kg, probably due to slight toxic effects.

Comparable results were obtained for *per os* administrations of UNBS1450 **01**, nevertheless requiring higher dosages. Oral uptake of UNBS1450 **01** at 80 mg/kg significantly increased mouse survival. Whereas the 50% survival barrier was broken shortly after 20 days post-tumor graft in control mice, with 80 mg/kg of UNBS1450 **01** this point was delayed to day 40.

A principal characteristic of many cancer cells is their high invasiveness; glioblastoma cells for instance are active, “self-propelled” brain cancer cells, highly capable of invading brain tissue by shape and volume modifications [74]. Today it is believed that ion transport plays an important role in enabling cancer cell migration [75]. Until very recently, the impact of the Na⁺,K⁺-ATPase in cancer cell migration remained unexplored. In early 2008, Lefranc et al. tried to establish a link between glioblastoma cell migratory invasion, sodium pump and cardenolide administration [71]. At first, they demonstrated that in human glioblastoma cells the α 1 subunit of the Na⁺,K⁺-ATPase is overexpressed when compared to normal human brain tissue. Using immunofluorescent staining, they were able to show that α 1 subunits colocalize with caveolin-1 in the cytoplasmic protrusions of U373-MG glioblastoma cells.

Additionally, UNBS1450 **01** was able to exert a cytotoxic effect on human U373-MG cells; the same was true for rat C6 cells, but to a lesser extent. For U373-MG, concentrations of around 100 nM of both UNBS1450 **01** as well as ouabain rendered cell survival nearly impossible. For rat C9 cells, ouabain was practically ineffective whereas high concentrations reaching 10 μ M were required to completely abolish cell viability. An impact of UNBS1450 **01** on intracellular ATP concentrations in human glioblastoma cells had then been suggested. Next, computer-assisted phase-contrast microscopy analysis permitted to gain further insights in cellular proliferation, morphology and motility as well as on ion homeostasis. They discovered that in the presence of 10 nM UNBS1450 **01**, U373 cells are well capable of undergoing mitosis, but fail to divide into daughter cells and to form lamellipodia. Nevertheless, the observed, round-shaped U373 cells remained alive for several days (mitochondria staining). However, contrary to a possible hypothesis, the administration of 10 nM of UNBS1450 **01** did not result in either an increased Ca²⁺ nor an increased Na⁺ concentration, which at the same time constitutes one of the major advantages of UNBS1450 when compared to other cardiac glycosides like digitalis. Increasing intracellular Ca²⁺ favors arrhythmias in otherwise healthy people. The observed changes were probably due to irreversibly modified actin cytoskeleton, thus explaining reduced migratory capacities of these human glioblastoma cells (Fig. 6).

3.4. UNBS1450-induced cell death

3.4.1. By apoptosis

It has been reported in literature that cardiac steroid glycosides are *a priori* potentially able to induce cell death by apoptosis. For example it has been observed *in vitro* that different leukemia cell lines such as THP-1 [76], K562 [77], HL-60, U937 and ML1 [78] undergo apoptosis when treated with different concentrations of Bufalin or Digoxin. However, when treated with rather low nanomolar doses of these cardiac glycosides, it might preferentially stimulate differentiation and proliferation. It is believed that nanomolar concentrations lead to low-frequency oscillations of Ca²⁺ concentrations favoring NF- κ B activation and protection

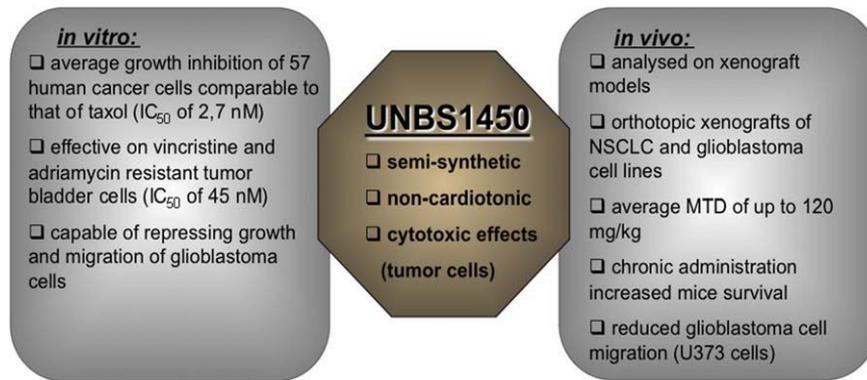


Fig. 6. *In vitro* and *in vivo* effects of UNBS1450.

against apoptosis whereas higher concentrations would lead to apoptosis due to sustained, high levels of Na^+ and Ca^{2+} [79].

In contrast to many other cardiac steroids, UNBS1450 **01** does not seem to induce cell death by apoptosis *in vitro*, at least when working with adherent cell lines (evidence provided by flow cytometry analyses after propidium iodide and Annexin V staining). To our knowledge, the entire studies on UNBS1450's anti-proliferative and anti-cancer activity has been carried out on solid tumor cell lines. UNBS1450 **01** stimulation has been shown to induce non-apoptotic cell death [71,80].

3.4.2. By autophagy

Recent studies on UNBS1450-induced cell death claim pro-autophagic effects to be responsible for the observed cytotoxic potential [71]. It has been reported that during autophagy, besides apoptosis, one of the two self-destructive processes, intracellular organelles are enclosed in characteristic double- or multi-membraned vacuoles which finally fusion with lysosomes thus leading to degradation [81]. Together with apoptosis, cellular "self-eating" has the aim to eliminate superfluous, damaged or aged cells or organelles like mitochondria and endoplasmic reticulum. Moreover, being implicated in macromolecule catabolism, autophagy helps cells in overcoming stress situations, thus avoiding probable cell death by apoptosis for instance. Depending on the

situation, autophagy sometimes constitutes an alternative pathway to apoptosis, sometimes a possibility to escape apoptosis.

In 2006, first studies indicating UNBS1450-induced autophagy in cancer cells appeared [80]. Working on NSCLC cell lines, cell death was indeed relevant after treatments with UNBS1450 **01**: a 24 h treatment with 100 nM of UNBS1450 reduced cell viability to about 70%, when prolonged to 72 h, 10 nM were sufficient to obtain similar results. Consequently, PARP cleavage analysis permitted to exclude cell death through apoptosis, as PARP remained intact. Complementary performed TUNEL assays ultimately confirmed the absence of apoptotic cell death. Cell cycle analysis revealed increased percentages of cells in S and G₂ phases whereas microscopy images clearly showed severe cytoplasmic vacuole formation. Further Mijatovic et al. made clear that UNBS1450 **01** induces Hsp70 downregulation thus rendering possible lysosomal membrane permeabilization, typically inhibited in lung cancer cells by heightened levels of Hsp70 which constitute a prosurvival function. Lysosomal permeabilization is a known indicator of cell death through autophagy; these findings of 2006 then strengthened the hypothesis of non-apoptotic cell death by "self-eating" in UNBS1450 treated cancer cells.

In the same context UNBS1450 **01** has been assigned to induced cell death through autophagy in different human glioblastoma cell lines [71]. In a first step, acridine orange

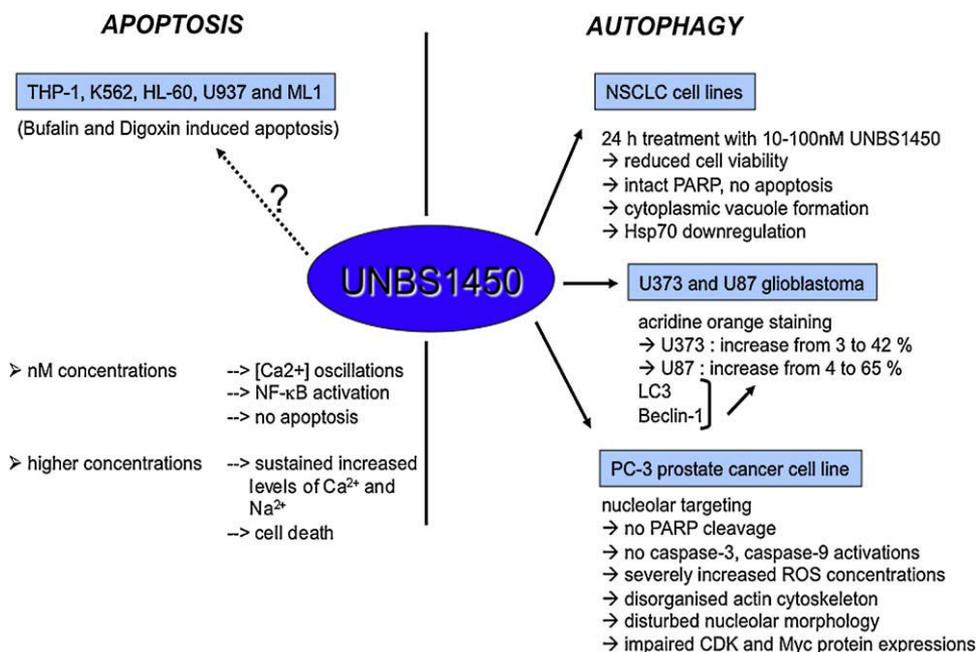


Fig. 7. Apoptosis and autophagy-related cell death induced by UNBS1450.

staining was used in order to quantify acidic vesicular organelles whose abundance is tightly associated to autophagy. Indeed, the presence of nanomolar UNBS1450 **01** significantly increased staining in U373-MG and U87-MG cells (from 3 to 42 and from 4 to 65%). At the same time, the expressions of LC3 and beclin-1, two specific autophagy markers, were found to be stimulated by UNBS1450 **01**.

Besides lung cancer and glioblastoma cell lines, UNBS1450 **01** has also been found to induce probably autophagy-related cell death in human prostate cancer cell lines by severe nucleolar targeting [82]. In fact, UNBS1450 **01** efficiently inhibited apoptosis-resistant PC-3 prostate cancer cell growth at 100 nM, without caspase-3 and caspase-9 activation and PARP cleavage. Intracellular Ca^{2+} concentrations were not modified, in contrast to cellular ROS load. Not only did UNBS1450 **01** (10 and 100 nM) severely increase ROS production, computer-assisted phase-contrast microscopy revealed that it again completely disorganized the actin cytoskeleton as seen before and disturbs nucleolar morphology. The nucleolus domain constitutes the site of ribosome biogenesis and is thus indispensable to cell survival. It has been reported that nucleolar regions are of great importance in cancer cells as it has been proven that tumor cells retain tumor suppressors, like p53 and MYC for instance, inside the nucleoli. The observed impairments of CDK and Myc protein expressions might thus be mechanisms of nucleolar disorganization and induced autophagy (Fig. 7).

4. Conclusion

Taken together, these results suggest that the novel hemisynthetic cardenolide UNBS1450 **01** from *C. procera* is able to repress cancer cell proliferation and even induce cell death. Despite the fact that the plant's beneficial effects on many different pathologies have been admitted many centuries ago, the real breakthrough is still to come. Both, the entire latex as well as organic extracts, might well have proven their usefulness in treating different clinical entities, only recent advances in research revealed the true potential lying within *C. procera*. By chemically modifying a novel cardenolide isolated from this tropical plant, researchers discovered with UNBS1450 **01** a new and very promising weapon in cancer therapy.

In contrast to many other anti-cancer agents, UNBS1450 **01** does not induce apoptosis but autophagy, at least in solid tumor cells. Essentially by deactivating NF- κ B, down-regulating Hsp70 and by modifying nucleolar structure, UNBS1450 **01** leads to vacuole formation, actin cytoskeleton impairment and finally cell death.

Further insights, particularly concerning its usefulness in leukemia treatment, still remain to be investigated.

Acknowledgements

The authors thank C. Cerella and M.H. Teiten for critical reading. T.J. is a recipient of an Aide à la Formation-Recherche (AFR) fellowship and M.S. is a recipient of a Télévie fellowship. Dr. Diederich's 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 Häerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action Lions "Vaincre le Cancer" association and by Télévie Luxembourg.

References

[1] Shu YZ. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod* 1998;61:1053–71.

[2] Sharma P, Sharma JD. Evaluation of in vitro schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera*—an ethnobotanical approach. *J Ethnopharmacol* 1999;68:83–95.

[3] Dewan S, Sangraula H, Kumar VL. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. *J Ethnopharmacol* 2000;73:307–11.

[4] Kumar S, Dewan S, Sangraula H, Kumar VL. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *J Ethnopharmacol* 2001;76:115–8.

[5] Kumar VL, Shivkar YM. In vivo and in vitro effect of latex of *Calotropis procera* on gastrointestinal smooth muscles. *J Ethnopharmacol* 2004;93:377–9.

[6] Yeang HY, Arif SA, Yusof F, Sunderasan E. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* 2002;27:32–45.

[7] Azarkan M, Amrani A, Nijs M, Vandermeers A, Zerhouni S, Smolders N, et al. Carica papaya latex is a rich source of a class II chitinase. *Phytochemistry* 1997;46:1319–25.

[8] Nallamsetty S, Kundu S, Jagannadham MV. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. *J Protein Chem* 2003;22:1–13.

[9] Soares PM, Lima SR, Matos SG, Andrade MM, Patrocínio MC, de Freitas CD, et al. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. *J Ethnopharmacol* 2005;99:125–9.

[10] Freitas CD, Oliveira JS, Miranda MR, Macedo NM, Sales MP, Villas-Boas LA, et al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiol Biochem* 2007;45:781–9.

[11] Ramos MV, Bandeira Gde P, de Freitas CD, Nogueira NA, Alencar NM, de Sousa PA, et al. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:503–10.

[12] Sangraula HDS, Kumar VL. Evaluation of anti-inflammatory activity of latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. *Inflammopharmacology* 2001;9:257–64.

[13] Arya S, Kumar VL. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediators Inflamm* 2005;2005:228–32.

[14] Roy S, Sehgal R, Padhy BM, Kumar VL. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol* 2005;102:470–3.

[15] Shivkar YM, Kumar VL. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. *Mediators Inflamm* 2003;12:299–302.

[16] Choedon T, Mathan G, Arya S, Kumar VL, Kumar V. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12:2517–22.

[17] Grout D, Curtis R, Hassall C, Jones T. Cardiac glycosides of *Calotropis procera*. *Tetrahedron* 1962;26:1281–5.

[18] Seiber J, Nelson C, Lee S. Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 1982;21:2343–8.

[19] Saber A, Hifney, Maharan G, Rizkallah M. Sterols and pentacyclic triterpenes of *Calotropis procera*. In: Bulletin of the Faculty of Pharmacy, vol. 7. Cairo University; 1969. p. 91–104.

[20] Saxena V, Saxena Y. Isolation and study of triterpenoids from *Calotropis procera*. *J Res Indian Med Yoga Homeopathy* 1979;14:152–4.

[21] Tiwari K, Masood M, Rathore S, Minocha P. Study of anthocyanins from the flowers of some medicinal plants. *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika* 1978; 21:177–8.

[22] Carruthers I, Griffiths D, Home V, Williams L. Hydrocarbons from *Calotropis procera* in northern Australia. *Biomass* 1984;4:275–82.

[23] Malik N, Chughtai M. Antimicrobial activity of *Calotropis procera*. A preliminary study. *Pakistan J Sci* 1979;31:127–9.

[24] Nandal S, Bhatti D. Preliminary screening of some weeds and shrubs for their nematocidal activity against *Meloidogyne javanica*. *Indian J Nematol* 1983;13: 123–7.

[25] Masood A, Haq S, Anjum S, Saxena S. Further studies on the effect of some plant extracts on the mortality of *Meloidogyne incognita*. *J Sci Res Plants Med* 1980;1:18–22.

[26] Girdhar G, Deval K, Mittal P, Vasudevan P. Mosquito control by *Calotropis* latex. *Pesticides* 1984;18:82–7.

[27] Prakash A, Gupta R, Mathur R. Effect of oral administration of forty two indigenous plants extracts on early and late pregnancy in albino rats. *Probe* 1978;27:315–23.

[28] Dhar M, Dhar M, Dhawan B, Mehrotra M, Roy C. Screening of Indian plants for biological activity: part I. *Indian J Exp Biol* 1968;6:231–47.

[29] Ayoub S, Kingston D. Screening of plants used in Sudan folk medicine for anticancer activity. *Fitoterapia* 1981;52:281–4.

[30] Fenado MRWS, Thabre MI, Karunayaka EH. *J Ethnopharmacol* 1989;7.

[31] Asuzu IU, Onu OU. Anthelmintic activity of the ethanolic extract of *Piliostigma thonningii* bark in *Ascaridia galli* infected chickens. *Fitoterapia* 1994;65:291–7.

[32] Mishra PPN, Guru PY, Katiyar JC, Tandon JS. Antimalarial activity of traditional plants against erythrocytic stages of *P. berghei*. *Int J Pharmacognosy* 1991;29: 19–23.

[33] Mascolo N, Sharma R, Jain SC, Capasso F. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. *J Ethnopharmacol* 1988;22:211–21.

[34] Ang HH, Chan KL, Mak JW. In vitro antimalarial activity of quassinoids from *Eurycoma longifolia* against Malaysian chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates. *Planta Med* 1995;61:177–8.

[35] Iqbal Z, Lateef M, Jabbar A, Muhammad G, Khan MN. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *J Ethnopharmacol* 2005;102: 256–61.

- [36] Moursy LE. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. J Egypt Soc Parasitol 1997;27:505–14.
- [37] Ansari SH, Ali M. Norditerpenic ester and pentacyclic triterpenoids from root bark of *Calotropis procera* (Ait) R. Br Pharmazie 2001;56:175–7.
- [38] Gallegos Olea RS, Oliveira AV, Silveira LM, Silveira ER. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. Fitoterapia 2002;73:263–5.
- [39] Brady C. Fruit ripening. Annu Rev Plant Physiol 1985;38:155–78.
- [40] Kembhavi AA, Buttle DJ, Knight CG, Barrett AJ. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. Arch Biochem Biophys 1993;303:208–13.
- [41] Rudenskaya GN, Bogacheva AM, Preusser A, Kuznetsova AV, Dunaevsky Ya E, Golovkin BN, et al. Taraxalisin—a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l. FEBS Lett 1998;437:237–40.
- [42] Dubey VK, Jagannadham MV. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. Phytochemistry 2003;62:1057–71.
- [43] Boller T. Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In: Dalling M, editor. Plant Proteolytic Enzymes. CRC Press; 1986. p. 68–96.
- [44] Abraham KI, Joshi PN. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. I. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate. Biochim Biophys Acta 1979;568:111–9.
- [45] Hounsell E, Davies M, Smith K. Chemical methods of analysis of glycoproteins. In: Walker J, editor. The Protein Protocols Handbook. Humana Press; 2002. p. 803–4.
- [46] Ellman L. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 1959;82:70–7.
- [47] Watt J, Breyer-Brandwijk M. Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. E. & S. Livingstone; 1962.
- [48] Erdman MD. Nutrient and cardenolide composition of unextracted and solvent-extracted *Calotropis procera*. J Agric Food Chem 1983;31:509–13.
- [49] Van Quaquebeke E, Simon G, Andre A, Dewelle J, El Yazidi M, Bruyneel F, et al. Identification of a novel cardenolide (2'-oxovorucharin) 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;48:849–56.
- [50] 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;68:164–73.
- [51] Horisberger JD. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. Physiology (Bethesda) 2004;19:377–87.
- [52] Faller LD. Mechanistic studies of sodium pump. Arch Biochem Biophys 2008;476:12–21.
- [53] Erdmann E, Schoner W. Ouabain-receptor interactions in (Na⁺K⁺)-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. Biochim Biophys Acta 1973;307:386–98.
- [54] Keller M, Pignier C, Egger M, Niggli E. F90927: a new member in the class of cardioactive steroids. Cardiovasc Drug Rev 2007;25:210–20.
- [55] Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. Mol Interv 2003;3:157–68.
- [56] Jiang MM, Dai Y, Gao H, Zhang X, Wang GH, He JY, et al. Cardenolides from *Antiaris toxicaria* as potent selective Nur77 modulators. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2008;56:1005–8.
- [57] Ueda JY, Tezuka Y, Banskota AH, Tran QL, Tran QK, Saiki I, et al. Antiproliferative activity of cardenolides isolated from *Streptocaulon juvenas*. Biol Pharm Bull 2003;26:1431–5.
- [58] Zhao M, Bai L, Wang L, Toki A, Hasegawa T, Kikuchi M, et al. Bioactive cardenolides from the stems and twigs of *Nerium oleander*. J Nat Prod 2007;70:1098–103.
- [59] Zhou M, O'Doherty G. The de novo synthesis of oligosaccharides: application to the medicinal chemistry SAR-study of digitoxin. Curr Top Med Chem 2008;8:114–25.
- [60] Lopez-Lazaro M, Pastor N, Azrak SS, Ayuso MJ, Austin CA, Cortes F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. J Nat Prod 2005;68:1642–5.
- [61] Langenhan JM, Peters NR, Guzei IA, Hoffmann FM, Thorson JS. Enhancing the anticancer properties of cardiac glycosides by neoglycorandomization. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:12305–10.
- [62] Neumann W. Über Glykoside des Oleanders. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1937;70:1547–54.
- [63] St Janiak P, Weiss E, Reichstein T. "Alpha"-,"beta"- and "delta"-anhydrodigitoxigenin. Helv Chim Acta 1967;50:1249–66.
- [64] Abe F, Yamauchi T, Shibuya H, Kitagawa I. Triterpenoid glycosides from bark of *Meliosma lanceolata*. Phytochemistry 1996;42:809–14.
- [65] 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;293:C509–36.
- [66] Xie Z, Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem 2002;269:2434–9.
- [67] Stenkvist B. Cardenolides and cancer. Anticancer Drugs 2001;12:635–8.
- [68] McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. Cancer Res 2000;60:3807–12.
- [69] Haux J, Solheim O, Isaksen T, Angelsen A. Digitoxin, in non-toxic concentrations, inhibits proliferation and induces cell death in prostate cancer cell lines. Zeitgenössische Onkologie 2000;32:11–6.
- [70] 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;212:170–9.
- [71] 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;62:211–21 [discussion 21–2].
- [72] Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nat Rev Cancer 2004;4:592–603.
- [73] 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;5:391–9.
- [74] Sontheimer H. Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. Trends Neurosci 2003;26:543–9.
- [75] Ransom CB, O'Neal JT, Sontheimer H. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. J Neurosci 2001;21:7674–83.
- [76] Kurosawa M, Tani Y, Nishimura S, Numazawa S, Yoshida T. Distinct PKC isozymes regulate bufalin-induced differentiation and apoptosis in human monocytic cells. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280:C459–64.
- [77] Numazawa S, Honma Y, Yamamoto T, Yoshida T, Kuroiwa Y. A cardiotonic steroid bufalin-like factor in human plasma induces leukemia cell differentiation. Leuk Res 1995;19:945–53.
- [78] Zhang S, Malmersjö S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlen P, et al. Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. J Biol Chem 2006;281:21954–62.
- [79] Aizman O, Uhlen P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:13420–4.
- [80] 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;8:402–12.
- [81] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: cross-talk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:741–52.
- [82] 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;7:1285–96.

Title : **Natural compounds as inflammation inhibitors**

Editorial to “Inflammation 2010”

Authors : Marc Schumacher, Tom Juncker, Michael Schnekenburger, François Gaascht
and Marc Diederich

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer
et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg

Address correspondence to : Dr. Marc Diederich, Laboratoire de Biologie Moléculaire et
Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg,
Luxembourg. Tel : +352-2468-4040 ; Fax : +352-2468-4060 ; E-mail address :

marc.diederich@lbmcc.lu

Since 1998, Dr. Marc Diederich and his research team successfully managed eight cell signaling meetings in Luxembourg attracting more than 5500 scientists. In January 2010, over 550 scientists and exhibitors came together for the last meeting, which was held from January 27th – 30th. Invited and selected talks followed the keynote session from Dr. Jurg Tschopp (Department of Biochemistry, Switzerland), and more than 210 posters reported recent research results in cell signaling, cancer, inflammation, apoptosis and innate immunity. This editorial aims at giving insight into natural compounds related research covered by the meeting.

Known in traditional medicines for several centuries, nature remains a potent source of drugs for the treatment of a large variety of diseases. More than 70 percent of today's anti-cancer drugs originate from natural compounds or are synthetic derivatives of natural compounds. High-throughput screening of synthetic libraries gained raising importance during the last 15 years, however, the research on natural products as promising drug candidates is kept actually at a high level.

Recent published data report that innate immunity operates as a complex system to sense and differentiate danger signals from non-danger inputs. Though, the immune system will respond to infection or injury, however it will remain inactive in case of harmless compounds, food antigens or microscopes of the gut flora. A deregulated chronic inflammation might lead in some cases to hay fever, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis. Furthermore, the link between inflammation and cancer, discovered by Virchow in the 19th century, has been confirmed by a large number of groups. In 20 percent of all cases, inflammation is a direct cause of cancer, and in 65 percent of malignancies, the diseases has been caused by obesity, other dietary factors, tobacco smoke and inhaled pollutants indirectly related to inflammation. The effect of inflammation on human health led to increased interest in research in this area.

Interestingly, the keynote session of the meeting reviewed the importance of inflammasomes as guardians of human body presented by Pr Jurg Tschopp (Department of Biochemistry, Switzerland) of the University of Lausanne. The inflammasome is a complex composed of caspase 1, PYCARD, NALP; its exact composition depends on the activator involved and is triggered by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), danger-associated molecular patterns (DAMPs), and crystalline substances. Upon activation, ROS

mediated inflammasome complex formation leads to secretion of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) or IL-18. Inflammasome-dependent activity results to pyroptosis, a highly inflammatory form of cell death. Several human diseases are associated with activation of inflammasomes: auto-inflammatory diseases such as Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (CAPS), Gout. It has been reported recently that high extracellular glucose triggers IL-1 β secretion via the NLRP3 inflammasome and the NLRP3-binding protein, TXNIP plays a role in Type II Diabetes is triggered. This mentioned research findings of the inflammasome pathway linked to inflammatory diseases might lead to better treatment of the latter, as it more advantageous to inhibit a deregulated signaling cascade at a up-stream position. Clinical trials evaluate the injection of Anakinra (brand name Kineret), a recombinant form of the naturally occurring antagonist, IL-1RA, for the treatment of Gout, CAPS, Type II diabetes and rheumatoid arthritis.

Interestingly, a considerable number of talks reported the implicit use of natural compounds and synthetic derivatives for the treatment of inflammatory diseases. Dr. Ajay Goel (Baylor University Medical Center, USA) raised the attention to the fact that besides genetics, the field of epigenetic gene regulation recently emerged as one of the key driving factors in chronic inflammatory diseases. Goel discussed the regulatory mechanisms that control the expression of various major inflammatory genes and how diet/natural compounds could influence this regulation. Since epigenetic regulatory mechanisms are potentially reversible, this field gains further interest especially related to the re-exploration of anti-inflammatory bioactive food compounds for their properties as potential epigenetic modulators/inhibitors, by targeting the enzymatic activities of chromatin modifier proteins belonging to the DNA methyl transferase (DNMT), histone deacetylase (HDAC), and histone acetyl transferase (HAT) families. To date, a very limited body of experimental evidence addresses molecular mechanisms involved in diet-induced epigenetic alterations in in-vitro or pre-clinical studies. Therefore, it is only the beginning of the investigation of epigenetic mechanisms and their modulation by dietary agents in inflammation related disorders, which provides an exciting opportunity for the development of potential new therapeutic approaches for treatment as well as for prevention of many diseases. In light of this, it is very encouraging to witness the promise of dietary agents as modulators of epigenetic mechanisms. Most epigenetic modulators described belong to the polyphenol family, and for some of those dietary agents, they are already known for other properties; curcumin, epigallocatechin gallate (EGCG) apparently act as HAT inhibitors, DNMT1 inhibitors as well as miRNA modulators.

Genestein, acetyl-keto-beta boswellic acid (AKBA) and as well as caffeic acid, were described as DNMT1 inhibitors. Finally, it was mentioned anarcadic acid and garcinol as potent HAT inhibitors, genestein and sulforaphanes as HDAC inhibitors, and resveratrol as a sirtuin (Sirt 1) activator.

NF- κ B (NF-kappaB) is a key transcription factor associated to inflammatory diseases. Pr. Young-Joon Surh (Research Institute of Pharmaceutical Sciences, South Korea) reported the crosstalk between the transcription factor NF- κ B and redox sensitive transcription factors. In detail, the nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) activates antioxidant enzymes *via* binding to antioxidant responsive element (ARE), which strengthen cellular anti-oxidant potential. Therefore Nrf2 is a key target gene for inflammatory disorders. Many phytochemicals, such as the organosulfur compound Sulforaphane, the polyphenol Curcumin and the sesquiterpene Zerumbone exerted anti-oxidant antioxidant gene expression, by oxidation or covalent modification of thiol groups associated to the presented transcription factors and in this way maintain cellular homeostasis. Though, these mentioned molecules play a crucial role in chemoprevention and cytoprotection.

Nicotine and muscarine, natural products isolated of the tobacco plant and mushrooms respectively, despite their known toxic to human health, are known to affect the inflammatory pathway. Dr Wouter de Jonge (Academic Medical Center, Amsterdam) reported the effect of especially nicotinic agonists and their stimulation on the *vagus* nerve, which down-regulate pro-inflammatory cytokine production and modulates JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways. Future studies have to elucidate the inhibition of the NF- κ B pathway via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (α 7nAChR) agonists while circumventing their neurotoxicity.

New therapies for the treatment of cystic fibrosis patients are emerging during the last years. Pr. Roberto Gambari (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Italy) reported the extraction of two natural products citropten and bergapten from bergamot, which expressed a high inhibition potential against the expression of IL-8; NF- κ B plays a key role in IL-8 expression. Furthermore, the investigation of a furocoumarin database led to the discovery of furo(3,2-c)chromen-4-one derivative, which could be a potential pharmaceutical drug to control lung inflammation in CF patients.

Pr. Bharat Aggarwal (Department of Experimental Therapeutics, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA) assessed the impact of major risk factors, such as chronic infections, obesity, alcohol, tobacco, radiation and pollutants, leading to the development of the most common types of cancer. NF- κ B and STAT3, two inflammation pathways, are constitutively activated in most cancers and therefore play a crucial role for the development of most cancers. The potential of phytochemicals extracted from traditional Indian and Chinese medicine, like Berberine, Curcumin and Celastrol, for cancer prevention and therapy were discussed.

As one of the most common cancer worldwide with still increasing incident rates, skin cancer requires particular attention and accurate treatments. The signal transduction pathways triggered by the epidermal growth factor receptor (EGFR), protein kinase C (PKC), the mitogen activated protein (MAP) kinases c-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2, p38, extracellular regulated kinase (ERK)1/2 and cyclooxygenase (COX)-2 are activated by exposure of the skin to ultraviolet (UV) A and B irradiation. Inhibition of these signals by natural products should decrease skin carcinogenesis. Pr Zigang Dong and collaborators (Hormel Institute, Austin, MN, USA) was the first to elucidate the effect of dietary compounds on specific cell signaling pathways and discovered a series of chemopreventive agents such as EGCG from green tea, myricetin, quercetin, 5-deoxykaempferol, 6-gingerol and resveratrol, all isolated from fruits and vegetables, which are able to prevent skin carcinogenesis. Fewer secondary effects should result from the natural origin from these drugs in contrast to synthetic therapeutic agents.

Radiotherapy is a pre-operative treatment for patients with a variety of cancer. However, the pathological response level to this therapy is low as pro-survival pathways are activated after radiation by a large percentage of resistant tumor cells. For this reason, Krishnan and co-workers (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) developed a method to sensitize resistant colorectal cancer cells to radiation therapy. As previously reported, the inducible signaling pathway NF- κ B protects cells from cell death *via* up-regulation of pro-survival genes. The research team used curcumin, the well-known, non-toxic and widely used polyphenol from the rhizome of the plant *Curcuma longa*, to increase the efficiency of radiation therapy. Curcumin down-regulated the radiation-induced phosphorylation and degradation of inhibitor of kappa B kinase (IKK); in addition, NF- κ B regulated genes (Bcl-2, Bcl-xL, inhibitor of apoptosis (IAP)-2, COX-2, and cyclin D1) were

inhibited. Furthermore, this molecule attenuates in parallel side effects including fatigue associated with radiotherapy. These results led to the identification of Curcumin as a radiosensitizer in colorectal cancer. Very recently, the team of Krishnan reported that the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) exerted a similar sensitization activity compared to Curcumin.

A persistent gathering of mature resting B cells in the peripheral blood, bone marrow and lymphatic tissue is one characteristic of Chronic lymphocytic leukaemia (CLL). This accumulation is a result of aberrant apoptosis and not due to increased proliferation. Pr. Varsha Gandhi (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) reported about BCL2 antagonists, including the polyphenol gossypol and its analogue AT-101 derived from the cotton plant, which targets pro-survival proteins. In fact, these compounds displace Bim from Bcl2's BH3-binding pocket, and then Bim activates BAX, which induces mitochondrial permeabilization and finally leads to cancer cell death.

Flavonoids from plants, have been reported to exert anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*. They have an impact on the pro-inflammatory gene expression, like cyclooxygenase-2, Nitric oxide synthase and pivotal cytokine. Pr. De-Xing Hou (Department of Biochemical Science and Technology, Japan) reported the effect of flavonoids on protein kinases which can bind directly to protein kinases or inhibit the phosphorylation of the protein kinases JAK1, Akt, MEK1, Fyn, MKK4, ZAP-70 and PI3K. It is noteworthy that Akt, PI3K and ZAP-70 act upstream of the NF- κ B pathway. As protein kinases act on a wide range of intracellular signaling pathways, it is not surprising that flavonoids are reported to exert an impact on multiple bio-molecular functions, which will be elucidated in future by the authors.

In vine, resveratrol is produced in large quantity as a response to biotic or a-biotic stress; this secondary metabolite activates plant defense mechanisms by anti-oxidative protection and inhibition of fungi infection. Pr Norbert Latruffe (Laboratory of Biochemistry of Metabolism and Nutrition, INSERM, Dijon, France) investigated the different pathways affected by resveratrol. The latter modulates a large variety of signaling mechanisms, exerts anti-oxidant potential, is a radical scavenger molecule; this polyphenol inhibits the NF- κ B as well as the COX-2 pathway. The secretion of IL-6 and IL-8 is down-regulated and it blocks cells in the G2/M phase. Recently the author published a structure-activity relationship study

about 14 different resveratrol analogues; it concludes that the trimethoxy-derivative of (Z)-resveratrol exerts the highest bioactivity.

Marine organisms produce secondary metabolites as an innate defense. Dr. Marc Schumacher (Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg) reported the isolation and bioactivity determination of a variety of natural products isolated from marine sponges and bacteria. The most active compound, the sesterterpene Heteronemin inhibited proteasome activity at nanomolar concentrations. Furthermore, this product induced apoptotic cell death to the resistant cancer cell line K562 and the NF- κ B pathway was downregulated. Future research will be carried on natural and synthetic derivatives of this terpene.

Rheumatoid arthritis is a severe autoimmune disease resulting in articulation inflammation and bone lesions. With regards to its impressive incident rates, there is a huge need for new, additional therapeutic agents. Dr. Veera R. Konda (KinDex Therapeutics, USA) described a mixture of synthetic substituted cyclopentadiones, named META060, The latter have a US GRAS status as bittering additives in beer. Apart of the NF- κ B pathway inhibition, this mixture blocks the kinases SyK, BTK, GSK3 β and PI3K Bioactivity tests show that this mixture is able to inhibit inflammation in arthritis mice models. These results suggest that these molecules might act as an efficient and safe therapeutics for the treatment of chronic inflammation.

As a conclusion, multiple presentations surveyed the role of inflammation in cancer and other diseases. There exist a large network of different signaling pathways involved in inflammation processes; hence, it is noteworthy more than 10 oral presentation reported the tight link between the NF- κ B pathway and inflammation. So the NF- κ B pathway remains one key role player for the development of novel therapeutics for the treatment of diseases based on inflammation. Interestingly, natural compounds especially from dietary origins underline the increasing impact of this research area.

Acknowledgments

We would like to thank “Recherches Scientifiques Luxembourg asbl” who organized the meeting. We thank the “City of Luxembourg”, “Enzo” “Axxora”, the “Fondation de

Recherche Cancer et Sang”, “Een Haerz fir kriibskrank Kanner asbl”, “Kuwait Petroleum” and “Computer Home, Luxembourg” for additional support.

Finally all members of the organization team are thanked for their great organization.

Next meetings

Integrated cellular pathology - Systems biology of human disease

January 26 - 29, 2011

Natural compounds - Regulators of cell signaling pathways and novel therapeutic tools

January 25 - 28, 2012

Meeting information: <http://www.transduction-meeting.lu>

RESUME

Les stéroïdes cardiaques sont utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies, y compris des insuffisances cardiaques et de cancer. Le but de ce travail était d'étudier l'activité anti-leucémique de UNBS1450, un cardénolide semi-synthétique appartenant à la famille des glycosides stéroïdes cardiaques, et qui a été démontré d'avoir un puissant potentiel inducteur d'autophagie dans les cellules cancéreuses issue de tumeurs solides. Par cette étude, nous démontrons pour la première fois que des concentrations nanomolaires de UNBS1450 exercent un effet pro-apoptotique sur des cellules leucémiques humaines. Par conséquent, nous avons élucidé les mécanismes moléculaires impliqués : nos résultats mettent en évidence une inhibition de la transactivation de NF- κ B et une induction de l'apoptose par clivages des pro-caspases 8,9 et 3/7, en réprimant l'expression de Mcl-1 anti-apoptotique et recrutant Bak et Bax, deux protéines pro-apoptotiques, aboutissant ainsi à une mort cellulaire apoptotique.

MOTS CLES

UNBS1450, NF- κ B, apoptose, cardénolide, cancer

ABSTRACT

Cardiac steroids are used to treat various diseases including congestive heart failure and cancer. The aim of this study was to investigate the anti-leukemic activity of UNBS1450, a hemi-synthetic cardenolide belonging to the cardiac steroid glycoside family, known to be a potent autophagy inducer in solid tumor cells. Interestingly, we hereby report for the first time that at low nanomolar concentrations, UNBS1450 induces apoptotic cell death in human leukemia cell lines. Subsequently, we have investigated the molecular mechanisms induced : Our results show that UNBS1450 inhibits NF- κ B transactivation and triggers apoptosis by cleavage of pro-caspases 8, 9 and 3/7, by decreasing the expression of anti-apoptotic Mcl-1 and by recruiting pro-apoptotic Bak and Bax eventually resulting in cell death.

KEYWORDS

UNBS1450; NF- κ B; apoptosis; cardenolide; cancer