



HAL
open science

Inhibition des phosphatases CDC 25 dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse: étude mécanistique de nouveaux inhibiteurs

Émilie Bana

► To cite this version:

Émilie Bana. Inhibition des phosphatases CDC 25 dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse: étude mécanistique de nouveaux inhibiteurs. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0105 . tel-01750092

HAL Id: tel-01750092

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750092v1>

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>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Emilie BANA**

Inhibition des phosphatases CDC25 dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse : étude mécanistique de nouveaux inhibiteurs

Le 9 juillet 2013

Composition du jury :

Rapporteurs :

M^{me} Christiane GARBAY

Professeur, Université Paris Descartes, UFR Bio Médicale UMR-8601 – Laboratoire de Chimie et Biochimie Toxicologique et Pharmacologique, Paris.

M^{me} Nadine MARTINET

Directeur de recherche INSERM, Université Nice Sophia Antipolis, LCMBU UMR CNRS 6001, Nice.

Examineurs :

M^f Gilbert KIRSCH

Professeur, Université de Lorraine – Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Metz.

M^f Alexandre FIFRE

Maître de conférences, Université Paris Est Créteil Val de Marne – Institut Supérieur des Biosciences de Paris, Créteil.

M^{me} Denyse BAGREL

Professeur, Université de Lorraine - laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Metz. **Directeur de thèse**

M^f Marc DIEDERICH

Professeur, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg. **Co-directeur de thèse**

Membres invités :

M^f Patrick CHAIMBAULT

Professeur, Université de Lorraine – Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Metz.

M^{me} Claudia CERELLA

Docteur, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg.

UMR 7565, SRSMC - Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine, 54506 Vandœuvre les Nancy

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital du Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L2540, Luxembourg, LUXEMBOURG

Ce travail de doctorat a été réalisé sous la direction des **Professeurs Denyse BAGREL et Marc DIEDERICH**, au sein du **laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique** (récemment réorganisé au sein du Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires de l'Université de Lorraine); et du **Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer** (Luxembourg).

Je tiens à remercier le **Fonds National pour la Recherche du Luxembourg** (FNR) qui m'a permis de mener à bien ces travaux de doctorat au travers d'une **bourse d'Aide à la Fondation Recherche**. Je remercie aussi le FNR pour la **Bourse d'Aide à la Mobilité** qui m'a permis de présenter ces travaux de recherche dans un congrès international.

Enfin, je remercie l'ensemble des organismes soutenant financièrement les deux laboratoires : la **Ligue Contre le Cancer**, le **Conseil Général de Moselle**, la **Région Lorraine**, la **Fondation Recherche Cancer et Sang**, les associations **Recherches Scientifiques Luxembourg**, *Een Haerz fir kriibskrank Kanner*, **Action Lions "Vaincre le Cancer"**, ainsi que **Télévie de Luxembourg**.

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements aux professeurs Denyse Bagrel, Marc Diederich et Gilbert Kirsch pour m'avoir permis de mener à bien ce projet de doctorat, pour leurs conseils précieux ainsi que pour nos discussions scientifiques fructueuses. Je tiens à remercier plus particulièrement le P^r Bagrel pour sa bienveillance ses qualités humaines et ses encouragements qui m'ont permis d'aller toujours plus loin dans mes travaux de recherche. A chaque fois que j'ai douté de l'aboutissement de ce projet, vous avez su réveiller ma motivation, merci pour ce très bel exemple de persévérance.

Je remercie les professeurs Christiane Garbay et Nadine Martinet de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs et membres du jury qui évaluera ce travail. Je remercie aussi le P^r Gilbert Kirsch et le D^r Alexandre Fifre d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse, ainsi que le P^r Patrick Chaimbault et le D^r Claudia Cerella pour leur présence en tant que membres invités du jury.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble de mes collègues du LIMBP : doctorants, stagiaires, maître de conférences, qui ont fait de ces années de thèse un moment agréable et enrichissant. Merci à Elodie pour son aide précieuse dans mes débuts, Adeline pour ses conseils indispensables en cytométrie, Stéphanie pour son soutien quotidien, sa patience et sa bonne humeur, Hervé pour nos longues discussions, Eric pour sa gentillesse et son aide pour les enseignements et enfin Hélène, Aline, Sophie et Tzvete pour leur gentillesse et leur sourire permanent qui a très largement contribué à la bonne ambiance du laboratoire. Merci à mes collègues chimistes Estelle, Sergio, Zhanjie et Oualid pour leur aide et nos fructueuses collaborations.

Je remercie l'ensemble de mes collègues du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer pour leur accueil et leur aide. Merci à Claudia pour la qualité de nos discussions scientifiques, à Cindy pour son aide et sa bonne humeur ainsi qu'à tous ceux que j'ai côtoyés quotidiennement au laboratoire.

Enfin je tiens à remercier mes proches qui m'ont portée et supportée pendant toute cette thèse, et sans qui je n'aurais pas eu la force d'aller jusqu'au bout. J'adresse mes pensées les plus affectueuses à Guillaume pour notre merveilleuse rencontre et à ma mère pour avoir toujours cru en ma réussite.

Liste des publications et communications

Publications internationales avec comité de lecture

Valente S[#], Xu Z[#], **Bana E**, Zwergel C, Mai A, Jacob C, Meiser P, Bagrel D, Silva A M S, Kirsch G. **4-Vinyl-2H-1-benzopyran-2-one reactivity as [4+2] thermal Diels-Alder cyclo addition: Access to novel coumarin-based polycycles with CDC25 phosphatases inhibiting activity.** *European Journal of Organic Chemistry*. May 2013, 14: 2869–2877

Sibille E, **Bana E**, Chaouni W, Diederich M, Bagrel D, Chaimbault P. **Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases.** *Anal Biochem*. 2012 Nov 1 ; 430(1):83-91. Epub 2012 Aug 16.

Saidu NE, Valente S, **Bana E**, Kirsch G, Bagrel D, Montenarh M. **Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells.** *Bioorg Med Chem*. 2012 Feb 15 ; 20(4):1584-93. Epub 2011 Dec 30.

Valente S, **Bana E**, Viry E, Bagrel D, Kirsch G. **Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases.** *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Oct 1 ; 20(19):5827-30. Epub 2010 Aug 3.

Chapitre de livre

Bana E and Bagrel D. **In vitro Breast Cancer Models as Useful Tools in Therapeutics?** In "*Breast Cancer: Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells And Metastasis*", 584 pages, www.intechopen.com, Mehmet Gunduz and Esra Gunduz Editors, In Tech Publisher, pp21-38. 2011.

Communications affichées :

Bana. E. Evaluation of therapeutic potential of new molecules for breast cancer treatment. *European doctoriales* à Ventron (France) du 16 au 21 octobre 2011.

Bana E., Valente S., Viry E., Kirsch G. & Bagrel D. Novel CDC25 small coumarin-based inhibitors, biological evaluation. CCCD 2011 (Cell Cycle, Cancer and Development) à Saint-Malo du 25 au 28 mai 2011.

Bana E., Sibille E., Valente S., Cerella C., Chaimbault P., Kirsch G., Diederich M. & Bagrel D. Biological Evaluation of a Novel Quinone-Coumarin Compound Inhibiting CDC25 Phosphatases. Journée Jeunes chercheurs 2013, société de chimie Thérapeutique, Romainville les 7 et 8 février 2013.

Table des matières

CONTEXTE SCIENTIFIQUE	1
I. INTRODUCTION	2
1. Le cancer	2
2. Cancérogenèse.....	5
Initiation	6
Promotion.....	6
Progression	7
3. Approches thérapeutiques	8
Chirurgie	8
Radiothérapie	10
Chimiothérapie	11
Choix thérapeutique	13
Nouvelles cibles, nouveaux agents chimiothérapeutiques	14
II. LE CYCLE CELLULAIRE	16
1. Organisation.....	16
2. Régulation et progression	17
Complexes CDK/cyclines	17
Transition G ₀ /G ₁	19
Progression en phase G ₁ , transition G ₁ /S.....	19
Phase S.....	19
Progression en phase G ₂ , transition G ₂ /M	20
Mitose.....	21
3. Points de contrôle et dommages à l'ADN	22
Checkpoint G ₁ /S	22
Checkpoint G ₂ /M.....	23
Checkpoint M : Transition métaphase/anaphase	23
III. LES PHOSPHATASES CDC25.....	25
1. Structure.....	25
Région N-terminale.....	25
Région C-terminale	26
2. Mécanisme catalytique.....	28
3. Intervention des isoformes dans le cycle cellulaire.....	28
4. Régulation des CDC25	30
Abondance au cours du cycle	30
Localisation subcellulaire	32
Modulation par les dommages à l'ADN	33
Phosphorylations activatrices des CDC25	34
Régulation redox.....	35
IV. CDC25 ET CANCER.....	37
1. Surexpression dans les cancers.....	37
2. Surexpression transcriptionnelle, protéique et agressivité tumorale.....	38
3. Mécanismes inducteurs	39
4. Mécanismes pro-tumorigènes	40
5. Ciblage thérapeutique	41
V. LES INHIBITEURS DE CDC25.....	44
1. Mimes de groupement phosphate	44

2.	Dérivés poly-soufrés	46
3.	Inhibiteurs électrophiles	47
4.	Dérivés thiophéniques	48
5.	Inhibiteurs à structures quinonoïques	49
	Structure.....	49
	Mode d'action antitumoral des quinones	49
	Toxicité	51
	Inhibiteurs de CDC25	51
6.	Développement de nouveaux inhibiteurs	57
VI.	LES MODÈLES D'ÉTUDE	59
1.	Modèles <i>in vitro</i>	59
	Criblage sur des protéines recombinantes	59
	Criblage <i>in silico</i>	60
	Lignées cellulaires	60
2.	Modèles <i>in vivo</i>	62
	Xénogreffes.....	62
	Tumeurs spontanées et induites	63
	Ethique.....	63
3.	Choix des modèles	63
	OBJECTIFS ET STRATEGIE	65
I.	OBJECTIFS	66
II.	STRATÉGIE	66
	Sélection d'inhibiteurs d'intérêt	66
	Etude des effets dans les cellules	67
	RESULTATS ET DISCUSSION	68
I.	CRIBLAGE <i>IN VITRO</i> DE COMPOSÉS DE SYNTHÈSE	69
1.	Production et calibration des enzymes CDC25	69
2.	Evaluation du potentiel inhibiteur de composés d'intérêt	71
	Dérivés stéroïdiens	71
	Dérivés thiophéniques.....	72
	Dérivés coumariniques	73
	Dérivés imidazoles	76
	Dérivés coumariniques polysoufrés.....	76
	Dérivés coumariniques-quinonoïques	78
3.	Etude des propriétés d'inhibition du composé SV37	81
	Evaluation du mode de fixation	83
	Evaluation du type d'inhibition.....	87
II.	ETUDE DES EFFETS DU COMPOSÉ SV37 SUR LES CELLULES TUMORALES ET NON TUMORALES	91
1.	Evaluation du caractère cytostatique/cytotoxique	91
2.	Analyse du cycle cellulaire dans la lignée MCF-7	95
3.	Evaluation des méthodes de synchronisation cellulaire	96
4.	Analyse de la mort cellulaire dans la lignée MDA-MB-231	100
5.	Evaluation de la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène : ERO	102
6.	Etude des dommages à l'ADN	105
7.	Evaluation du statut CDK/pCDK dans les lignées MDA-MB-231	107
8.	Conclusion sur les effets intracellulaires	109

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	111
MATERIEL ET METHODES	116
I. ETUDE <i>IN VITRO</i> SUR LES PROTÉINES RECOMBINANTES.....	117
1. Expression et purification des protéines recombinantes GST-CDC25.....	117
Vecteur plasmidique.....	117
Préparation des cellules compétentes et transformation bactérienne	118
Production et extraction des protéines GST-CDC25	119
Purification des protéines GST-CDC25.....	119
2. Mesure de l'activité phosphatase <i>in vitro</i>	120
3. Evaluation du type d'inhibiteur	121
II. CULTURE CELLULAIRE.....	123
1. Lignées cellulaires.....	123
2. Milieux de culture.....	123
3. Entretien des lignées, incubation, traitements.	124
III. ETUDE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE.....	126
1. Test de croissance au MTT	126
2. Etude du caractère cytotoxique/cytostatique d'un traitement	127
3. Observation de la croissance cellulaire, suivi temps réel en microscopie.....	127
IV. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX	128
V. EVALUATION DU STRESS OXYDANT PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX	129
1. Analyse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène	129
2. Analyse de la génération d'espèces réactives nitrées.....	130
VI. ANALYSES PAR <i>WESTERN BLOTTING</i>.....	131
1. Préparation des lysats cellulaires	131
2. Electrophorèse en conditions dénaturantes, SDS-Page.....	131
3. Immunoblotting	131
4. Liste, références et conditions d'utilisation des anticorps	132
BIBLIOGRAPHIE.....	I
ANNEXES.....	A

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasa Mutated</i>
ATR	<i>ATM/Rad3 Related</i>
CAK	<i>CDK Activating Kinase</i>
CamK2	<i>Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CDC25	<i>Cell Division Cycle 25</i>
CDH	Cadhérine-1
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CHK1/CHK2	<i>Checkpoint Kinase 1/2</i>
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
CIP/KIP	<i>CDK Interacting Protein / Kinase Inhibitory Protein</i>
CLARA	Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes
C-Myc	Proto oncogène Myélocytose
C-TAK1	<i>CDC25C associated protein kinase 1</i>
Cul1	Culline 1
DP	Facteur de transcription DP
DSG	Motif acide aspartique (D), sérine (S) et glycine (G)
Dub3	Enzyme de désubiquitination 3
E1A	Oncogène viral E1A
E2F	Facteur de transcription E2F
E6	Oncogène viral E6
E7	Oncogène viral E7
EGR	Récepteur aux œstrogènes
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GTPase	Guanosine Triphosphatase
H1	Histone 1
HER2/neu	Proto oncogène <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HRAS	Oncogène <i>Harvey Rat Sarcoma</i>
INCa	Institut National du Cancer
INK4	<i>Inhibitor kinase 4</i>
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
KEN	Motif lysine (K), acide glutamique (E) et asparagine (N)
MALDI–TOFMS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MAX	<i>Myc associated factor X</i>

MMTV-c-neu	<i>Mouse Mammary Tumor Virus - neuroglioblastome oncogene</i>
MMTV-v-Ha-Ras	<i>Mouse Mammary Tumor Virus - Harvey Rat Sarcoma oncogene</i>
MT3	Facteur de croissance Métallothionéine 3
Myt1	Facteur de transcription Myéline 1
NES	Signal d'Exportation Nucléaire
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PGR	Récepteur à la progestérone
PIKK	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase related kinase</i>
PLK	Polo Kinase
pRB	Protéine du Rétinoblastome
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
Rad3	Gène de réparation de l'ADN 3
Ran-GTP	<i>Ras related nuclear protein</i>
Roc1	Aussi appelé RBX1 : <i>RING-box protein 1</i>
SCF β TRCP	<i>Skp1/Cullin/F-box β transducin repeat-containing protein</i>
Skp1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
SV40	Cellules de cornéennes humaines immortalisées
UV	Ultra-Violet
VCR-Res	Cellules d'adénocarcinome mammaire humain résistantes à la vincristine
Wee1	<i>Mitose inhibitor protein kinase</i>

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

-

Etude bibliographique

I. Introduction

1. Le cancer

Véritable enjeu de santé publique, le cancer est l'une des premières causes de mortalité dans les pays développés. Ainsi, chaque année en Europe, plus de 2 450 000 nouveaux cas sont dépistés et plus de 1 230 000 personnes en meurent. Le cancer constitue la seconde cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires, au Luxembourg comme en France où le cancer représente environ 25 à 30% des décès (Weber *et al.* 2010 ; Rapport de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et du Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDC) 2009).

En France, le plan cancer 2009-2013 a mis l'accent sur la recherche et l'innovation, sur l'accompagnement des malades et sur la réduction des inégalités de santé face au cancer. L'impulsion financière donnée au niveau Européen et mondial a permis une augmentation du nombre de patients inclus dans les essais cliniques en cancérologie (plus de 50% en 2011 en comparaison avec 2008), ainsi qu'une augmentation importante de la production scientifique ces dernières années. Ainsi, les publications mondiales sur le cancer ont progressé de 70% entre 2001 et 2009 (près de 45% en France entre 2003 et 2010). Parallèlement, les collaborations scientifiques Françaises à l'international (quantifiées par le nombre de co-publications internationales) ont été augmentées de 27%, une valeur comparable à celle du Royaume Uni (28%) mais inférieure à celle de l'Allemagne (45%) entre 2001 et 2009.

Ces efforts ont mené à de nombreux progrès au cours de cette dernière décennie. Ils se sont notamment traduits par une diminution constante de la mortalité résultant des cancers, et ce, grâce à un dépistage et à une prise en charge beaucoup plus précoce du patient. Toutefois, les progrès réalisés restent insuffisants comme en témoigne la hausse régulière de l'incidence des cancers (Fig. 1), et ces efforts doivent être non seulement poursuivis mais encore amplifiés.

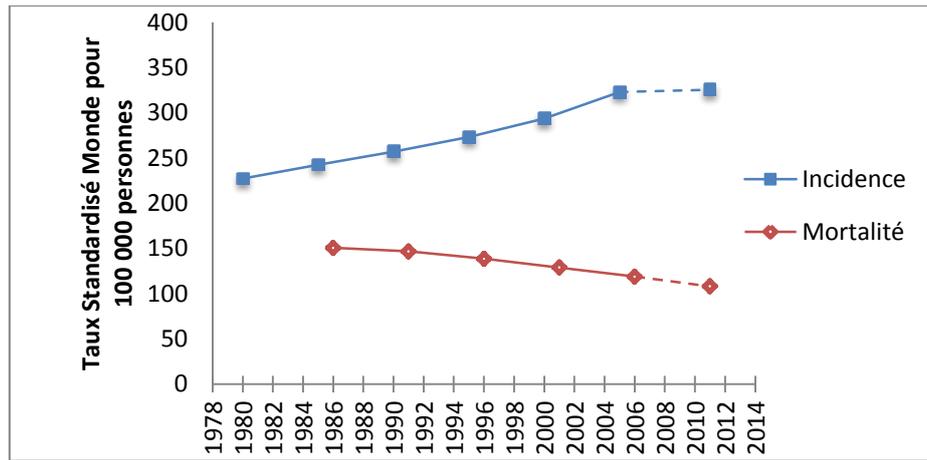


Fig. 1. Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers. Taux Standardisé Monde, estimé chez l'homme et la femme, de 1980 à 2008 et projections pour l'année 2011. Le Taux Standardisé correspond à la valeur qui serait observée dans la population d'étude si elle avait la même structure d'âge que la population de référence définie par l'OMS (la population mondiale dans ce cas). Cette méthode de calcul permet la comparaison d'indicateurs observés dans différentes conditions (pyramides des âges différentes). Rapport de l'Institut National du Cancer (INCa) 2011.

Le cancer du sein

A l'échelle mondiale, le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme et la troisième cause de mortalité par cancer en général, les deux autres étant le cancer du poumon et celui du colon. Ainsi, le cancer du sein représente 30% des cancers déclarés par an chez la femme. D'après les interpolations statistiques, au moins une femme sur dix développera un cancer du sein au cours de sa vie. De nombreuses inégalités d'incidence et de mortalité existent en Europe (Fig. 2). Ces disparités existent généralement entre les pays du nord et de l'ouest et ceux de l'est et du sud, ces derniers ayant des incidences deux fois moindres tandis que les taux de mortalité sont à peu près équivalents pour tous les pays. Ces chiffres suggèrent une meilleure prise en charge des soins dans les pays du nord et de l'ouest, illustrée par ces deux extrêmes : 40% de mortalité en Grèce, 20% en Belgique.

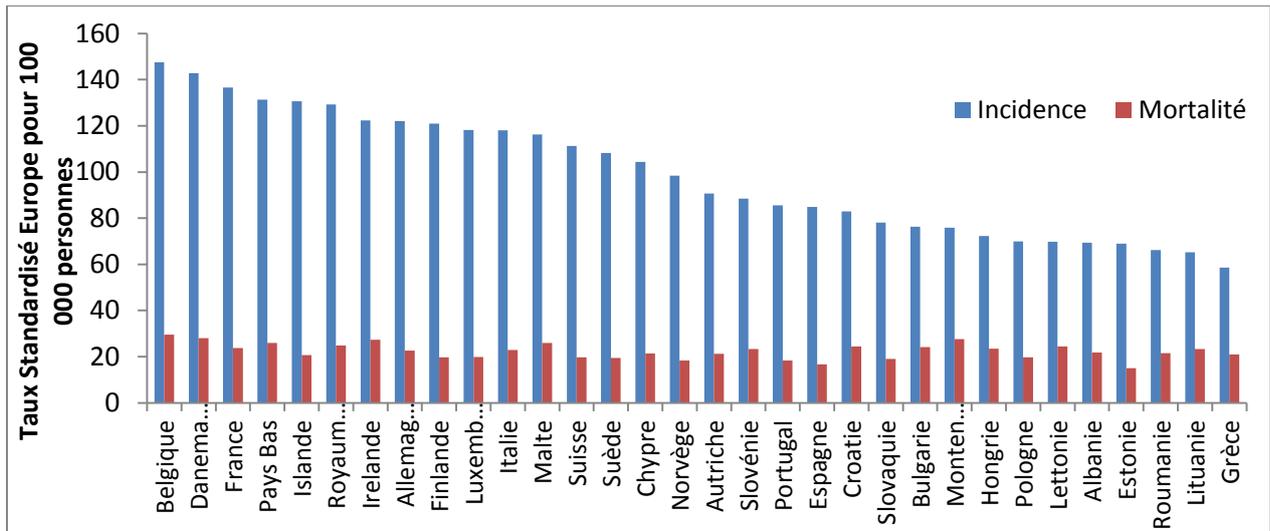


Fig. 2. Estimation de l'incidence et de la mortalité pour le cancer du sein en Europe en 2008. Taux Standardisé Europe (cf. légende Fig.1.), estimé chez l'homme et la femme. Données du Centre International de la Recherche sur le Cancer (CLARA, OMS) et de l'Observatoire Européen du Cancer.

L'influence de l'âge des patients sur le développement et le traitement d'un cancer du sein est importante comme l'illustrent les taux d'incidence et de mortalité en fonction des âges (Fig. 3). Le taux d'incidence est important entre 49 et 84 ans, il atteint son maximum chez les patients âgés de 65 à 74 ans. La mortalité augmente progressivement avec l'âge, soulignant l'importance d'un dépistage le plus précoce possible.

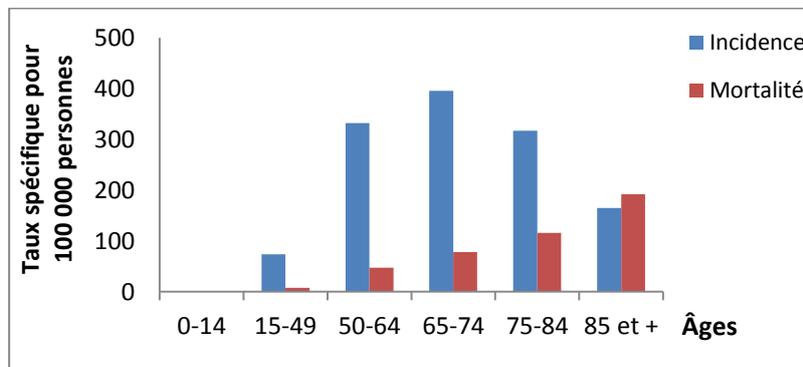


Fig. 3. Incidence et mortalité du cancer du sein en France en 2011 en fonction de l'âge des patients. Taux spécifique pour 100 000 personnes. Le Taux Standardisé correspond à la population étudiée (les cas d'incidence et de mortalité), rapportée à la population générale (ici, la population Française). Données du centre Francim/Hospices civils de Lyon/INCa/Inserm/InVS 2011 (Rapport de l'Institut National du Cancer (INCa) 2011).

L'Organisation Mondiale de la Santé a répertorié plus d'une centaine de types et de sous types de cancer du sein principalement classifiés selon leur origine (tubulaire, lobulaire, mucineux, etc.) et leur phénotype hormonal (présence ou absence de récepteurs aux œstrogènes et à la

progestérone). Chacun d'entre eux possède des caractéristiques particulières et des réactions différentes aux traitements appliqués. Les outils dont dispose actuellement la médecine, tant pour la prévention que le traitement, sont loin d'être efficaces dans la mesure où il n'existe pas de thérapie consensuelle. Il apparaît donc indispensable de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de ces différents types de cancer du sein dans le but de personnaliser le traitement des patients en fonction de leur constitution génétique.

2. Cancérogenèse

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par la présence de cellules anormales, formant des tumeurs malignes. De nombreux cancers découlent d'anomalies liées à la régulation du cycle cellulaire qui induisent généralement une division anarchique et infinie de la cellule. Ce processus est appelé cancérogenèse.

Une cellule d'un tissu non cancéreux exerce une coopération étroite avec l'ensemble des cellules de son environnement. Cette relation se traduit par des échanges de signaux et de substances qui permettent le bon agencement du tissu et qui assurent les fonctions spécifiques à chaque tissu. Les cellules cancéreuses s'affranchissent de ces coopérations en détournant les mécanismes de sécurité qui régissent le fonctionnement normal des cellules au sein d'un même tissu. Elles deviennent ainsi immortelles.

L'acquisition de ce caractère immortel ne découle pas d'une unique mutation, mais d'une succession d'évènements mutagènes qui, petit à petit, conduiront au caractère cancéreux d'une ou plusieurs cellules. C'est un processus à long terme qui peut prendre plusieurs dizaines d'années au bout desquelles une cellule d'un tissu non cancéreux devient tumorale.

La cancérogenèse peut être ordonnée en trois étapes principales : l'initiation, la promotion et la progression (Fig. 4).

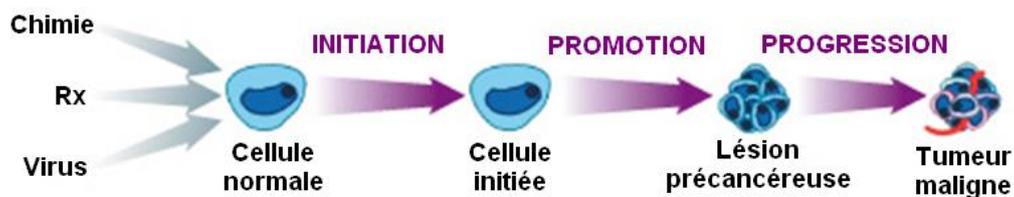


Fig. 4. Les différentes phases de la cancérogenèse. Source : Centre François Baclesse, Centre de lutte contre le cancer de Basse-Normandie.

Initiation

L'équilibre du cycle cellulaire est régi par deux types de gènes impliqués dans la cancérogenèse : les proto-oncogènes qui stimulent la division cellulaire et les anti-oncogènes qui inhibent la division cellulaire. Une mutation de ces gènes, activatrice d'un proto-oncogène ou inhibitrice d'un anti-oncogène, peut amener la cellule à se multiplier de manière anarchique et infinie, outrepassant les contrôles du cycle cellulaire.

Au cours de la phase d'initiation, sous l'influence de stimuli endogènes ou exogènes de nature physique, chimique, génétique ou virale (agents cancérogènes, stress oxydant, U.V., radiations, virus, etc.), une cellule va subir une ou plusieurs mutations génétiques. Elle est dite « initiée », et cette acquisition est irréversible.

Les cellules possèdent des mécanismes de contrôle et de régulation qui permettent de détecter et de réparer les lésions de l'ADN et les erreurs de réplication. Lorsque les lésions sont peu nombreuses, les mécanismes de réparation sont activés et les anomalies sont corrigées. Cette réparation implique notamment un système d'excision/réparation lorsque l'anomalie se situe sur un seul des deux brins (par exemple lors d'un mésappariement), ou encore un système de réparation par recombinaison lorsque l'altération est localisée sur les deux brins (par exemple lors des cassures de l'ADN). Toutefois, ces mécanismes ne sont plus induits lorsque le nombre de lésions est trop élevé. C'est alors la voie de mort cellulaire par apoptose qui est préférentiellement induite.

Tant que ces deux systèmes de réparation et de mort cellulaire fonctionnent correctement, une cellule initiée peut encore être contrôlée. Toutefois, lorsque les mutations interviennent sur les gènes clés de ces mécanismes qui assurent la transmission d'un matériel génétique sain, la cellule peut outrepasser les différents contrôles et continuer son cycle de vie. Elle transmettra ainsi à sa descendance la ou les mutations critiques.

Promotion

Au cours de l'étape de promotion, une cellule initiée va proliférer de manière autonome, formant un clone de cellules porteuses des mêmes mutations et ainsi, une lésion précancéreuse. L'expansion clonale progresse rapidement sous l'influence de promoteurs tumoraux (cytokines, facteurs de croissance, hormones, etc. Dranoff 2004), qui stimulent la

prolifération et altèrent les communications intercellulaires. Cette influence est toutefois réversible, à la différence de l'initiation résultant de stimuli qui altèrent de manière définitive le patrimoine génétique des cellules et de leur descendance. Lors de la promotion, les cellules deviennent sourdes aux signaux d'inhibition de contact émis par les cellules normales des tissus environnants, qui permettent normalement d'induire un arrêt de la mitose. Elles adoptent des caractéristiques de mobilité accrue et de moindre cohésion intercellulaire.

Par ailleurs, la prolifération rapide des cellules favorise l'apparition de nouvelles mutations spontanées. Ces nouvelles cellules sont aussi susceptibles de subir les stimuli endogènes déjà impliqués dans l'étape d'initiation. Les mutations s'accumulent et accentuent ainsi les caractéristiques tumorales de la cellule

A ce stade, les cellules pré-tumorales ont donc acquis plusieurs caractéristiques les rendant autonomes vis-à-vis des cellules normales environnantes. Elles échappent ainsi au contrôle tissulaire et peuvent se multiplier pour former une tumeur.

Progression

La cellule initiée, devenue indépendante vis-à-vis des signaux de contrôle de croissance, va envahir les tissus environnants et croître pour former une tumeur. Les cellules tumorales émettent des signaux angiogéniques qui permettent aux cellules constitutives des vaisseaux sanguins de générer des ramifications à proximité de la tumeur pour l'irriguer et permettre son développement (Carmeliet & Jain 2000). Une protéolyse du tissu local sain va permettre une migration des cellules tumorales et l'envahissement local. A ce stade, la tumeur devient détectable. Au cours de cette étape et comme pour les précédentes, les cellules continuent d'acquérir de nombreuses mutations qui développent leur tumorigénicité.

Les cellules acquièrent ainsi des propriétés d'invasion, d'anaplasie et voient leur taux de croissance augmenter, progressant ainsi vers des degrés plus élevés de malignité. La migration d'une ou plusieurs cellules cancéreuses dans la circulation sanguine ou lymphatique est rendue possible suite à la rupture protéolytique de la membrane basale qui sous-tend les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Ces cellules tumorales vont se fixer en divers endroit du réseau et par extravasation elles vont pénétrer les tissus des organes. La nidation

est ainsi initiée et elles peuvent reformer des tumeurs métastatiques après avoir transformé à nouveau leur environnement local (Fig. 5). La cascade métastatique est alors initiée.

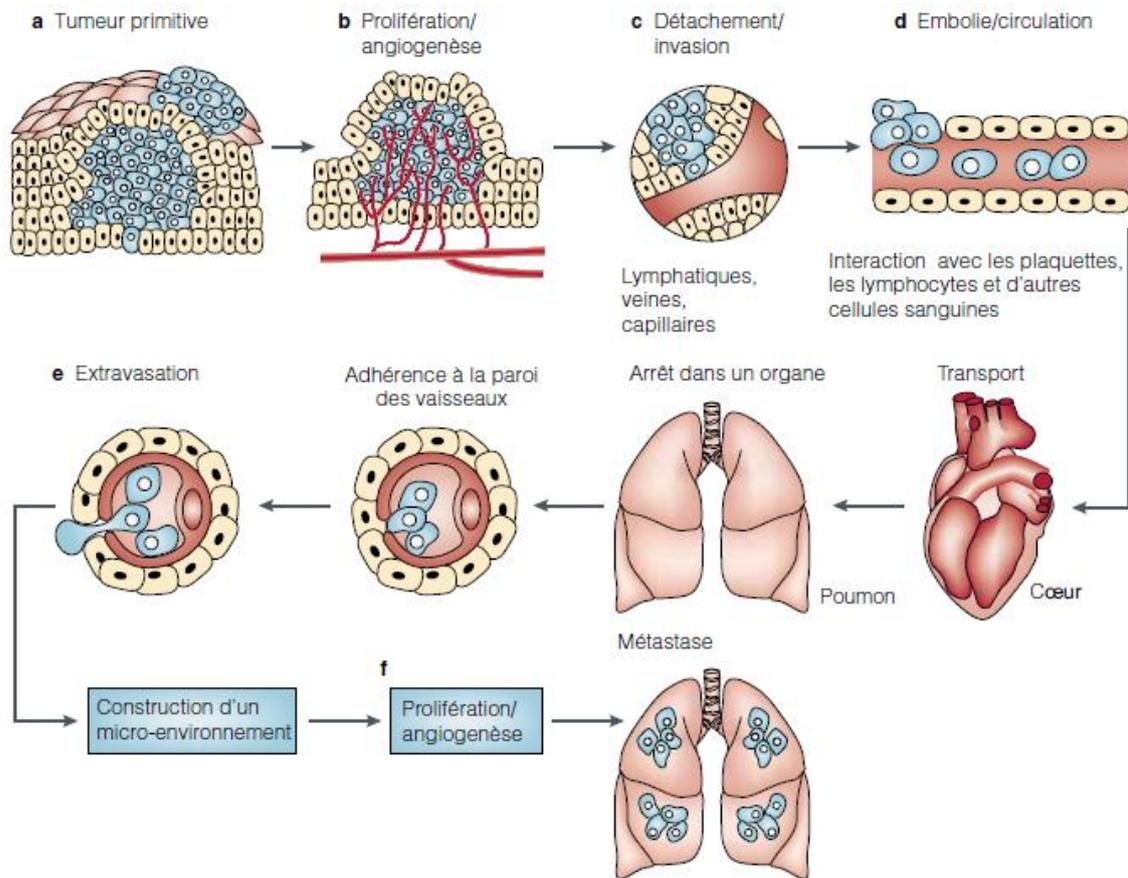


Fig. 5. Progression de la tumeur primitive vers la cascade métastatique (Méjean & Lebreton 2008).

3. Approches thérapeutiques

Les approches thérapeutiques proposées pour le traitement du cancer ont pour vocation de détruire, de ralentir ou d'arrêter la croissance effrénée de la cellule tumorale. Ainsi, les thérapies ciblent les différentes phases de la cancérogenèse. Il existe différents types de traitements, chimiques ou physiques, qui agissent de manière locale ou systémique. Ils sont souvent associés entre eux pour lutter efficacement contre la tumeur.

Chirurgie

L'acte chirurgical, lorsqu'il est réalisable, permet d'extraire la tumeur. Il peut être accompagné de chimiothérapie ou de radiothérapie : ces traitements sont dit adjuvants (néo

adjuvants s'ils précèdent l'acte chirurgical). La chirurgie est un traitement local, qui permet un traitement de la tumeur *in situ* mais pas de ses métastases (Fig. 6).

Dans le cas du cancer du sein, une chirurgie est pratiquée pour la majorité des cas. Il peut s'agir d'une tumorectomie simple, qui consiste à extraire la tumeur du sein ainsi qu'une marge de sécurité dans les tissus environnants. Cette méthode est appliquée lorsque la tumeur est de petite taille et que la dispersion dans les tissus est limitée (début de la phase de promotion dans la tumorigenèse). Elle est alors souvent suivie d'une chimiothérapie post-opératoire. Lorsque la tumeur est de taille trop importante, qu'il existe plusieurs foyers tumoraux dans le sein, ou que son accès est impossible, une mastectomie partielle ou complète est pratiquée. Elle consiste en l'ablation d'une partie ou de la totalité du sein.

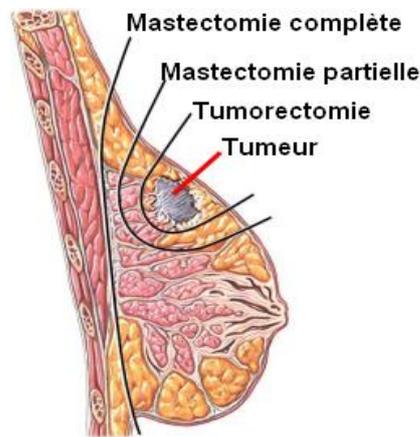


Fig. 6. Représentation des différentes chirurgies pratiquées pour le traitement d'un cancer mammaire. Vue sagittale du sein. Adaptée de « The Gale Encyclopedia of cancer » (Thackery 2002).

Une exploration des ganglions lymphatiques est généralement réalisée après chirurgie dans le but de vérifier la présence éventuelle de cellules cancéreuses dans les ganglions.

Les effets secondaires de la chirurgie sont ceux présents après toute opération chirurgicale. Toutefois dans certains cas comme la mastectomie complète d'un sein, il est bien souvent nécessaire pour la patiente d'avoir un suivi psychologique et éventuellement une chirurgie reconstructrice.

Radiothérapie

La radiothérapie est une technique qui fait appel aux rayonnements (rayons X ou gamma le plus souvent) pour tuer ou endommager les cellules cancéreuses en créant des dommages ou des aberrations de l'ADN (Fig. 7) de manière directe (ionisation) ou indirecte (génération d'espèces réactives de l'oxygène, ERO).

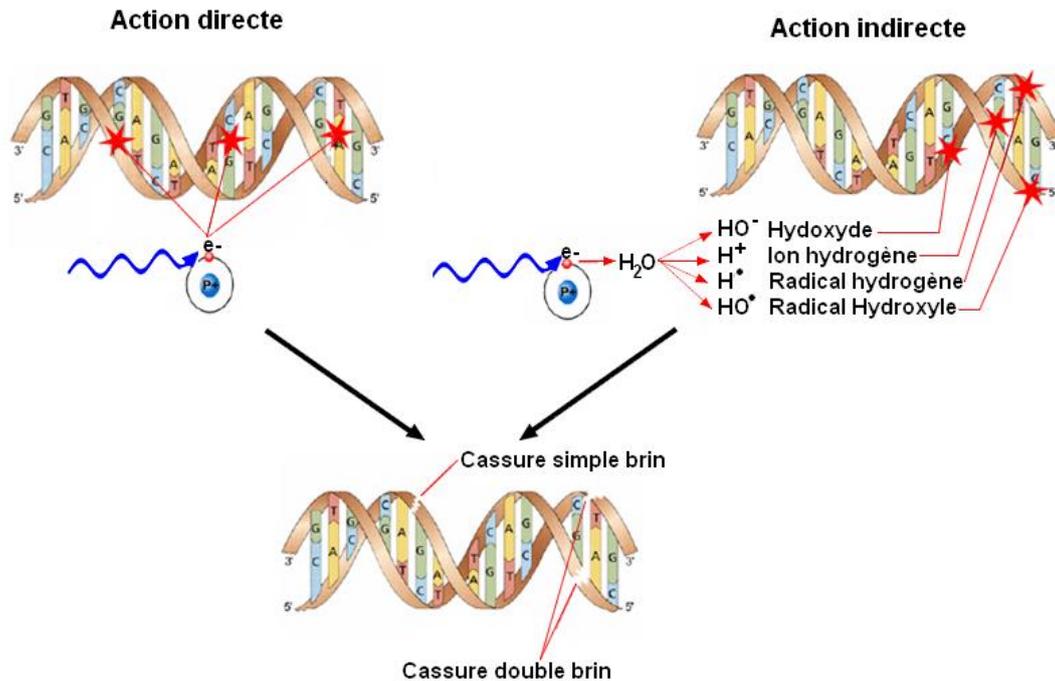


Fig. 7. Principe de la radiothérapie. Adapté d'un document de la « Canadian Nuclear Association », 2010.

Bien que ciblés, ces rayons vont toucher les cellules tumorales et les cellules saines périphériques. Toutefois, les cellules cancéreuses ayant la propriété de se diviser beaucoup plus rapidement que les cellules normales et leurs mécanismes de réparation de l'ADN étant bien souvent moins efficaces, le traitement tuera plus aisément les cellules tumorales que les cellules normales.

Pour certains cancers au stade précoce (ex. lymphomes Hodgkiniens, non-Hodgkiniens, certains cancers du cerveau ou de la prostate, ...) ce traitement peut à lui seul suffire à traiter la tumeur. Pour les autres cas, un acte chirurgical ou un traitement chimiothérapeutique est généralement nécessaire. Les radiations peuvent s'appliquer de manière externe ou interne. L'application externe consiste à diriger un rayonnement vers la tumeur, à partir de l'extérieur

de l'organisme. L'application interne fait appel à l'implantation chirurgicale d'une source radioactive à proximité directe de la tumeur.

La radiothérapie est donc un traitement local, au même titre que la chirurgie, à l'inverse de la chimiothérapie. Seule exception à cette règle, la radioimmunothérapie qui consiste en l'injection d'anticorps ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses, et liés à un élément radioactif. Ce type de traitement est en développement et permettra de cibler les cellules cancéreuses sur plusieurs sites, et donc les métastases.

Les effets secondaires de la radiothérapie sont nombreux et variés, il peut notamment s'agir d'anémie ou d'aplasie, de nausées et de vomissements, d'alopécie ou de brûlures de la peau. Le ratio bénéfice/risque est généralement positif pour le patient. Toutefois lorsque les cancers ne sont pas suffisamment sensibles aux radiations, une autre thérapie est alors envisagée.

Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique, il est administré dans l'organisme et sera capable d'atteindre les cellules cancéreuses en plusieurs endroits. Il permet donc d'atteindre aussi les éventuelles métastases. La chimiothérapie fait appel à des molécules capables de tuer ou stopper la croissance des cellules cancéreuses, en ciblant les mécanismes de leur développement (croissance, adhésion, invasion). Elle peut être employée pour ralentir la croissance d'une tumeur ou l'empêcher de produire des métastases. La thérapie néo-adjuvante est réalisée avant un acte chirurgical ou un traitement radiothérapeutique afin de diminuer la taille de la tumeur à extraire, ou de la sensibiliser aux radiations. La thérapie adjuvante, réalisée après une opération, permet de limiter le risque de récurrence (Thackery 2002).

Plus de deux cents molécules ont été référencées comme agents chimiothérapeutiques depuis les années 40 : les deux tiers d'entre elles sont des composés d'origine naturelle, le tiers restant est issu de la chimie de synthèse (Newman & Cragg 2012).

Les molécules sont de classes diverses, incluant entre autres :

- Les agents alkylants tels que le cyclophosphamide, qui est souvent utilisé en association avec d'autres composés pour traiter le cancer du sein, les lymphomes et d'autres tumeurs de l'enfant et de l'adulte ;

- Les dérivés du platine tels que le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine ;
- Les anti-métabolites, qui interfèrent avec la réplication de l'ADN, notamment le 5-fluorouracile (5-FU), utilisés pour une grande variété de cancers (cancer du sein, leucémies, lymphomes, colorectaux, tête et cou, sarcomes osseux, etc.) ;
- Les inhibiteurs de topoisomérase qui affectent la structure topologique de l'ADN. C'est le cas de l'étoposide et des anthracyclines comme la doxorubicine, l'épirubicine et l'idarubicine ;
- Les composés affectant les microtubules et le fuseau mitotique tels que les alcaloïdes de *Vinca* (vincristine, vinblastine, vinoreline), les taxanes (paclitaxel, docetaxel) ou encore l'estrémustine phosphate, un dérivé d'œstradiol et de moutarde azotée ;
- Les inhibiteurs ou analogues d'hormones impliquées dans la croissance de certains cancers : le tamoxifène est par exemple utilisé pour les cancers du sein œstrogène-dépendants et la goséréline est employée pour traiter les cancers de la prostate ;

Outre ces traitements chimiothérapeutiques classiques et hormonaux, il existe des traitements ciblés. Ils emploient généralement des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs qui ciblent spécifiquement des mécanismes impliqués dans la croissance, l'adhésion, la migration ou encore la différenciation des cellules. Ces thérapies permettent d'adapter le traitement en fonction des caractéristiques de la tumeur afin de permettre une médecine personnalisée pour chaque patient. Par exemple, pour le cancer du sein le trastuzumab est employé pour bloquer le récepteur HER2/neu qui est spécifique des facteurs de croissance épidermiques, lesquels sont surexprimés dans certains types de tumeurs. Des inhibiteurs de la protéine mTOR peuvent aussi être employés (ex. everolimus) pour limiter la croissance, la prolifération, la motilité et la survie des cellules. Les inhibiteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) font aussi partie de ces traitements, ils entravent la néo-angiogenèse qui permet la vascularisation de la tumeur (ex. bevacizumab).

Les molécules employées peuvent être combinées afin de maximiser l'efficacité du traitement en agissant simultanément sur deux ou trois cibles dans la cellule cancéreuse.

Les effets secondaires des traitements chimiothérapeutiques sont nombreux. Ces traitements ciblent préférentiellement les mécanismes de croissance des cellules et donc, l'ensemble des cellules à croissance rapide sont affectées. C'est le cas des cellules de la moelle osseuse, de l'estomac, de l'intestin et des follicules pileux. Comme pour la radiothérapie, des nausées, une

anémie/aplasie et une chute massive des cheveux peuvent être observées. Outre ces effets secondaires, certaines molécules ont des toxicités particulières vis-à-vis de certains tissus et organes. Par exemple, le tamoxifène provoque dans certains cas une hépatotoxicité sévère (Elefsiniotis *et al.* 2004), la doxorubicine est quant à elle cardiotoxique (Shi *et al.* 2011). Pour contrebalancer ces effets, une thérapeutique particulière peut être mise en place, comme par exemple l'administration simultanée de molécules cardioprotectrices telle que la dexrazoxane lors d'un traitement par la doxorubicine (Lipshultz *et al.* 2004)).

Choix thérapeutique

Cet arsenal thérapeutique en développement depuis plusieurs dizaines d'années permet donc de faire face à l'hétérogénéité des cancers et contribue largement à la réduction de la mortalité liée aux cancers. Le choix de la thérapeutique à appliquer repose sur de nombreux critères cliniques relatifs au patient (âge, antécédents médicaux, etc.) et à la tumeur (localisation, taille, dissémination locale, grade, présence de métastases, etc.). Ces critères sont complétés par des analyses plus poussées qui font appel à plusieurs outils tels que l'imagerie médicale, la génomique, l'étude génétique/épigénétique ou encore la protéomique (Fig. 8).

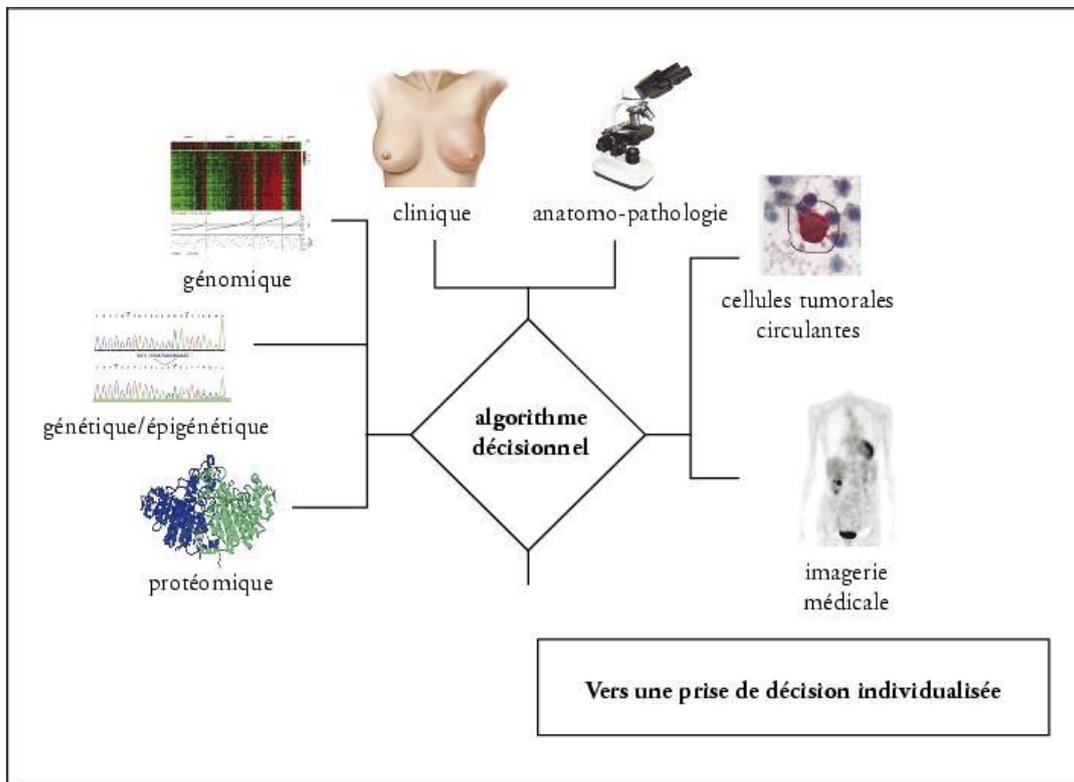


Fig. 8. Algorithme décisionnel global pour la prise en charge thérapeutique du patient (D'Hondt *et al.* 2008)

Il existe plusieurs dizaines de sous types de cancer du sein, chacun possédant des caractéristiques génétiques et phénotypiques particulières, et étant donc susceptibles de répondre différemment aux traitements. Chaque tumeur possède donc des biomarqueurs moléculaires qui la caractérisent. L'inhibition de la prolifération cellulaire seule est donc insuffisante, le développement de thérapies ciblées sur ces biomarqueurs est nécessaire.

Ces marqueurs peuvent être relatifs au risque de récurrence post-traitement (marqueur pronostique) ou relatifs à la réponse attendue vis-à-vis d'une thérapeutique donnée (marqueur prédictif), c'est le cas par exemple des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (ER et PR), à certains facteurs de croissance épidermiques (HER2), ou encore l'expression de l'antigène Ki67 (marqueur de la prolifération cellulaire). Ils permettent de mieux cibler le traitement du cancer du sein. L'étude de marqueurs moléculaire a permis de définir différentes classes de cancers du sein dont les principaux sont définis ainsi :

- Luminal A, présentant un phénotype ER+ ou PR+ et HER2-, faible expression de Ki67 ;
- Luminal B, présentant un phénotype ER+ ou PR+ et HER2+/-, forte expression de Ki67 ;
- *Basal like*, aussi appelé triple négatif, présentant un phénotype ER- PR- et HER2-, forte expression de Ki67 ;
- HER2+, présentant un phénotype ER- PR- et HER2+, forte expression de Ki67.

En considérant ces marqueurs on peut prédire que l'utilisation de chimiothérapies basées sur les inhibiteurs hormonaux s'avèrera inefficace sur un cancer triple négatif. Le traitement personnalisé des tumeurs ou thérapie ciblée est donc une nécessité. De nombreuses équipes de recherche travaillent déjà sur la mise au point d'autres marqueurs particuliers de certaines tumeurs (Weigel & Dowsett 2010). L'analyse de ces marqueurs permettra d'appliquer un traitement sur mesure, en fonction de la tumeur présente, d'éviter ainsi des traitements lourds qui seront définis par avance comme inefficaces, et d'en privilégier d'autres qui auront toutes les chances d'agir efficacement.

Nouvelles cibles, nouveaux agents chimiothérapeutiques

Grâce à la caractérisation de nouveaux biomarqueurs, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles sont aussi étudiées. Elles sont liées aux mécanismes de la cancérogenèse : résistance à la mort cellulaire, contournement des systèmes de contrôle de la croissance,

facteur favorisant l'invasion et l'établissement de métastases, angiogenèse, etc. (Hanahan & Weinberg 2011). Ces études permettent de mettre au point de nouvelles molécules chimiothérapeutiques capables de contourner certaines résistances aux traitements déjà existants, d'être plus efficaces que les traitements standard ou simplement d'être moins toxiques vis-à-vis des cellules saines. Ainsi, les nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaires sont autant de cibles potentielles. Certaines sont impliquées dans le processus de cancérogenèse, ou dans le processus d'acquisition de résistances vis-à-vis des traitements (Schwartz & Shah 2005 ; Deep & Agarwal 2008). Les kinases dépendantes des cyclines (CDK, *Cyclin dependant kinases*), les phosphatases CDC25 (*Cell division cycle 25*) ou encore les *Checkpoint Kinases* (CHK1 et CHK2) sont parmi les cibles étudiées (Raymond 2008).

II. Le cycle cellulaire

1. Organisation

Le cycle cellulaire est le mécanisme par lequel une cellule mère va se diviser en deux cellules filles identiques. Ce cycle est d'une durée variable qui dépend du type cellulaire, cette durée est généralement comprise entre 10 et 24 heures pour les cellules eucaryotes.

La majorité des cellules de l'organisme se trouvent dans un état quiescent, elles ne se divisent pas (phase G_0 , Gap 0). Le processus de division cellulaire peut être initié sous l'influence de signaux mitogènes, ces signaux vont induire une stimulation des gènes essentiels pour l'entrée en division (ex. gènes des cyclines et des CDK). L'interphase est la phase du cycle pendant laquelle la cellule se prépare à la division, elle peut être subdivisée en trois sous phases G_1 (Gap 1), S (Synthèse) et G_2 (Gap 2). La phase M (Mitose) termine ce cycle et donne naissance à deux cellules filles identiques (Fig. 9).

- Le cycle cellulaire est amorcé en phase G_1 , les cellules entament leur division de manière irréversible et préparent la phase S. Lors de la transition G_1/S l'assemblage d'un complexe préélicatif est réalisé. De nombreuses protéines et complexes protéiques vont venir se fixer à cet assemblage (cf. paragraphe sur la progression en phase G_1 ci-après, et Fig. 11).
- La réplication de l'ADN va ainsi être initiée, et au cours de la phase S, l'ADN polymérase répliquera le matériel génétique. La cellule obtiendra en finalité des chromosomes dupliqués, qui suffisent pour deux cellules filles.
- La phase G_2 précède la phase S. Bien que son rôle exact ne soit pas parfaitement connu, elle est marquée par l'initiation de la condensation des chromosomes et la formation du complexe CDK1-cycline B.
- Au cours de la phase M, les différents éléments de la cellule vont s'organiser et la cellule va se diviser. Cette phase peut être subdivisée en cinq grandes parties, principalement liées à la morphologie de l'enveloppe nucléaire et des chromosomes : La prophase constitue le moment où les chromosomes ont fini de se condenser et où l'enveloppe nucléaire se rompt. La prométaphase marque la formation du fuseau mitotique auquel les chromosomes vont s'attacher. Ces derniers vont s'aligner au cours de la métaphase et se disjoindre en anaphase. Ils finissent ensuite par migrer vers

chaque pôle de la cellule en télophase, puis ils se décondensent. En fin de phase M, un anneau contractile va se former au niveau équatorial du fuseau de division. Son resserrement va induire l'individualisation des deux cellules, c'est la cytokinèse.

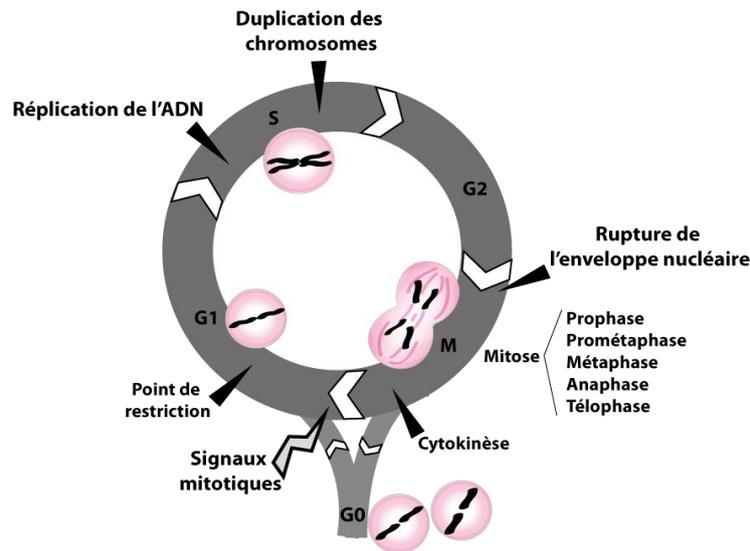


Fig. 9. Vue générale du cycle cellulaire. Adapté de Meijer 2006.

Ce mécanisme complexe qui comprend plusieurs étapes, est hautement régulé. Il implique de très nombreuses protéines qui assurent son bon déroulement.

2. Régulation et progression

Complexes CDK/cyclines

Les mécanismes de contrôle et de régulation du cycle cellulaire impliquent différentes enzymes dont l'intérêt n'est plus à prouver en oncologie en tant que cibles ou marqueurs. Le contrôle des transitions entre les différentes phases du cycle requiert une famille particulière de protéines : les *Cyclin Dependent kinases* (CDK). Le bon fonctionnement de ces kinases assure le déclenchement et le déroulement harmonieux des différentes phases du cycle. Ces enzymes sont actives lorsqu'elles sont complexées avec les cyclines qui sont leurs sous-unités régulatrices.

Les CDKs peuvent être régulées de différentes manières. Un assemblage transitoire avec les cyclines, dont la répartition varie en fonction des phases du cycle, permet une activation de l'un ou l'autre des complexes en ces différentes phases. Une régulation *via* l'inhibition de

l'assemblage des sous-unités cyclines aux CDK est assurée par association transitoire des CDK avec divers inhibiteurs (Fig. 10). Les deux familles principales sont les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes 4 (INK4 : p15, p16, p18 et p19) et les protéines inhibitrices de CDK (CIP/KIP : p21, p27 et p57). La famille INK4 se lie spécifiquement aux monomères de CDK4 et CDK6, empêchant ainsi leur liaison aux sous unités cyclines ; tandis que la famille CIP/KIP inhibe généralement l'activité kinase en se liant aux complexes CDK/cycline formés.

Outre ces deux mécanismes, une partie importante de la régulation passe par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation qui induisent l'activation ou l'inactivation des CDK (Russell & Nurse 1986) :

- L'inhibition des CDK est assurée par les kinases Wee1/Myt1 qui phosphorylent deux résidus thréonine 14 et tyrosine 15 situés dans le site actif des CDK ;
- L'activation des CDK résulte de la phosphorylation d'un résidu thréonine par la kinase CAK (*Cyclin Activating Kinase*) et de la déphosphorylation des deux résidus du site actif par une famille de phosphatases à double spécificité : les phosphatases CDC25 (Fauman & Saper 1996).

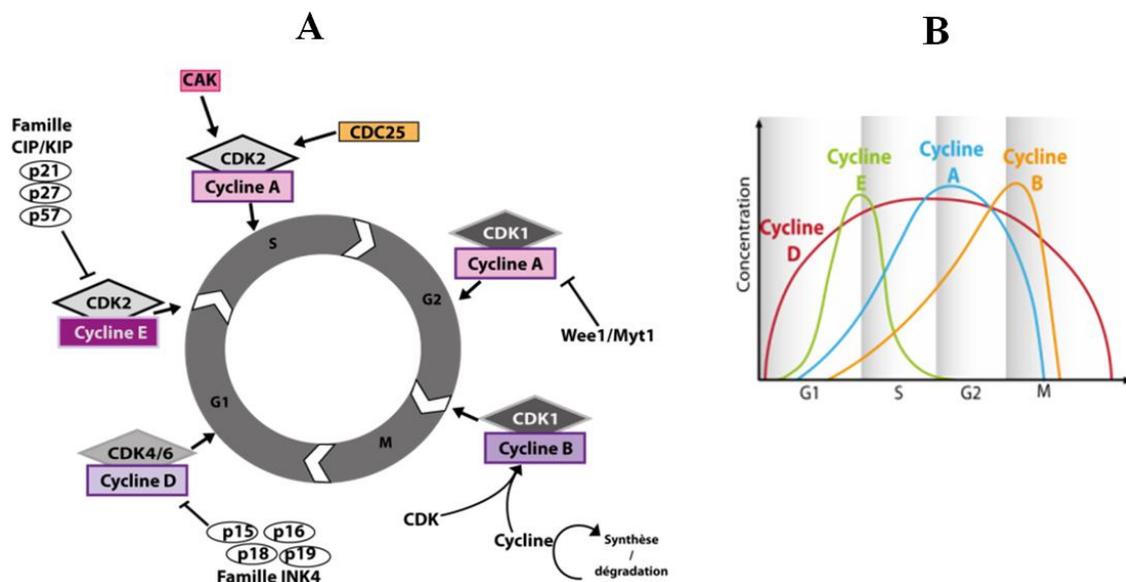


Fig. 10. Modes de régulation de l'activité des complexes CDK/cyclines, expression des cyclines. Intervention et régulation des complexes CDK/cyclines au cours du cycle cellulaire (A). Expression des cyclines au cours des différentes phases du cycle (B). Adaptés de Schwartz & Shah 2005 ; Boutros et al. 2006 ; Hochegger et al. 2008.

Transition G₀/G₁

La stimulation d'une cellule quiescente par des facteurs mitogènes, va activer la transcription de gènes impliqués dans l'initiation du cycle cellulaire. C'est le cas du gène codant le facteur de transcription c-myc. MYC va s'associer à la protéine MAX sous forme d'un dimère capable d'activer la transcription de très nombreux gènes, notamment ceux qui codent les Cyclines D et E, CDK4, E2F ainsi que CDC25A. Le cycle peut démarrer lorsque les acteurs impliqués dans la phase G₁ sont présents en quantité suffisante.

Progression en phase G₁, transition G₁/S

Au début de la phase G₁, les complexes CDK4/6-cycline D vont progressivement être activés. A leur tour ils vont phosphoryler la protéine pRB (protéine du Rétinoblastome) chargée de libérer des facteurs de transcription. Ces facteurs E2F/DP vont induire l'expression des gènes qui codent les protéines impliquées dans la phase S (Cyclines E et A, CDK2, CDC25A, E2F). Ce processus est ensuite soumis à une boucle d'autoamplification : la phosphorylation de pRB par le complexe CDK2-cycline E va permettre une accumulation de CDC25A qui à son tour va réactiver le complexe CDK2-Cycline E. Par ailleurs, ce même complexe est capable de phosphoryler p27, l'un de ses inhibiteurs, et d'induire ainsi sa dégradation par le protéasome.

Cette autoamplification permet un recrutement suffisant de complexes CDK2-cycline E, les signaux mitotiques ne sont alors plus indispensables, le cycle est engagé de manière irréversible (point de restriction) et entame la phase S (Fig. 11).

Phase S

La réplication de l'ADN est contrôlée par le complexe CDK2/Cycline A. Les complexes CDK4/6-cycline D sont ubiquitinylés puis dégradés par le protéasome. L'ADN polymérase et l'histone H1 vont être activées par une phosphorylation assurée par le complexe CDK2/Cycline A. L'histone H1 va ainsi permettre la condensation des chromosomes et l'ADN polymérase initiera la réplication. En parallèle de ce doublement du matériel génétique, le centrosome va lui aussi être dupliqué. Ce centre organisateur des microtubules permettra la mise en place du fuseau mitotique. La fin de la phase S est marquée par l'inhibition des facteurs de transcription E2F/DP, phosphorylés par le complexe CDK2/cycline A.

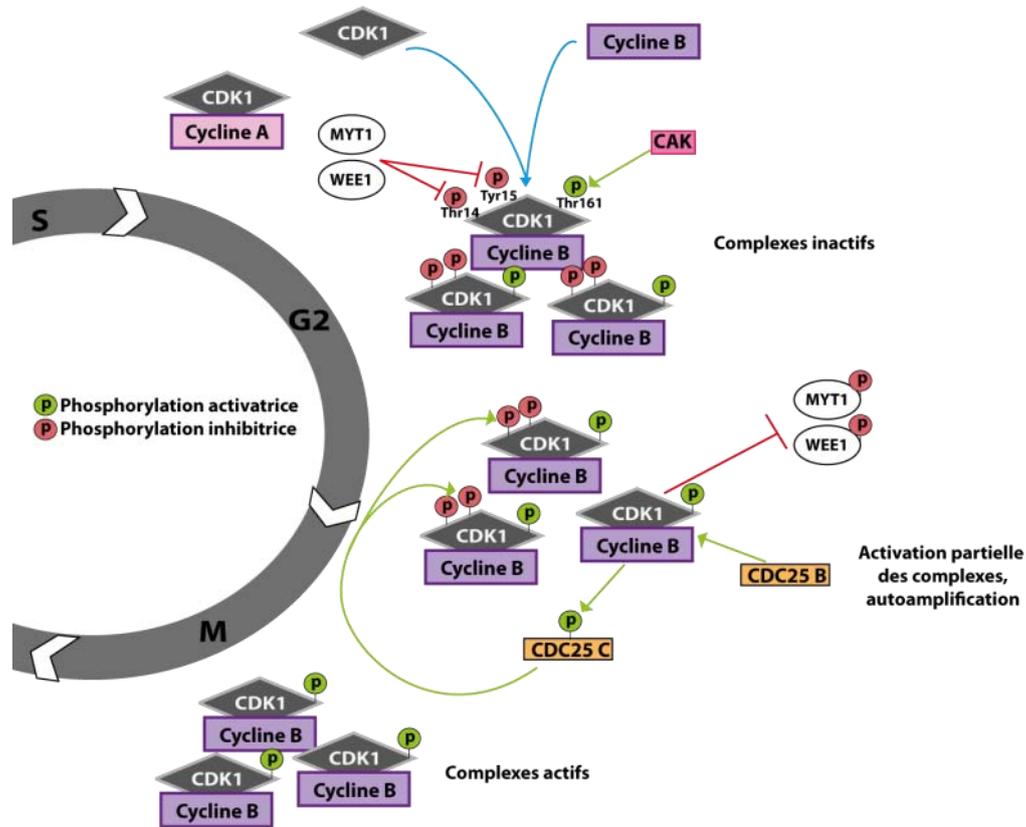


Fig. 12. Activation des complexes CDK1/Cycline B lors de la transition G₂/M. Adapté de Boutros et al. 2007 et Meijer 2006

Mitose

Les complexes CDK1-Cycline B massivement activés vont déclencher de multiples évènements. Ils vont notamment phosphoryler :

- La condensine et les histones H1 et H3, impliqués dans la condensation des chromosomes ;
- Les lamines impliquées dans la désorganisation de l'enveloppe nucléaire ;
- Les protéines d'assemblage du fuseau mitotique associées aux microtubules (MAP) ;
- De nombreuses protéines liées à l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique, à la réorganisation du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, etc.

Finalement, le complexe CDK1-Cycline B va phosphoryler le complexe APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) notamment chargée de dégrader les cyclines B. La cellule pourra ainsi terminer sa mitose et donner deux cellules identiques après la cytokinèse.

3. Points de contrôle et dommages à l'ADN

Les cellules eucaryotes possèdent un système de points de contrôles « *checkpoints* » qui permettent de retarder ou d'empêcher la progression dans la phase suivante du cycle cellulaire en cas de nécessité. Chacune des étapes du cycle cellulaire est soumise à ces « *checkpoints* » chargés de contrôler l'intégrité génétique. Ces points de contrôle sont activés lors de l'apparition de dommages à l'ADN ou de mésappariements au cours de la réplication. Ils induisent un arrêt du cycle cellulaire et permettent à la cellule d'enclencher des mécanismes de réparation ou de s'engager vers les voies de mort cellulaire en cas de dommages trop importants.

Les points de contrôles interviennent donc aux moments clés du cycle cellulaire, principalement lors des transitions G₁/S et G₂/M.

Plusieurs voies de signalisation permettent ainsi l'arrêt de la progression dans le cycle, ils impliquent des transducteurs du signal tels que ceux de la famille PIKK (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase related Kinases*) : ATM (*Ataxia Telangiectasa Mutated*) et ATR (*ATM/Rad3 Related*). Il existe également une voie qui fait intervenir la kinase p38.

Checkpoint G₁/S

Le *checkpoint* de la transition G₁/S a pour vocation de prévenir une réplication d'un brin d'ADN endommagé. Son activation conduit à l'activation des kinases ATM et ATR qui phosphorylent les kinases CHK1 et CHK2 (*Checkpoint Kinases*). Cette activation va permettre une induction d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, et l'activation de plusieurs voies de signalisation responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (Hoffmann & Karsenti 1994).

Dans un premier temps, l'activation de CHK2 va induire une dégradation des CDC25A et/ou leur séquestration dans le cytoplasme, ainsi qu'une activation des kinases WEE1. L'activation de la voie p38 va permettre l'intervention de la kinase MAPKAP-2 qui est capable de phosphoryler et d'induire la protéolyse des phosphatases CDC25. Cette inhibition va induire une régulation négative des CDK2 qui ne seront plus déphosphorylées et donc un arrêt de la progression dans le cycle. Cet arrêt intervient en 30 minutes et se prolonge pendant quelques heures seulement. Dans un second temps des modifications transcriptionnelles liées à p53

interviennent. Ce facteur de transcription va être stabilisé en réponse aux dommages à l'ADN, notamment par une phosphorylation induite par les kinases ATM/ATR et/ou CHK1/CHK2. p53 va ainsi induire la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans le déclenchement de l'apoptose ou dans la réparation de l'ADN. p53 va, par exemple, induire la transcription de p21, un inhibiteur des complexes CDK/Cyclines.

Checkpoint G₂/M

Le *checkpoint* de la transition G₂/M prévient le déclenchement de la mitose dans ce cas où la réplication n'est pas achevée ou que l'ADN comporte des erreurs ou des lésions. Les mécanismes mis en jeu sont les mêmes que ceux impliqués dans le *checkpoint* G₁/S. L'activation de la cascade ATM/ATR et CHK1/CHK2, conduit à l'inactivation des phosphatases CDC25 B et C, également dégradées et/ou séquestrées suite à leur phosphorylation *via* la voie p38/MAPK (Fig. 13). La voie p53 induit elle aussi l'inhibition des complexes CDK1/Cycline B et ainsi le blocage du cycle cellulaire.

Checkpoint M : Transition métaphase/anaphase

Ce point de contrôle intervient au cours de la phase M, au moment où les chromosomes s'attachent au fuseau mitotique. Il est chargé de vérifier cette fixation, indispensable au déclenchement de l'anaphase. Lorsque l'attachement des chromosomes est déficient ou absent, le complexe APC n'est plus activé, les protéines qui empêchent la séparation des chromatides sœurs sont maintenues en place et empêchent la ségrégation des chromosomes.

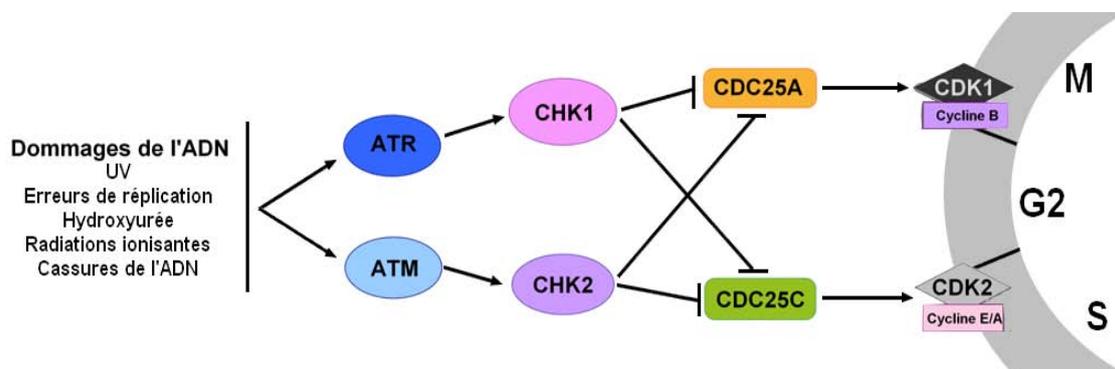


Fig. 13. Contrôle des phosphatases CDC25 par les voies ATR/ATM en cas de dommages à l'ADN. Adapté de Rudolph 2007.

Considérant les mécanismes régulant le cycle cellulaire et de leur implication dans la cancérogenèse, il apparaît clairement que de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire peuvent être ciblées (Voir Fig. 14 pour des exemples de cibles avec des inhibiteurs correspondants). La plupart des traitements anticancéreux agissent sur une ou plusieurs des cibles du cycle cellulaire.

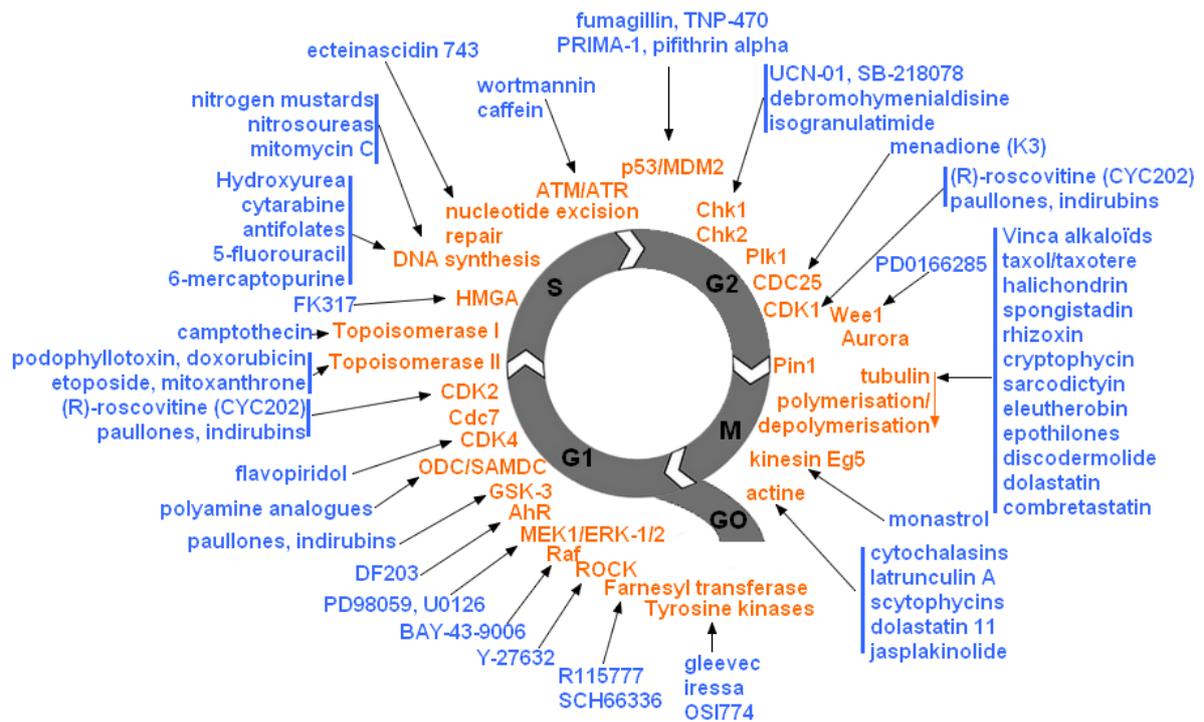


Fig. 14. Quelques cibles et molécules à potentiel thérapeutique. Adapté de Meijer 2006.

III. Les phosphatases CDC25

Les phosphatases CDC25, enzymes clés de la régulation des complexes CDK-Cyclines sont donc des cibles thérapeutiques potentielles.

1. Structure

Les CDC25 sont des protéines ubiquitaires, il en existe trois isoformes chez l'Homme : A, B et C (Fig. 15). Chacune des isoformes comprend différents variants qui peuvent être générés par un épissage alternatif des trois gènes qui codent les CDC25. Ces gènes sont localisés en position 3p21 pour l'isoforme A, 20p13 pour l'isoforme B et 5q31 pour l'isoforme C. Les études actuelles recensent deux variants d'épissage pour CDC25A, sept variants pour CDC25B dont deux tronqués dans leur partie N-terminale, et au moins cinq variants pour CDC25C (Wegener *et al.* 2000; Jullien *et al.* 2011; Bureik *et al.* 2000).

Les CDC25 sont des phosphatases à double spécificité, c'est-à-dire qu'elles déphosphorylent deux résidus particuliers (Tyr15/Thr14) des CDK. Elles sont constituées de 470 à 580 acides aminés répartis en deux domaines, l'un catalytique (C-terminal) et l'autre régulateur (N-terminal).

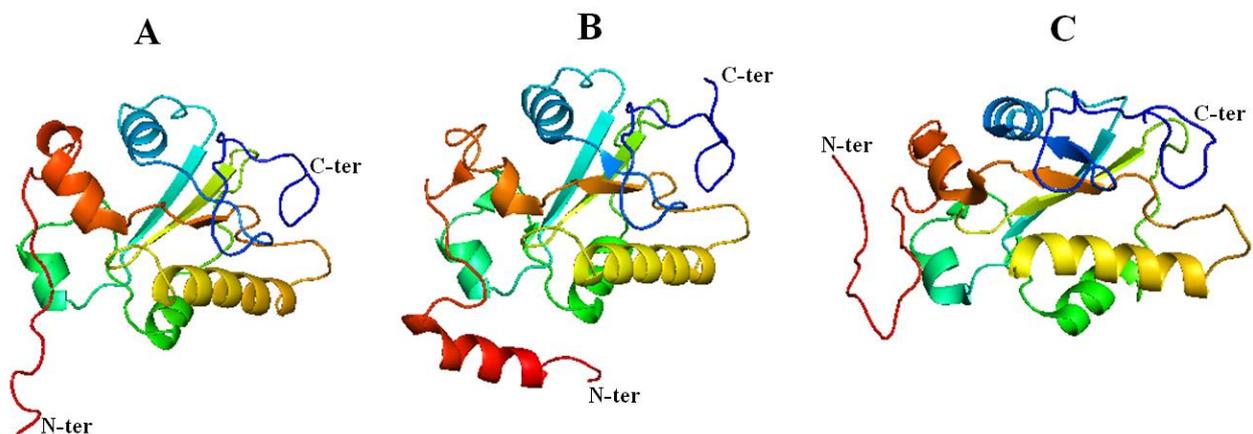


Fig. 15. Structure des CDC25 A, B et C. Modélisé avec PyMOL, Protein Data Bank codes : 1C25 (site actif CDC25A), 1CWR (site actif CDC25B) et 3OP3 (CDC25C).

Région N-terminale

Les régions N-terminale des différentes isoformes comportent peu d'homologie entre elles (20 à 25% de similarité). Ce domaine comprend plusieurs sites de phosphorylation et

d'ubiquitination impliqués dans la régulation de l'activité enzymatique, des niveaux de protéines présentes dans la cellule ainsi que dans l'association avec d'autres protéines (Hoffmann & Karsenti 1994 ; Giles *et al.* 2003). Outre les sites régulateurs, la région N-terminale comporte des motifs NLS (*Nuclear Localization Signal*) et NES (*Nuclear Export Signal*) qui permettent la régulation des CDC25 *via* leur localisation subcellulaire ainsi que leur stabilité et leur dégradation (Woo *et al.* 1999 ; Aressy & Ducommun 2008).

Région C-terminale

La région C-terminale est hautement conservée entre les isoformes (60% d'homologie sur plus de 200 acides aminés). Cette région est porteuse de l'activité catalytique *via* une cystéine (Cys431 pour CDC25A, Cys473 pour CDC25B et Cys377 pour CDC25C) située dans un motif HCX₅R qui est caractéristique de toutes les protéines tyrosine phosphatases (PTP) (Fig. 16).

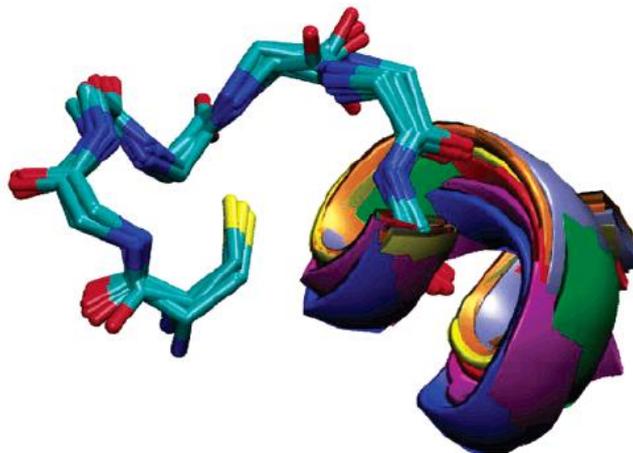


Fig. 16. Illustration de la haute conservation du motif HCX₅R entre CDC25B et diverses PTP. Les PTPs représentées sont superposées, elles incluent entre autre CDC25 B, PTEN (phosphatase and tension homologue), KAP (kinase associated phosphatase), LMW (low molecular weight phosphatase) ou encore Mce1 (mammalian cell entry). Le motif HCX₅R contenu dans la boucle du site actif ainsi que les cinq premiers résidus de l'hélice alpha contigüe sont représentés (Rudolph 2007).

Dans ce motif, H correspond à un résidu histidine, C correspond à la cystéine catalytique, R correspond à un résidu arginine nécessaire à la fixation au phosphate du substrat ainsi qu'à la stabilisation de cette liaison. Les cinq résidus X forment une boucle qui permet d'établir le lien entre la liaison hydrogène amide et le phosphate du substrat (Fig. 17).

La présence de ce motif hautement conservé est le seul point commun entre les CDC25 et les autres PTP. En effet, le site actif des CDC25 est très différent de celui des autres PTP. Contrairement à ces dernières, les structures cristallines des CDC25 A et B montrent un domaine catalytique superficiel, peu profond et suffisamment relâché pour permettre l'accès de substrats porteurs de résidus pThr ou pTyr (Fauman *et al.* 1998 ; Reynolds *et al.* 1999). Le domaine catalytique est organisé en une série de feuillets bêta intercalés entre quatre hélices alpha réparties de part et d'autre. Le motif HCX₅R surplombe une longue hélice alpha organisée en boucle P (*Phosphate Binding-loop*). Cet agencement facilite la déprotonation de la cystéine catalytique. Le résidu arginine et les cinq résidus X du motif HCX₅R forment des liaisons hydrogènes avec les atomes d'oxygène présents au niveau du groupement phosphate du substrat (Rudolph 2007).

Comme évoqué précédemment, l'élucidation des structures des domaines catalytiques des isoformes A et B a révélé un site actif lâche et exposé mais pas de site profond et spécifique pour la reconnaissance d'un substrat ou d'un inhibiteur (Sohn *et al.* 2007). La reconnaissance du substrat semble intervenir par une interaction large entre les deux surfaces protéiques. Certains inhibiteurs exercent leur activité par modification des cystéines du site actif (Jiang & Zhang 2008 ; Contour-Galcerà *et al.* 2007).

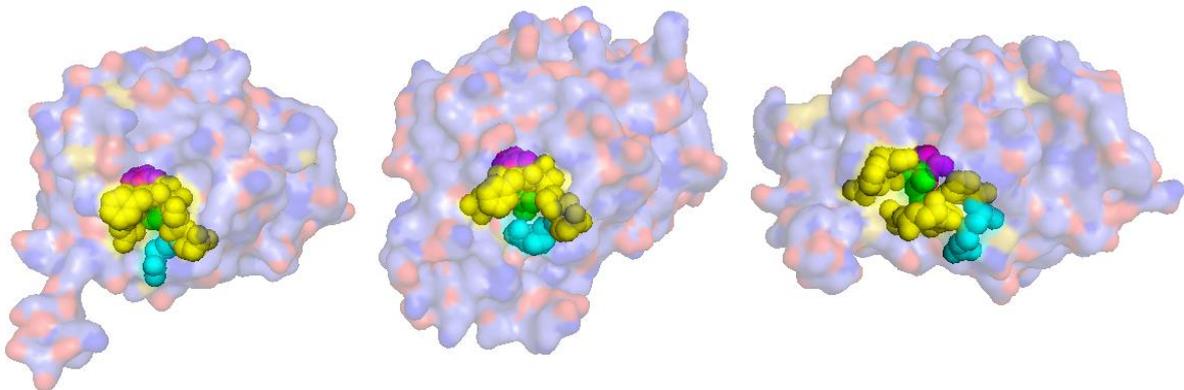


Fig. 17. Structure du motif HCX₅R des CDC25. De gauche à droite, CDC25 A, B et C représentées par le logiciel PyMOL :référence Protein Data Bank 1C25 (site actif CDC25A), 1CWR (site actif CDC25B) et 3OP3 (CDC25C). Le résidu histidine (en rose) est accolé derrière la cystéine catalytique (en vert), le résidu arginine (en bleu) surplombe le site actif et les cinq résidus X (en jaune) forment la boucle.

2. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des PTPs s'effectue en deux étapes successives (Fig. 18). La première étape implique l'altération du groupement phosphate du substrat par le groupement thiol non protoné de la cystéine catalytique qui va former une liaison covalente phospho-cystéine intermédiaire, hydrolysée dans la seconde partie du mécanisme grâce à une molécule d'eau.

Dans la plupart des PTPs, le mécanisme catalytique fait aussi appel à un acide catalytique qui fournit le proton au groupement thréonyl ou tyrosyl. Il s'agit généralement d'un acide aspartique situé sur une boucle à proximité du site actif. Cependant pour les phosphatases CDC25, aucune boucle ne semble correspondre à cet acide catalytique. Il est suggéré par certaines études que cet acide pourrait être directement porté par le substrat (Chen *et al.* 2000 ; Rudolph 2007). Toutefois, plus récemment, une étude a suggéré que le résidu Glu474 pourrait jouer ce rôle pour CDC25B (Arantes 2008).

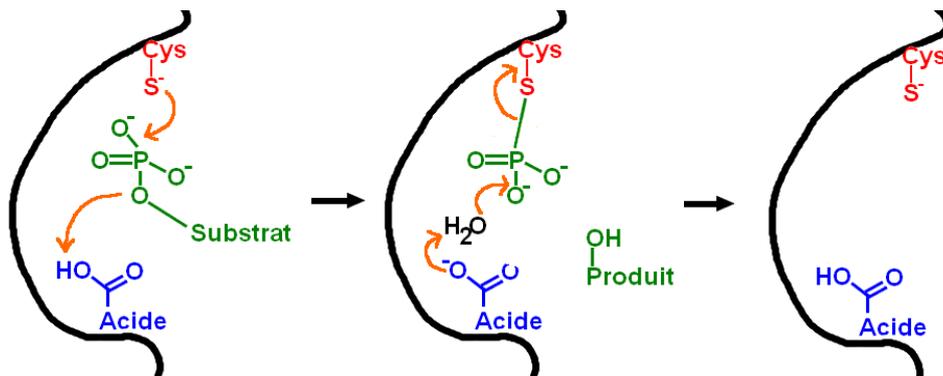


Fig. 18. Mécanisme catalytique des PTP. Adapté de Rudolph 2007.

3. Intervention des isoformes dans le cycle cellulaire

Comme décrit précédemment (II.2), les isoformes CDC25 jouent un rôle essentiel dans les transitions G₁/S, G₂/M et dans le déroulement de la mitose, *via* la régulation des CDK (Fig. 19, Fauman & Saper 1996 ; Rudolph 2002 ; Rudolph 2007).

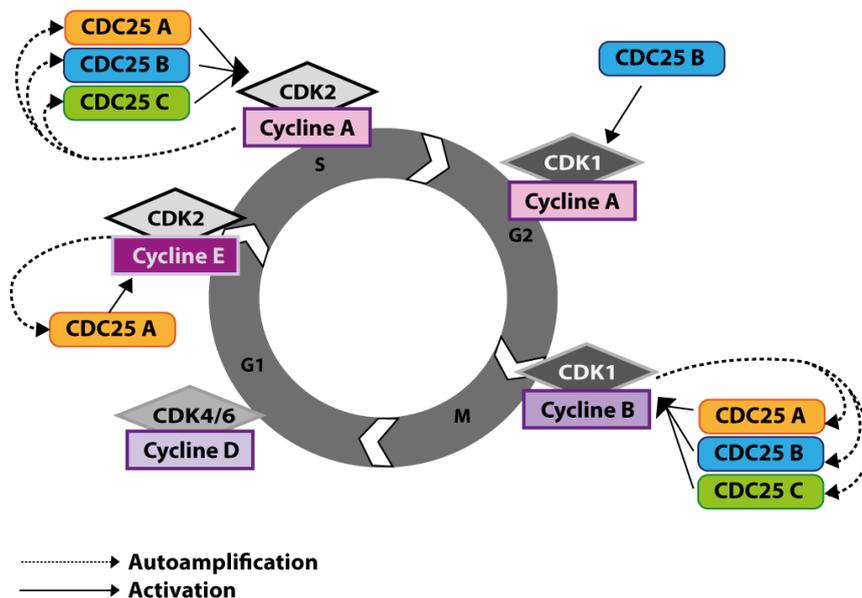
L'intervention de chacune des isoformes dans le cycle a été étudiée (Boutros *et al.* 2006):

- CDC25A intervient essentiellement avec les complexes CDK2-cycline E et CDK2-cycline A qui contrôlent la transition des phases G₁/S et la progression dans la phase S.

L'isoforme A interagit également avec le complexe CDK1-cycline B impliqué dans la transition G₂/M (Hoffmann & Karsenti 1994 ; Jinno *et al.* 1994 ; Mizoguchi & Kim 1997) ;

- CDC25B cible le complexe CDK1-cycline B localisé dans les centrosomes et impliqué dans la dynamique des microtubules au cours de la prophase. Cette isoforme est aussi capable de déphosphoryler et d'activer les complexes CDK2-Cycline A et CDK2-Cycline E (Fauman & Saper 1996 ; Gabrielli *et al.* 1996) ;
- CDC25C intervient dans chacune des phases du cycle cellulaire et joue un rôle dans la transition G₂/M en ciblant le complexe CDK1-Cycline B (Izumi & Maller 1995 ; Zwicker *et al.* 1995).

Les trois isoformes de CDC25 sont impliquées dans une boucle d'autoamplification induite par les complexes CDK-Cycline : lorsque le complexe CDK2-cycline E est déphosphorylé par CDC25A, le complexe actif est capable de phosphoryler CDC25A, et ainsi, d'augmenter son activité. De la même manière le complexe CDK1-cycline B interagit avec CDC25 B et C une fois activé, et phosphoryle les CDC25 en retour.



*Fig. 19. Implication des isoformes de CDC25 dans la régulation des complexes CDK-Cyclines. Adapté de Contour-Galcerá *et al.* 2007*

Il existe une redondance fonctionnelle apparente entre les différentes isoformes de CDC25, elle est sujette à controverse. En effet, une étude a démontré que des souris « *knock-out* » pour CDC25 B et C étaient capables de se développer normalement, ce qui suggère que CDC25A est capable de remplacer les fonctions des isoformes B et C, où qu'un autre mécanisme assure ce remplacement (Ferguson *et al.* 2005). Cependant, CDC25B a été décrit comme jouant un rôle essentiel dans la méiose chez la souris femelle, ce qui suggère que la redondance fonctionnelle entre les différentes isoformes est limitée (Lincoln *et al.* 2002).

4. Régulation des CDC25

Afin d'assurer la bonne régulation des complexes CDK-cycline, l'activité des CDC25 est elle-même hautement régulée à chaque phase du cycle cellulaire (Garner-Hamrick & Fisher 1998). Cette régulation se fait par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes tels que la modulation de la quantité protéique de CDC25 présentes dans les différentes phases du cycle cellulaire, la localisation cellulaire des différentes isoformes de CDC25, mais aussi *via* des mécanismes redox (Ducommun *et al.* 1990; Rudolph 2007). Chacun de ces mécanismes est en liaison avec des phosphorylations particulières de résidus sérine et thréonine des CDC25.

Abondance au cours du cycle

La quantité de CDC25 présente dans les cellules dépend directement des vitesses de synthèse et de dégradation de la protéine. Elle varie selon les isoformes et le stade du cycle cellulaire considéré.

La quantité de CDC25A fluctue au cours du cycle cellulaire, cette isoforme est relativement instable, sa synthèse est continuellement induite par deux facteurs de transcription c-Myc et E2F-1 (Galaktionov *et al.* 1996 ; Vigo *et al.* 1999). Elle commence à la fin de la phase G₁ et se poursuit jusqu'en mitose. Ce mécanisme de synthèse est modéré en phase S et G₂ par une protéolyse ubiquitine dépendante simultanée qui permet de maintenir un niveau constant de protéines nécessaires à la déphosphorylation des CDK2. Ce système de balance fait intervenir le complexe SCF β TrCP (*skp1/Cullin/F-box β transducin repeat-containing protein*) qui reconnaît la phosphorylation de résidus sérine contenus sur un motif DSG (Fig. 20). En fin de mitose et au cours de la phase G₁, les enzymes sont massivement dégradées par l'intermédiaire du complexe APC/C (*anaphase promoting complex*) qui induit une

ubiquitination suite à la reconnaissance de la présence d'un motif KEN (Donzelli & Draetta 2003 ; Busino *et al.* 2004). Les isoformes B s'accumulent progressivement au cours de la phase S pour atteindre un maximum en mitose, s'en suit une dégradation similaire à celle observée pour les isoformes A *via* le système SCF β TrCP. La quantité de CDC25C est quant à elle relativement constante tout au long du cycle cellulaire, cette isoforme est plus stable que les deux autres, elle possède une demi-vie plus longue.

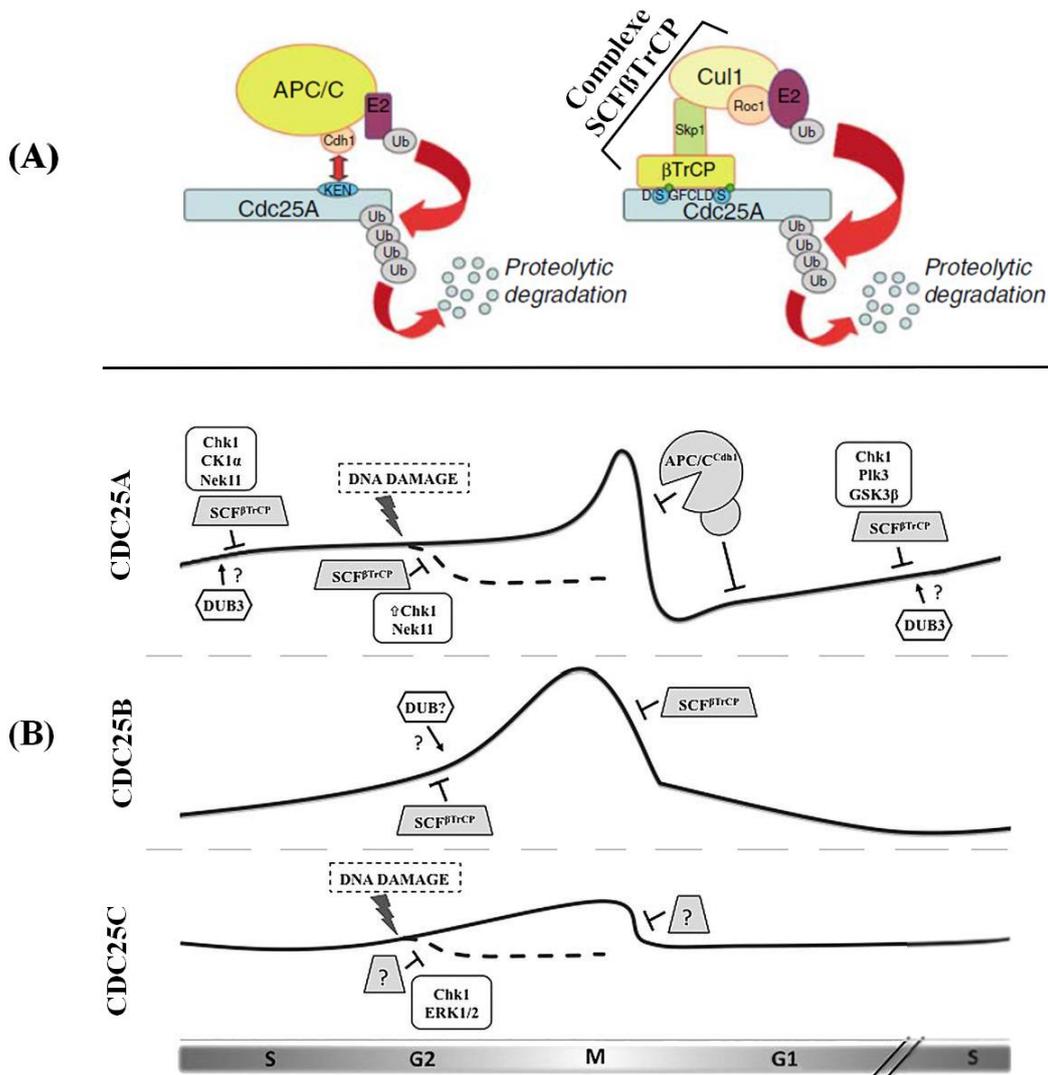


Fig. 20. Mécanismes de protéolyse des CDC25A (A). Variations du niveau protéique des CDC25 au cours du cycle (B). (Busino *et al.* 2004 ; Young & Pagano 2010).

Localisation subcellulaire

Les différentes isoformes sont amenées à changer de localisation intracellulaire lors des différentes phases du cycle. Ce sont le facteur de relocalisation cytoplasmique 14-3-3 et les séquences de localisation NLS et NES qui vont permettre le changement de localisation au cours du cycle.

Ces séquences de localisation sont situées dans la région N-terminale des CDC25 (Davezac *et al.* 2000 ; Lindqvist *et al.* 2004). Lorsque la séquence NLS est reconnue par une importine, l'importation dans le noyau au travers des pores nucléaires est alors rendue possible. Dans le noyau, la protéine Ran-GTP va permettre le détachement de l'importine et son retour dans le cytoplasme. La séquence NES est quant à elle reconnue par une exportine dans le noyau, la protéine Ran-GTP va se lier à l'exportine et permettre l'exportation des CDC25 hors du noyau. Une hydrolyse par une GTPase permet alors le détachement de l'exportine et la libération de CDC25 dans le cytoplasme.

Le facteur de relocalisation cytoplasmique 14-3-3 est capable de séquestrer les CDC25 dans le cytoplasme, empêchant leur accumulation dans le noyau et inhibant ainsi l'activation des CDK (Conklin *et al.* 1995 ; Peng *et al.* 1998). La reconnaissance des CDC25 par ce facteur est rendue possible par la phosphorylation de certains résidus. La phosphorylation de la sérine 178 et de la thréonine 507 des isoformes A permet la liaison du complexe (Chen *et al.* 2003). Il existe trois sites de liaison pour CDC25B : les sérines 151 et 230 dans le domaine N-terminal et la sérine 323 non loin du site catalytique (Giles *et al.* 2003). La phosphorylation du résidu thréonine 216 de CDC25C permet elle aussi la fixation du complexe (Bulavin *et al.* 2003).

Il est à noter que la localisation des CDC25 peut varier entre différents variants d'épissage, c'est la raison pour laquelle la localisation des isoformes B est mal définie. Bien que les isoformes soient régulées par le facteur 14-3-3, certaines semblent persister préférentiellement dans le noyau (Uchida *et al.* 2004).

La séquestration par le facteur 14-3-3 dans le cytoplasme est levée par sa dissociation avec CDC25. Ce détachement est rendu possible lorsque certains résidus sérine sont phosphorylés, c'est par exemple le cas pour le résidu 169 de CDC25B (Astuti & Gabrielli 2011 ; Margolis *et*

al. 2006). La dissociation permet alors la reconnaissance des séquences NLS par le système d'importation nucléaire, ce qui induit une translocation des protéines vers le noyau.

Modulation par les dommages à l'ADN

En plus des systèmes de régulation présentés précédemment et intervenant au cours d'un cycle « normal » sans incidents, un système d'inhibition des CDC25 induit par des dommages à l'ADN est possible (Fig. 21).

Les anomalies et dommages à l'ADN font notamment intervenir la phosphorylation des résidus sérines par les voies CHK1/CHK2 et C-TAK1, ce qui permet la liaison du facteur 14-3-3 aux CDC25 et leur séquestration (Matsuoka 1998 ; Manke *et al.* 2005 ; Blasina *et al.* 1999).

En plus de cette séquestration, la dégradation des isoformes A est stimulée par l'activation de la voie ATM/ATR qui induit une phosphorylation de plusieurs résidus sérines (76, 82, 124, 178, 279 et 293), mais aussi par la voie p38 MAP kinase qui induit elle aussi la phosphorylation de deux résidus serine (76 et 124 pour l'isoforme A). Ces phosphorylations déclenchent l'ubiquitination des isoformes A par l'intermédiaire du complexe SCF β TrCP (Busino *et al.* 2004). Un autre mécanisme fait intervenir une voie p53 dépendante qui permet une inhibition de l'expression des CDC25A par l'activation du répresseur transcriptionnel ATF3, ce qui assure le maintien de l'inhibition (Demidova *et al.* 2009).

Tous ces mécanismes induisent l'inactivation des complexes CDK-cyclines et l'arrêt de la progression de la cellule anormale dans le cycle. Les isoformes B et C sont elles aussi susceptibles d'être inhibées par ces systèmes (Bulavin *et al.* 2001 ; Donzelli *et al.* 2002).

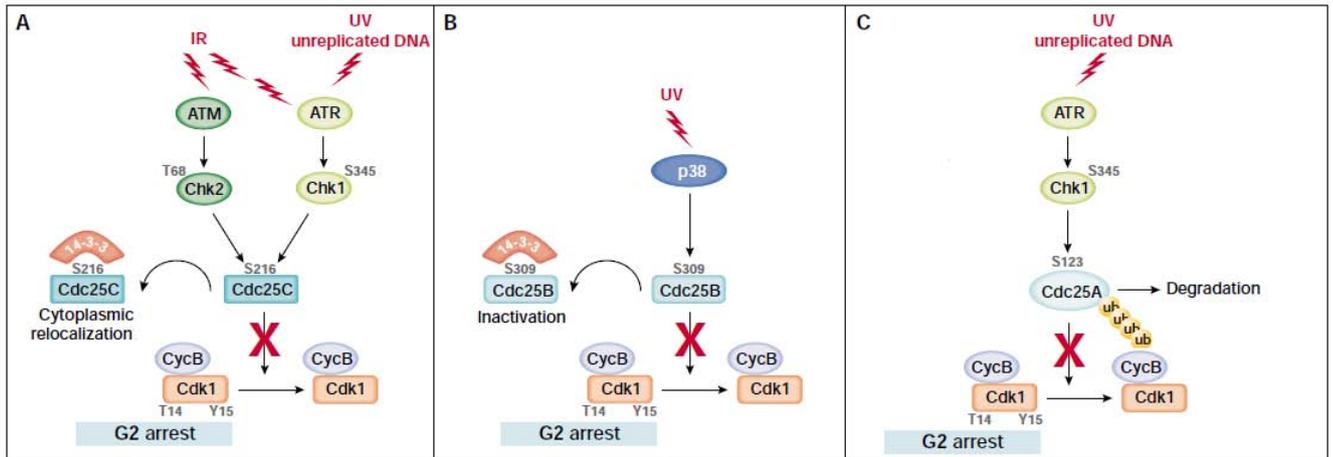


Fig. 21. Exemple de trois systèmes d'inhibition des CDC25. (A) Activation du système de séquestration 14-3-3. (B) Activation de la voie inactivatrice p38, (C) Activation de la voie de dégradation ubiquitine dépendante.

Adapté de Donzelli & Draetta 2003.

Phosphorylations activatrices des CDC25

L'activation des phosphatases CDC25 est elle aussi influencée par des mécanismes de phosphorylation (Fig. 22). En mitose, l'isoforme A est phosphorylée par le complexe CDK1-Cycline B sur deux résidus sérine de la région N-terminale (18 et 116) ainsi que par une kinase PLK (*polo-like kinase*) sur d'autres résidus sérine/thréonine de cette région. Ces phosphorylations permettent la stabilisation de CDC25A et empêchent sa dégradation par la voie ubiquitine dépendante. C'est ainsi que s'établit la boucle d'autoamplification décrite précédemment (Mailand *et al.* 2002 ; Wang *et al.* 2007 ; Zhao *et al.* 2008).

Les phosphorylations sont donc au cœur de la régulation des CDC25, qu'elles soient activatrices ou inhibitrices comme présentées précédemment, elles sont essentielles pour leur activité.

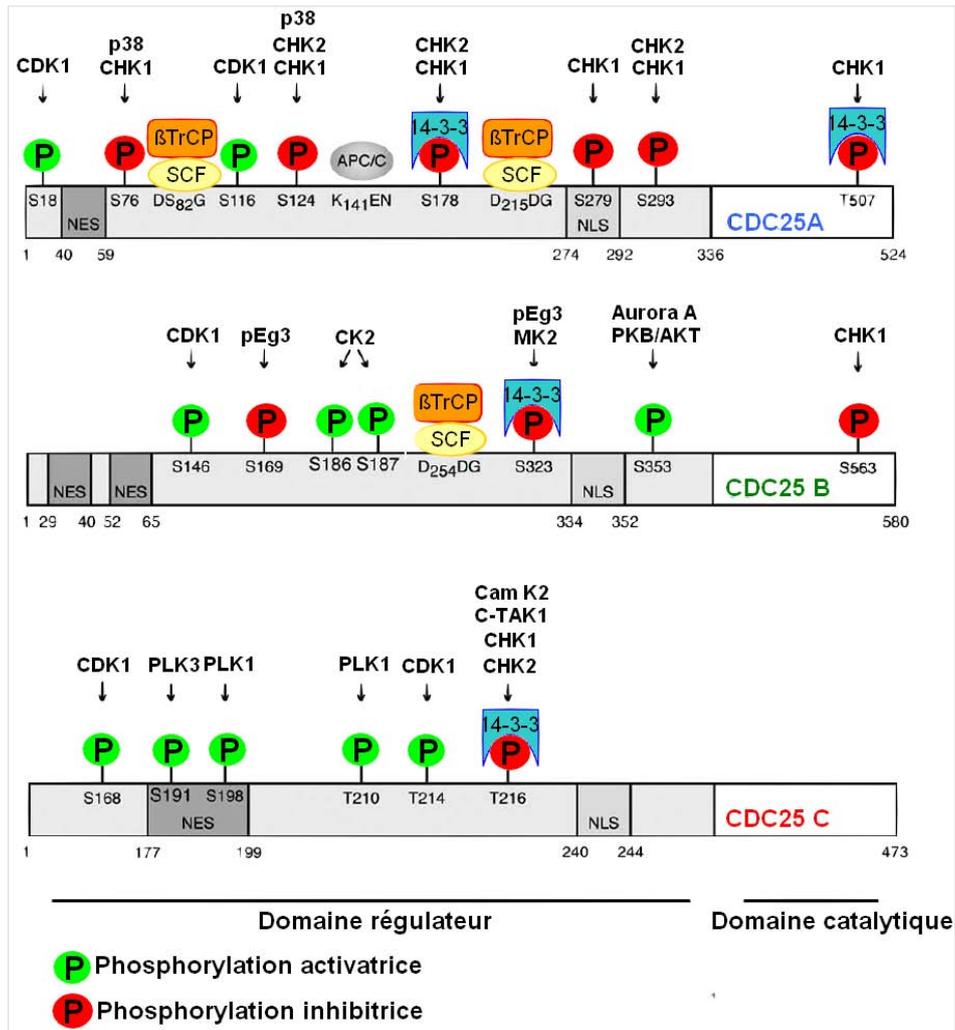


Fig. 22. Différentes phosphorylations des CDC25. Adapté d'Aressy & Ducommun 2008

Régulation redox

Les résidus cystéines clés des sites catalytiques des CDC25 possèdent des pKa faibles, il est par exemple de l'ordre de 5,8 pour CDC25B tandis qu'il est généralement de 8,3 pour les autres PTPs. C'est la conformation particulière du site actif qui en est à l'origine. L'hélice alpha qui porte le site actif à son extrémité, le résidu arginine et les liaisons peptidiques entre les résidus X du motif HCX₅R favorisent ce faible pKa (Rudolph 2005).

Cette caractéristique les rend plus sensibles aux espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou l'anion superoxyde (O₂^{•-}) (Sohn *et al.* 2003). L'oxydation modérée de la forme thiolate des cystéines du site actif des CDC25 conduit à la formation

d'un acide sulfénique X-SO très réactif et instable qui peut donner par la suite un acide sulfinique (X-SO₂) ou sulfonique (X-SO₃) sous l'effet d'un fort stress oxydant.

Lorsque la cystéine réagit suite à un stress oxydant modéré, l'acide sulfénique formé est susceptible de réagir avec une cystéine située non loin du site actif (*cystein backdoor*) et forme un pont disulfure (Fig. 23, Buhrman *et al.* 2005 ; Rudolph 2005). Cette réaction entraîne un changement de conformation spatiale du site actif et bloque l'accès du substrat. Par ailleurs, ce changement conformationnel faciliterait la reconnaissance par le facteur 14-3-3 et la séquestration de CDC25 dans le cytoplasme (Savitsky & Finkel 2002).

La formation d'acide sulfénique est généralement réversible grâce à leur réduction par le glutathion cellulaire et la thioredoxine, l'enzyme récupère alors sa capacité enzymatique. Un tel mécanisme permet donc une régulation des CDC25 par les ERO. En revanche, lorsque l'oxydation passe le stade de l'acide sulfinique, la réaction est irréversible.

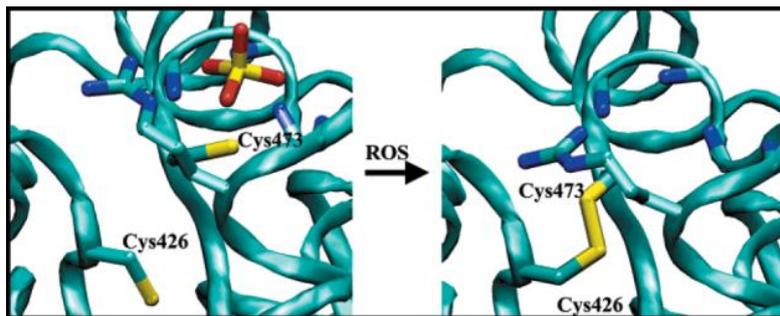


Fig. 23. Formation d'un pont disulfure entre la cystéine du site actif et la cystéine backdoor dans CDC25B.
(Sohn & Rudolph 2003)

Par ailleurs, ce mécanisme semble entre autre intervenir lors de la réponse aux dommages à l'ADN et induit une dégradation de l'isoforme C en phase G₂/M (Savitsky & Finkel 2002).

IV. CDC25 et Cancer

1. Surexpression dans les cancers

Comme décrit précédemment, les trois isoformes de CDC25 jouent un rôle primordial dans la régulation du cycle cellulaire et elles sont elles-mêmes régulées tout au long du cycle dans le but de maintenir des niveaux d'activités adéquats des complexes CDK-cyclines. Une dérégulation des activités des complexes CDK-Cyclines est fréquemment observée dans les cancers. Un nombre important d'études (Kristjansdottir *et al.* 2004 ; Boutros *et al.* 2006) ont mis en évidence la relation qui existe entre une surexpression des CDC25 et un mauvais pronostic du cancer associé. Les phosphatases CDC25 peuvent donc constituer des cibles de choix pour le développement de thérapies anticancéreuses (Contour-Galcera *et al.* 2007).

La surexpression des CDC25 A, B et C dans les cancers humains a été mise en évidence par de nombreuses études. Les données ont montré qu'il existe une corrélation entre le niveau de surexpression et certaines caractéristiques clinicopathologiques telles que le grade de la tumeur et la survie.

Plus particulièrement, la surexpression des isoformes A et B a été observée dans les cancers mammaires, ovariens, prostatiques, pulmonaires, colorectaux, œsophagiens, thyroïdiens, laryngés, hépatocellulaires, gastriques, pancréatiques, endométriaux, ainsi que dans les cancers de la tête et du cou, dans les neuroblastomes, les gliomes et les lymphomes non Hodgkiniens (Fig. 24, voir Boutros *et al.* 2007 et Kristjansdottir *et al.* 2004 pour des revues complètes). Dans les cancers du sein, les CDC25 A et B sont surexprimés dans 70% et 57% des cas respectivement. De plus, dans la plupart des cas ces surexpressions sont corrélées avec une sur-activation des CDK2, une agressivité maligne augmentée, un mauvais pronostic vital et des tumeurs de stade critique (Cangi *et al.* 2000 ; Bonin *et al.* 2006).

La surexpression de CDC25C est peu décrite dans la littérature car cette isoforme a été moins étudié en comparaison des isoformes A et B, il existe toutefois plusieurs études qui l'évoquent. Une surexpression de CDC25C a été mise en évidence dans 63% des carcinomes vulvaires. Cette surexpression a pu être corrélée avec des caractéristiques clinicopathologiques d'agressivité tels que le stade tumoral avancé, la présence de métastases ganglionnaires ou encore un diamètre tumoral important (Wang *et al.* 2010).

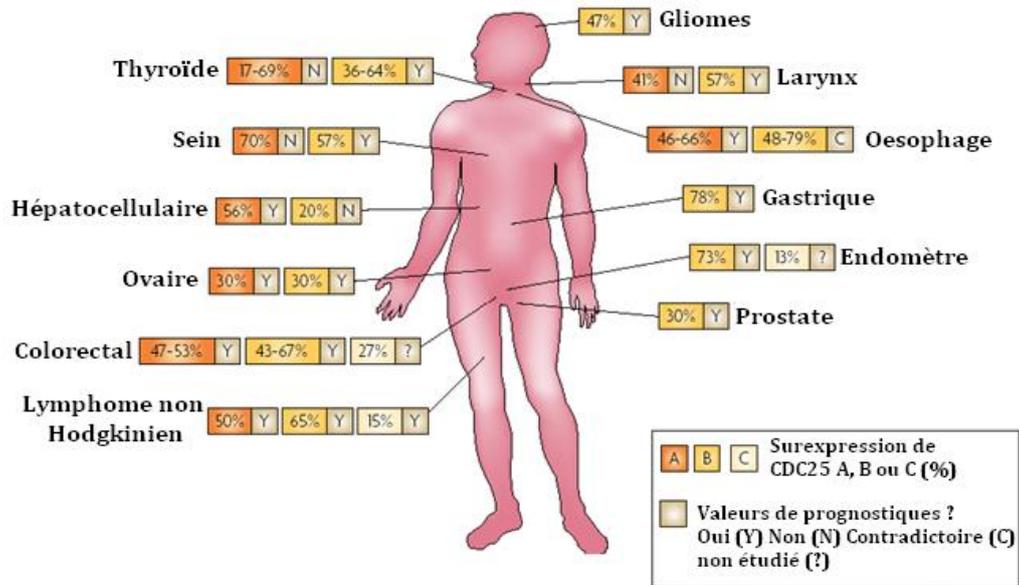


Fig. 24. Surexpression de la protéine CDC25 dans les cancers chez l'Homme. Le lien avec des caractéristiques clinicopathologiques est donné par Oui (Y) ou Non (N), ces caractéristiques incluent le stade de la tumeur, la présence de métastases, la profondeur invasive, le caractère résiduel ou récurrent de la maladie et la survie (Boutros et al. 2007).

2. Surexpression transcriptionnelle, protéique et agressivité tumorale

Plusieurs techniques ont été utilisées pour analyser les niveaux d'ARN ou de protéines des CDC25 dans les cohortes de patients. Un manque de corrélation entre ces deux niveaux a été plusieurs fois souligné. Ainsi les ARNm de l'isoforme B sont surexprimés dans 80% des neuroblastomes, tandis que le niveau protéique est seulement surexprimé de 5% dans les mêmes échantillons (Sato *et al.* 2001). D'autres études montrent par exemple que dans le cancer du sein, les niveaux d'ARNm sont surexprimés de 32% et les niveaux protéiques de 57% (Ito *et al.* 2004 ; Galaktionov *et al.* 1995). De la même manière, les niveaux du transcrite A et de la protéine correspondante sont surexprimés respectivement de 52 et 70% dans les patients atteints d'un cancer du sein (Cangi *et al.* 2000 ; Ito *et al.* 2004).

Le manque de corrélation entre le nombre de transcrits et la quantité de protéines suggère que les CDC25 peuvent être dérégulées à n'importe quelle étape entre leur transcription et leur traduction. Il faut souligner que ce manque de corrélation peut refléter le manque de connaissances concernant les variants de CDC25 et l'incapacité à déceler précisément leur abondance dans les cellules cancéreuses jusqu'à présent.

Bien que les isoformes A et B soient surexprimées de manière significative dans les cancers colorectaux, seule l'isoforme B semble être liée à l'agressivité de ce cancer (Boutros *et al.* 2007). En plus des différences d'expression qui existent entre les différentes isoformes, des différences existent aussi entre les variants d'épissage de chacune des isoformes. L'analyse de ces variants d'épissage a montré dans certaines études que certains variants sont plus exprimés que d'autres dans les cancers. Par exemple le transcrit B3 est bien plus surexprimé dans les cancers pancréatiques que les transcrits B1 et B2, tandis que le variant B2 prédomine dans les tumeurs colorectales de haut grade (Guo *et al.* 2004 ; Talvinen *et al.*).

La nature contradictoire des données entre les ARNm et les protéines reflète la complexité du lien qui existe entre CDC25 et le cancer.

3. Mécanismes inducteurs

Les causes de la surexpression de CDC25 peuvent être multiples. Aucune évidence d'une surexpression découlant d'une amplification ou d'un réarrangement génétique n'a été établie jusqu'à présent. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'impossibilité de comparer la quantité d'ARNm et le niveau protéique suggère que les CDC25 peuvent être dérégulées à n'importe quel niveau, aussi bien par des modifications post-transcriptionnelles que post traductionnelles.

Au niveau transcriptionnel, les niveaux d'isoformes A et B sont des cibles du proto-oncogène c-MYC (Galaktionov *et al.* 1996) et il existe une corrélation entre l'expression de c-MYC et le niveau des CDC25A dans le cancer du sein (Galaktionov *et al.* 1996) ainsi que dans les lymphomes non-Hodgkiniens (Hernández *et al.* 1998). La même corrélation existe dans les cancers du poumon pour CDC25B (Sasaki *et al.* 2001). La quantité de transcrits CDC25 peut être augmentée en réponse à une transformation cellulaire par un virus. C'est le cas des ARNm qui codent CDC25B dans les cellules fibroblastiques transformées par les protéines des virus SV40, E6 ou E7 (papillomavirus). De la même manière, les ARNm de l'isoforme A sont surexprimés dans les fibroblastes quiescents infectés par la protéine adénovirale E1A, cette surexpression étant accompagnée d'une augmentation de l'activité des CDC25 (Spitkovsky *et al.* 1996). Ces données suggèrent donc que les promoteurs des CDC25 sont des cibles spécifiques de certains facteurs de transcription et protéines virales impliquées dans le processus de transformation cellulaire.

Au niveau post-traductionnel, la demi-vie de CDC25A peut être augmentée dans les cellules tumorales de cancer du sein (Löffler *et al.* 2003). En effet une amélioration de la stabilité des protéines est possible lors de leur interaction avec la protéine Dub3, capable d'hydrolyser la queue polyubiquitinylée de CDC25A dans les cellules tumorales. Cette protéolyse rend impossible la dégradation des isoformes A par la voie ubiquitine-dépendante, et elles voient ainsi leur demi-vie augmenter. Cette interaction a été mise en évidence dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein (Pereg *et al.* 2010), notamment BT-20, ZR-75-1, MT3, MDA-MB-231 ou encore la lignée MDA-MB-435 utilisée à tort pendant longtemps en tant que lignée de cancer du sein mais étant en réalité la lignée de mélanome M14 (Rae *et al.* 2007).

Considérant le rôle du protéasome dans la régulation des CDC25, il est possible que des variations dans cette régulation soient à l'origine de la surexpression protéique des CDC25 dans différents types de cancers. Ainsi la mutation des kinases CHK dans plusieurs cancers tels que le cancer du sein, du colon, du poumon ou encore des ovaires, pourrait être liée à une augmentation de stabilité des CDC25 et donc à leur surexpression, toutefois les données actuelles ne permettent pas de l'affirmer (Boutros *et al.* 2007).

Bien que plusieurs études aient mis en évidence le lien direct entre la surexpression des CDC25 et leur contribution à la tumorigenèse, il apparaît que cette surexpression ne peut pas causer à elle seule un cancer. *In vitro*, la coexpression des isoformes A et B coopère avec d'autres oncogènes tels que HRAS pour transformer les fibroblastes embryonnaires de souris, ce qui les rend capables de former des tumeurs de grade élevé *in vivo* une fois réinjectées (Galaktionov *et al.* 1995). De la même manière, la surexpression des isoformes A dans les souris MMTV-v-Ha-Ras ou MMTV-c-neu induit une croissance tumorale accélérée, une désorganisation de la prolifération cellulaire ainsi que de multiples aberrations chromosomiques (Ray *et al.* 2007).

4. Mécanismes pro-tumorigènes

Considérant le rôle clé joué par les CDC25 lors des transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire, la surexpression de ces enzymes, et donc de leur activité potentielle, peut induire une suractivation des complexes CDK-cyclines. Cette suractivation peut forcer la cellule à progresser dans le cycle alors même qu'elles sont porteuses d'aberrations génétiques qui auraient normalement conduit à un arrêt du cycle. Ce mécanisme est documenté par des

expériences qui montrent que la surexpression de l'isoforme B permet aux cellules en phase S ou G2 de passer rapidement en mitose, alors même que leur matériel génétique n'est pas complètement répliqué (Karlsson *et al.* 1999). La surexpression de CDC25A accélère l'entrée dans la phase S ou induit des incidents mitotiques.

Inversement, l'injection d'anticorps anti CDC25 B ou C induit un arrêt en phase G2 tandis que les anticorps anti CDC25A causent un arrêt en phase G1 (Blomberg & Hoffmann 1999 ; Molinari *et al.* 2000 ; Sexl *et al.* 1999).

Une progression inappropriée du cycle de division cellulaire nécessite l'intervention des mécanismes de contrôle ATM/ATR. Si les CDC25 sont surexprimées, un tel système de dégradation peut éventuellement être débordé par la quantité de protéines à dégrader. Ainsi les CDC25 surexprimées non séquestrées par le groupement 14-3-3 et non dégradées par la voie ubiquitine dépendante peuvent être suffisamment nombreuses pour continuer à activer les complexes CDK-cyclines.

La surexpression des isoformes B induit une sortie prématurée du point de contrôle induit par un stress génotoxique, CDC25B est par ailleurs essentielle pour la reprise de la progression dans le cycle cellulaire après un arrêt causé par le point de contrôle des dommages à l'ADN (Van Vugt *et al.* 2004). Des résultats équivalents ont été mis en évidence avec l'isoforme A dont la surexpression permet de court-circuiter le point de contrôle de la phase S (Falck *et al.* 2001).

L'ensemble des données qui corrélient la surexpression de CDC25 et le cancer suggèrent que cet effet s'exerce à différents moments de la tumorigenèse et contribue à la progression de la maladie en causant une instabilité génomique *via* la dérégulation du cycle cellulaire, le court-circuitage des points de contrôle et la coopération avec des oncogènes.

Les CDC25 sont donc au centre du mécanisme du cycle cellulaire et impliquées dans la cancérogenèse ce qui en fait des cibles potentielles pour les thérapies anticancéreuses.

5. Ciblage thérapeutique

L'inhibition des CDC25 induit un arrêt du cycle cellulaire généralement réversible. Compte tenu de la courte demi-vie des CDC25, il est ainsi possible que les cellules reprennent le cours

de leur cycle après un certain temps. Toutefois, il a été observé dans de nombreux modèles cellulaires qu'un arrêt imprévu peut-être délétère pour la cellule, tout comme un arrêt prolongé du cycle (Boutros *et al.* 2007). Cette inhibition entraîne alors l'amorçage d'un programme apoptotique. Il est par ailleurs envisageable de combiner l'inhibition des CDC25 avec un autre traitement. Une association entre un inhibiteur de CDC25 (BN82685) et le paclitaxel (poison du fuseau mitotique) pourrait ainsi avoir un intérêt thérapeutique supplémentaire comme suggéré précédemment (Cazales *et al.* 2007).

Considérant le rôle central des CDC25 dans la cellule, le problème de sélectivité des agents thérapeutiques sur les cellules cancéreuses se pose de la même manière que pour les agents thérapeutiques classiques. Ainsi un inhibiteur des CDC25 devrait théoriquement bloquer le cycle des cellules tumorales et des cellules saines en même temps. Cependant, la surexpression des CDC25 dans certains types tumoraux suggère une sensibilité accrue à leurs inhibiteurs. Une étude démontre que les cellules d'adénocarcinome canalaire pancréatique qui surexpriment CDC25B, sont plus sensibles aux traitements que les lignées exprimant faiblement cette isoforme B (Guo *et al.* 2004). Ces résultats sont aussi décrits dans la lignée d'adénocarcinome colorectal HCT116 bien que les résultats n'aient pas été décrits avec précision (Boutros *et al.* 2007). De plus amples études devraient permettre de valider ces premières observations.

Compte tenu des multiples rôles joués par les différentes isoformes de CDC25 dans la cellule, la question de la sélectivité des inhibiteurs pour une isoforme ou l'autre a été discuté (Boutros *et al.* 2007). L'inhibition simultanée des trois isoformes par un seul composé permettrait un effet plus conséquent sur les cellules. Toutefois, en évaluant les différents niveaux de surexpression de chacune des isoformes dans un cancer donné, il pourrait être intéressant de cibler une isoforme afin de limiter les effets secondaires sur les cellules non cancéreuses. Néanmoins, l'inhibition globale des CDC25 permet de s'affranchir de la redondance fonctionnelle qui existe entre les isoformes.

Comme les connaissances sur la structure tridimensionnelle exacte du domaine C-terminal qui porte l'activité régulatrice restent encore limitées, il apparaît difficile d'envisager un *design* rationnel d'inhibiteurs spécifiques d'une isoforme particulière.

Certaines études suggèrent que l'induction d'une suractivation des CDC25 pourrait aussi constituer une approche thérapeutique. En effet le niveau d'expression de CDC25B est crucial dans la reprise du cycle après induction du point de contrôle G₂/M qui est activé par des dommages à l'ADN (Boutros *et al.* 2007). Une suractivation de cette isoforme pourrait par exemple forcer la cellule à continuer son cycle alors qu'elle comporte des dommages importants. Les cellules accumuleraient un nombre d'aberrations importantes, ne seraient plus viables et seraient donc susceptibles d'entrer en apoptose.

Cependant, aucun activateur de CDC25 qui permettrait de valider cette hypothèse n'a jusqu'à présent été découvert. Par ailleurs, le court-circuitage des points de contrôle pourrait avoir un effet inverse de celui désiré en favorisant la mutagenèse, la transformation carcinogénique et l'apparition de mutations qui rendraient les cellules encore plus agressives.

V. Les inhibiteurs de CDC25

Environ 42% des PTP connues chez l'homme interviennent dans la survie ou la mort des cellules cancéreuses (MacKeigan *et al.* 2005). Depuis une vingtaine d'année, la recherche d'inhibiteurs des PTP et notamment des phosphatases CDC25 a donc connu un essor important. Elle est toutefois en retard en comparaison avec la recherche d'inhibiteurs d'autres cibles telles que les kinases, protéines ayant un rôle opposé.

Ce retard peut notamment s'expliquer par le désintérêt envers l'inhibition des PTP. Ces protéines ont longtemps été considérées comme des inhibiteurs de la croissance, ce qui est directement lié à leur identification et à leur caractérisation tardive. Un regain d'intérêt pour ces enzymes a par la suite permis de mieux comprendre leurs fonctions d'une part et l'intérêt de leur inhibition dans le cadre d'une approche thérapeutique d'autre part.

Comme nous venons de l'exposer, les phosphatases CDC25 se trouvent au cœur de la régulation du cycle cellulaire et elles sont fortement régulées. Les mécanismes de régulation ainsi que les enzymes elles-mêmes sont autant de cibles potentielles pour leur inhibition. Un nombre important d'inhibiteurs de CDC25 a été décrit dans la littérature, leur structure est variée tout comme leur efficacité. De nombreuses revues détaillent ces divers inhibiteurs dont plusieurs classes principales se dégagent (Contour-Galcera *et al.* 2007 ; Brezak *et al.* 2008 ; Lavecchia *et al.* 2009 ; Lavecchia *et al.* 2010 ; Lavecchia *et al.* 2012a). La liste des inhibiteurs présentés dans ce chapitre est non exhaustive et vise à présenter les principales classes d'inhibiteurs et leur fonctionnement.

1. Mimes de groupement phosphate

Les substituts de groupement phosphate agissent en mimant le groupement phosphate des substrats de CDC25, se fixent à leur place et empêchent ainsi leur transformation en produit de réaction. Plusieurs structures ont été décrites dans la littérature, elles comprennent des sulfates, malonates, xanthates, groupements carboxyles mais aussi des ions métalliques (Ham S.W. & Carr B.I. 2004 ; Contour-Galcera *et al.* 2007).

Parmi ces composés se trouvent les dysidiolides, des dérivés de la vitamine D3 (Fig. 25, Gunasekera *et al.* 1996). Ils portent un résidu γ -hydroxybutenolide qui serait capable de mimer le phosphate d'un substrat. De nombreux composés similaires ont été testés (Dodo *et*

al. 2000 ; Takahashi *et al.* 2000 ; Shimazawa *et al.* 2004b ; Shimazawa *et al.* 2004a). Les meilleurs composés de cette série présentent des CI_{50} (Concentration qui inhibe 50% de l'activité) de l'ordre du micromolaire contre CDC25A et B. Dans ces structures, la longueur de la chaîne carbonée semble jouer un rôle important dans l'inhibition (Shimazawa *et al.* 2004b).

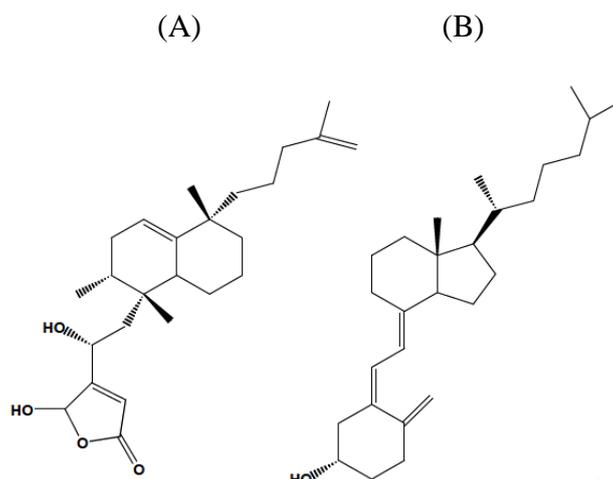


Fig. 25. Structure du Dysidiolide (A) et de la vitamine D3 (B) (Gunasekera *et al.* 1996).

Au laboratoire, une série de 10 anhydrides maléiques, dérivés de la structure dysidiolide, ont été synthétisés et testés sur les trois isoformes de CDC25 (Brault *et al.* 2007). Ces composés présentent des CI_{50} aux alentours de 4 μ M pour les plus actifs. La capacité antiproliférative de ces composés vis-à-vis de la lignée MCF-7 a été testée et a permis de mettre en évidence l'induction d'un blocage du cycle cellulaire et de l'apoptose dans cette lignée par les deux composés 1i et 1j (Fig. 26, Brault & Bagrel 2008). Par ailleurs, ces composés ont permis la potentialisation de l'adriamycine et du cisplatine sur des lignées sensibles et résistantes à ces composés.

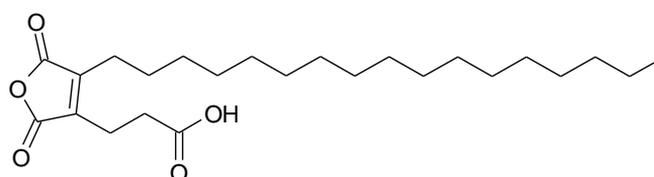


Fig. 26. Structure de l'anhydride maléique 1i (Brault *et al.* 2007)

Il existe une série de composés macrocycliques dérivés de stéroïdes capable de mimer le groupement phosphate par l'intermédiaire d'une structure rigide et d'un motif carbonyle. Dans cette famille, le composé 13 (Fig. 27) inhibe l'isoforme CDC25B avec une CI_{50} de 3,4 μ M. Néanmoins, cette série est relativement hydrophobe en raison de la longue chaîne secondaire alkyle, ce qui peut expliquer son manque d'efficacité dans les lignées cellulaires (Bäurle *et al.* 2004).

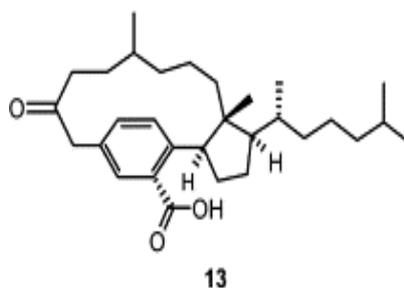


Fig. 27. Structure du composé 13 (Bäurle *et al.* 2004)

Plusieurs sester-terpénoïdes isolés d'un extrait d'éponge marine présentent eux aussi une inhibition vis-à-vis de CDC25B. L'acide maléique du sester-terpénoïde n°25 (Fig. 28) situé en extrémité de la chaîne carbonée agit comme un substitut de phosphatase dans la poche catalytique de CDC25, il présente une CI_{50} de 2,9 μ M contre CDC25B (Cao *et al.* 2005a ; Contour-Galcerà *et al.* 2007).

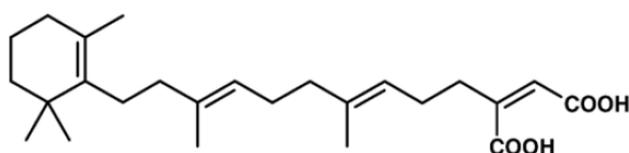


Fig. 28. Structure du sester-terpénoïde n°25.

2. Dérivés poly-soufrés

Les composés soufrés possèdent de nombreuses propriétés biologiques parmi lesquelles la capacité de réagir avec des groupements thiols par des réactions de thiolation (Münchberg *et al.* 2007). Compte tenu de la présence d'un groupement thiol très réactif au niveau de la cystéine du site catalytique des CDC25, ces composés présentent un intérêt. Une série de composés dérivés de l'ail et de l'oignon ont été extraits au laboratoire et testés pour leur

activité inhibitrice vis-à-vis des CDC25 (Viry *et al.* 2011). Ces composés présentent une inhibition vis à vis des trois isoformes de CDC25 avec une augmentation de cette inhibition associée au nombre d'atomes de soufre. Ainsi les diallyl et dipropyl tetrasulfures (Fig. 29) présentent des CI_{50} de l'ordre d'un micromolaire pour CDC25C. Ces composés limitent par ailleurs la prolifération des lignées de carcinomes mammaire humain MCF-7 et VCR-Res (lignée résistante à la vincristine). Cet effet est associé à un arrêt du cycle cellulaire.



Fig. 29. Structure du diallyl-tetrasulfure (gauche) et du dipropyl-tetrasulfure (droite).

3. Inhibiteurs électrophiles

Les composés électrophiles sont très réactifs et susceptibles de réagir avec la cystéine du site catalytique. Plusieurs composés qui exercent leur activité inhibitrice de cette manière contre CDC25 ont été décrits dans la littérature.

Par exemple la fascaplysine (Fig. 30), un alcaloïde isolé d'un extrait d'anémone de mer, présente une CI_{50} de 3,7 μ M à l'égard de CDC25B. Cette activité inhibitrice s'exerce au niveau de la cystéine catalytique, probablement *via* une inhibition électrophile (Cao *et al.* 2005b). D'autres composés électrophiles tels que les dérivés synthétiques de N-arylmaléimide ont été mis en évidence comme étant des inhibiteurs compétitifs des CDC25, qui se lient probablement à la cystéine du site actif, c'est le cas du composé PM-20 (Fig. 30), Kar *et al.* 2006).

Le composé BN82002 (Fig. 30) est une amine tertiaire qui n'est pas directement réactif mais qui est capable de se transformer en un composé électrophile de type accepteur de Michaël après une réaction d'oxydation de son noyau phénolique. Il s'agit d'un inhibiteur irréversible des CDC25, qui présente des CI_{50} comprises entre 2,4 et 5,4 μ M. BN82002 inhibe la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses telles que la lignée pancréatique MIA PaCa-2 ou la lignée colorectale HT-29. De plus il affecte la croissance de tumeurs xénogreffées chez la souris (Brezak *et al.* 2004).

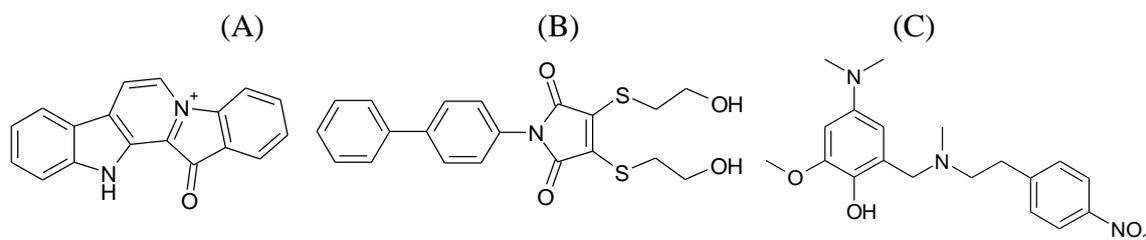


Fig. 30. Structure de la Fascaplysine (A), de PM-20 (B) et de BN82002 (C).

4. Dérivés thiophéniques

Plusieurs études de la littérature ont mis en évidence la capacité de composés thiazolés à inhiber les phosphatases CDC25. En effet, une série de thiazolopyrimidines inhibitrices de CDC25B a été décrite (CI_{50} aux alentours de $10 \mu\text{M}$), dont certaines sont capables d'induire une cytotoxicité dans les cellules HeLa (Kolb *et al.* 2009). Une autre équipe a découvert une structure quinone-thiazole, BN82685, qui fait partie des inhibiteurs les plus puissants de la littérature. Ses capacités inhibitrices de CDC25 (CI_{50} comprises entre $0,1$ et $0,2 \mu\text{M}$) et son fort potentiel inhibiteur vis-à-vis des cellules cancéreuses pancréatiques Mia PACA-2 xéno greffées chez la souris, en font l'un des meilleurs inhibiteurs décrits dans la littérature (Brezak *et al.* 2005).

Récemment, des dérivés bis-thiazolone ont été mis en évidence comme inhibiteurs de CDC25B (Sarkis *et al.* 2012). Cette série a la particularité de présenter des dérivés symétriques et asymétriques de structures thiazolones séparées par différents *linkers* (Fig. 31). La dimérisation de ces structures thiazolones permet ainsi une augmentation de l'activité inhibitrice vis à vis de CDC25B (CI_{50} environ égale à $3 \mu\text{M}$ pour les composés les plus actifs).

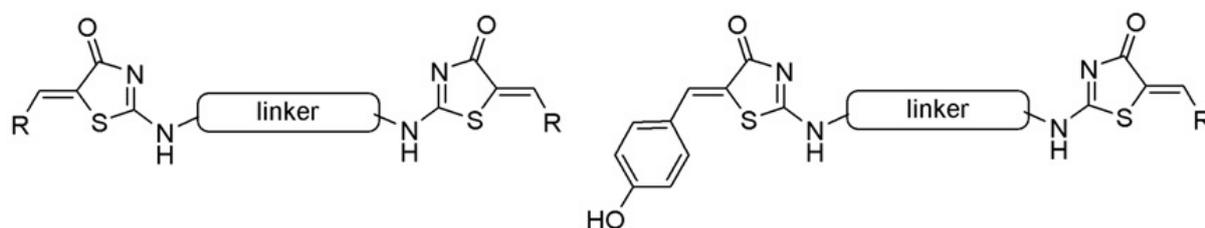


Fig. 31. Structure des composés bis-thiazolone (Sarkis *et al.* 2012)

5. Inhibiteurs à structures quinonoïques

La classe la plus importante d'inhibiteurs connus de CDC25 est celle des quinones. Elle comprend à ce jour les structures les plus inhibitrices, ce qui a largement contribué à la recherche d'inhibiteurs de ce type ces dernières années.

Structure

Le terme quinone désigne une famille de composés chimiques qui possède un motif cyclique benzène oxydé porteur de deux groupements carbonyles. Ces groupements peuvent être localisés en position ortho ou para, et forment ainsi les para-quinones et les ortho-quinones (Fig. 32).

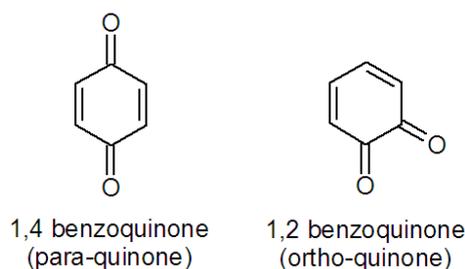


Fig. 32. Structure des quinones.

Ces formes simples de quinones sont peu courantes à l'état naturel, en revanche, des dérivés de quinones plus complexes existent dans la nature et possèdent des structures très diverses. Ils sont retrouvés notamment comme métabolites secondaires chez les plantes supérieures, mais aussi chez les mycètes, les bactéries et les animaux invertébrés (Romanova *et al.* 1977).

De très nombreux composés quinonoïques possèdent des propriétés thérapeutiques et sont reconnus comme faisant partie des substances actives des plantes médicinales. Les quinones naturelles possèdent des propriétés antioxydantes, anticancéreuses, antimicrobiennes mais sont aussi employées comme colorants des fibres naturelles ou de synthèse (Romanova *et al.* 1977 ; Monks *et al.* 1992 ; Lown 1983 ; Asche 2005).

Mode d'action antitumoral des quinones

Les mécanismes de cytotoxicité et d'inhibition de la croissance des quinones ont été très étudiés, plusieurs modes d'action ont été mis en évidence. Un de ces modes d'action découle

du cycle redox des quinones (Fig. 33) qui est responsable de l'émission importante d'espèces réactives de l'oxygène.

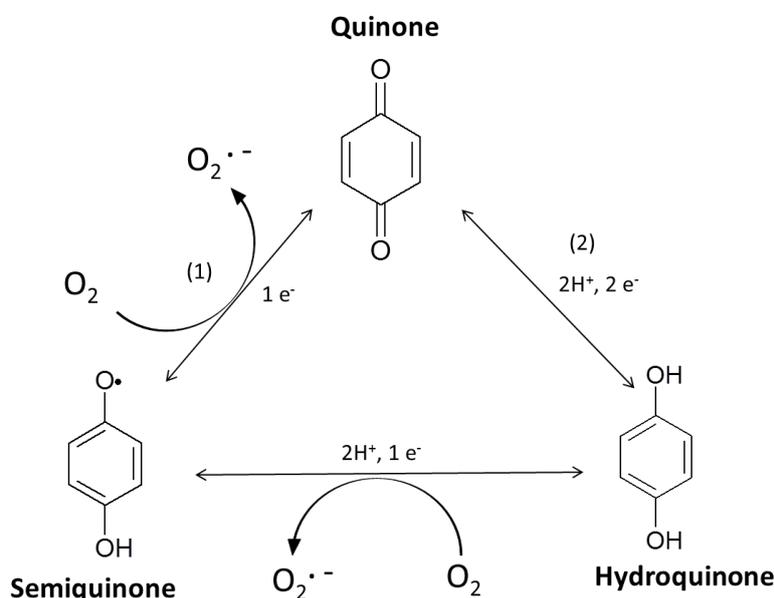


Fig. 33. Cycle redox des quinones.

Le groupement quinone peut en effet subir une simple réduction électrophile qui donne naissance à un radical semiquinone, qui peut réagir directement avec des macromolécules cellulaires pour induire une cytotoxicité (Cohen & d'Arcy Doherty 1987). Ce groupement peut également être réoxydé par réaction avec l'oxygène moléculaire produisant ainsi des anions superoxydes. La quinone initiale est ainsi régénérée (Réaction (1) Fig. 33). La quinone reformée est alors à nouveau disponible pour une nouvelle réduction et un nouveau cycle redox (Cohen & d'Arcy Doherty 1987 ; Monks *et al.* 1992). Ce cycle induit donc un stress oxydatif qui génère des espèces réactives de l'oxygène en grande quantité et qui cause des changements de potentiel de la membrane mitochondriale et d'autres événements associés qui mènent à la mort de la cellule.

Un second mécanisme repose sur une double réduction électrophile de la quinone qui donne naissance à une forme réduite appelée hydroquinone (Réaction (2) Fig. 33). Cette réaction peut servir d'amorce à des réactions chimiques supplémentaires dans la cellule qui dépendent principalement des chaînes secondaires de la quinone (Monks *et al.* 1992 ; Lamson & Plaza 2003), notamment si le motif quinone porte des groupements potentiellement capables de réaliser une alkylation bioréductrice.

Une oxydation irréversible ou une attaque nucléophile de groupements électrophiles sur les résidus cystéine et sérine du site catalytique modifie l'enzyme de manière conséquente. Outre la partie quinone, la partie secondaire des inhibiteurs semble jouer un rôle important, la chaîne secondaire s'adapte à proximité ou à l'intérieur du site catalytique par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, polaires ou hydrophobes (Contour-Galcerà *et al.* 2007).

Toxicité

Du point de vue toxicologique, les quinones possèdent plusieurs caractéristiques particulières qui leur confèrent des propriétés toxiques. Ce sont des oxydants et des électrophiles comme décrit précédemment (pour une revue complète sur les quinones et leur toxicité voir Monks *et al.* 1992).

Dans le foie, les composés quinonoïques se combinent avec l'acide glucuronique mais aussi avec le glutathion réduit afin de former des conjugués solubles. Outre ces mécanismes, la toxicité des quinones est augmentée par une inhibition du cytochrome P450. Il existe donc une implication du cytochrome P450 dans l'hépatotoxicité des quinones (Ishihara *et al.* 2011).

L'hépatotoxicité de certaines quinones semble être aussi liée à ses mécanismes d'arylation/alkylation et à leur cycle redox (Ishihara & Shimamoto 2007).

Inhibiteurs de CDC25

La famille des quinones est subdivisée en plusieurs groupes selon la structure de base qui les compose. Les plus étudiés comprennent les naphtoquinones, les anthraquinones et les anthracyclines. Des composés d'intérêt pharmacologique sont présents dans ces trois familles, notamment des structures qui possèdent des propriétés anticancéreuses. Les inhibiteurs des phosphatases CDC25 se retrouvent entre autre dans la classe des naphtoquinones et des anthraquinones, il existe aussi des inhibiteurs de type thiazoloquinones et orthoquinones.

Naphtoquinones

Les dérivés de naphtoquinones sont constitués d'un cycle benzène accolé à la structure para-quinone. Ils sont présents dans une vingtaine de familles de plantes supérieures ainsi que chez

les mycètes et chez les échinodermes sous forme de pigments qui possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, phytotoxiques et insecticides (Medentsev & Akimenko 1998).

Dans cette famille de dérivés de naphtoquinone, les composés les plus étudiés sont ceux de la vitamine K. Isolée en 1939 par Henrick Dame, elle constitue un composant essentiel de la cascade de coagulation. Cette vitamine existe sous trois formes, K1, K2 et K3 qui possèdent toutes le même squelette naphtoquinone mais des chaînes secondaires différentes (Fig. 34). Les vitamines K1 (phylloquinone) et K2 (ménaquinone) sont dites naturelles car synthétisées dans les plantes, les bactéries et les animaux, tandis que la vitamine K3 (ménadione) est un analogue synthétique qui possède une structure plus simple sans groupement aliphatique, elle agit comme une provitamine.

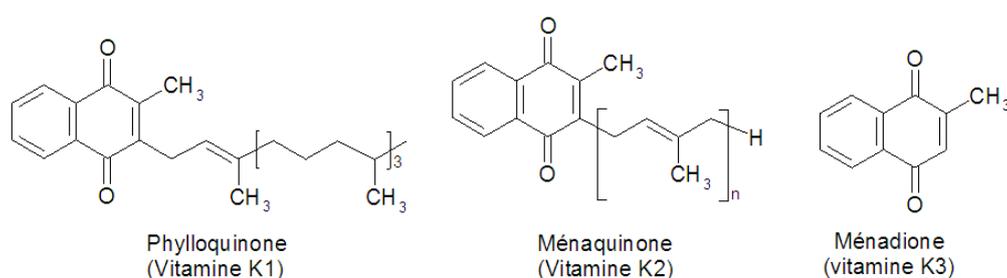


Fig. 34. Structure des vitamines K.

Les trois types de vitamines K présentent une activité anticancéreuse à l'égard de nombreux types cellulaires. La phylloquinone et la ménaquinone présentent une activité anticancéreuse sur plusieurs types de lignées humaines (hépatiques, colorectales, pulmonaires, stomacales, nasopharyngées, mammaires et épidermoïdes), avec une cytotoxicité évaluée par une CI₅₀ de l'ordre de 1 à 10 μM. La ménadione possède une activité cytotoxique bien plus conséquente à l'égard des lignées cancéreuses, avec une CI₅₀ de l'ordre de 18 à 45 μM (Lamson & Plaza 2003 ; Wu *et al.* 1993). Cette activité s'exerce à la fois par des propriétés radiosensibilisantes (Mitchell *et al.* 1965), ou par un effet synergique lors de son utilisation combinée avec des agents chimiothérapeutiques classiques comme le 5-fluorouracil, la doxorubicine et la vinblastine (Waxman & Bruckner 1982 ; Liao *et al.* 2000), mais aussi par l'inhibition directe des phosphatases CDC25 (Wu & Sun 1999), ou encore en combinaison seule avec la vitamine C sous forme d'un mélange commercial dénommé Apatone® pour lequel des essais cliniques ont été menés sur des patients atteints d'un cancer de la prostate incurable par les thérapies standard (Noto *et al.* 1989 ; Tareen *et al.* 2008).

De nombreuses molécules ont été dérivées à partir de la ménadione : c'est par exemple le cas des dérivés amine-naphtoquinone qui possèdent des propriétés anti-angiogéniques (Kayashima *et al.* 2010), ou encore des dérivés thiols tels que le NSC672121 (Cpd5, Fig. 35). Ce composé est un puissant inhibiteur des phosphatases CDC25 qui intervient *via* une arylation du groupement thiol de leur cystéine catalytique (Kar *et al.* 2003).

Par ailleurs, le potentiel anticancéreux de ce dernier composé a été évalué sur des cellules d'hépatocarcinome humain, sur lesquelles il induit une apoptose et une nécrose (Nishikawa *et al.* 1995).

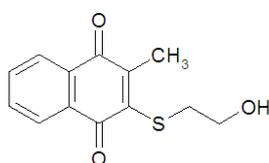


Fig. 35. Structure du composé NSC672121.

Ces études ont donné naissance à de nombreuses autres molécules inhibitrices de CDC25 dont la structure de base est similaire à celle du composé Cpd5 (Lazo *et al.* 2002 ; Brun *et al.* 2005 ; Braud *et al.* 2008).

C'est parmi ces autres dérivés que se trouvent les inhibiteurs les plus actifs contre CDC25, notamment le composé NSC95397 (Fig. 36) dont les CI_{50} contre les isoformes A, B et C sont respectivement de 22, 125 et 56,9 nM, ce qui les place parmi les plus puissants découverts jusqu'à présent (Lazo *et al.* 2002 ; Vintonyak *et al.* 2011). Ce composé exerce une inhibition significative de la croissance des carcinomes humains et murins *via* un blocage du cycle en transition G_2/M . Le composé NSC663284 (Fig. 36) est un inhibiteur irréversible qui induit un arrêt en phases G_1 et G_2/M ainsi qu'une inhibition importante de la croissance cellulaire (Pu *et al.* 2002 ; Vintonyak *et al.* 2011), les CI_{50} correspondantes *in vitro* sont de 29nM pour CDC25A, 95nM pour CDC25B et 89nM pour CDC25C.

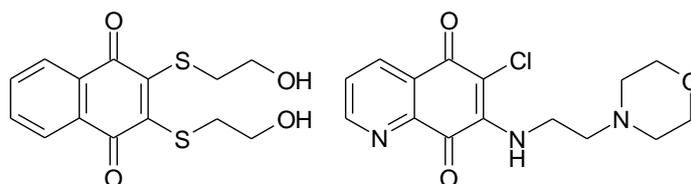


Fig. 36. Structure des composés NSC95397 (gauche) et NSC663284 (droite).

Les caulibugulones sont des isoquinoline-quinones et iminoquinones extraites des bryozoaires *Caulibugula intermis*. Certains de ces composés sont des inhibiteurs de CDC25. Par exemple la caulibugulone A (Fig. 37) présente des CI_{50} contre les isoformes A, B et C de respectivement 3,4 μM , 6,7 μM et 5,4 μM . Par ailleurs, dans la lignée d'ostéosarcome U2OS les isoformes B sont directement et irréversiblement inhibées par ce composé, et un arrêt en phases G_1 et G_2/M est observé. Ce composé génère aussi des ERO qui induisent une dégradation des CDC25A, directement liée aux voies p38 et CHK1 (Brisson *et al.* 2007).

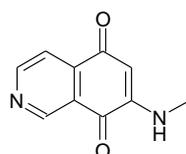


Fig. 37. Structure de la caulibugulone A.

Anthraquinones

Les composés du second groupe de dérivés quinonoïques, les anthraquinones, possèdent une structure constituée de deux cycles benzéniques accolés à la structure para-quinone. Ces anthraquinones se retrouvent à l'état naturel dans diverses plantes telles que la rhubarbe et la bourdaine, mais aussi dans certains lichens. Ils possèdent des propriétés colorantes (ex. alizarine) mais aussi antinéoplasiques (ex. mitoxantrone, Fig. 38). La mitoxantrone est connue depuis les années 70 pour son activité antitumorale. Ce composé est un agent intercalant de l'ADN, mais c'est aussi un inhibiteur de la topoisomérase II, ce qui lui confère son activité anticancéreuse (Crespi *et al.* 1986 ; Kapuscinski & Darzynkiewicz 1986 ; Lown *et al.* 1984).

La mitoxantrone est utilisée dans le traitement des leucémies aiguës ainsi que dans le traitement du cancer du sein et présente une activité équivalente à celle de la doxorubicine (voir ci-après le troisième groupe de quinones présentée) chez les patients précédemment traités, mais elle est moins cardiotoxique que cette dernière (Neidhart *et al.* 1986).

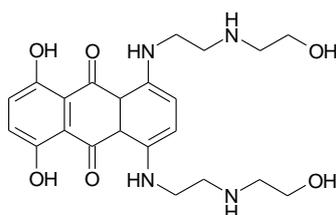


Fig. 38. Structure de la mitoxantrone.

Dans cette classe de composés, plusieurs inhibiteurs de CDC25 ont été identifiés. C'est notamment le cas de la rhéochrysidine, l'émodine, la questine, le chrysophanol et la rhéine (Fig. 39) qui inhibent l'activité de CDC25B avec des CI_{50} respectives de 62,5 ; 30 ; 34 ; 10,7 et 22,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Choi *et al.* 2007). De plus cette étude montre que l'émodine et la questine inhibent la croissance de la lignée colorectale cancéreuse SW620.

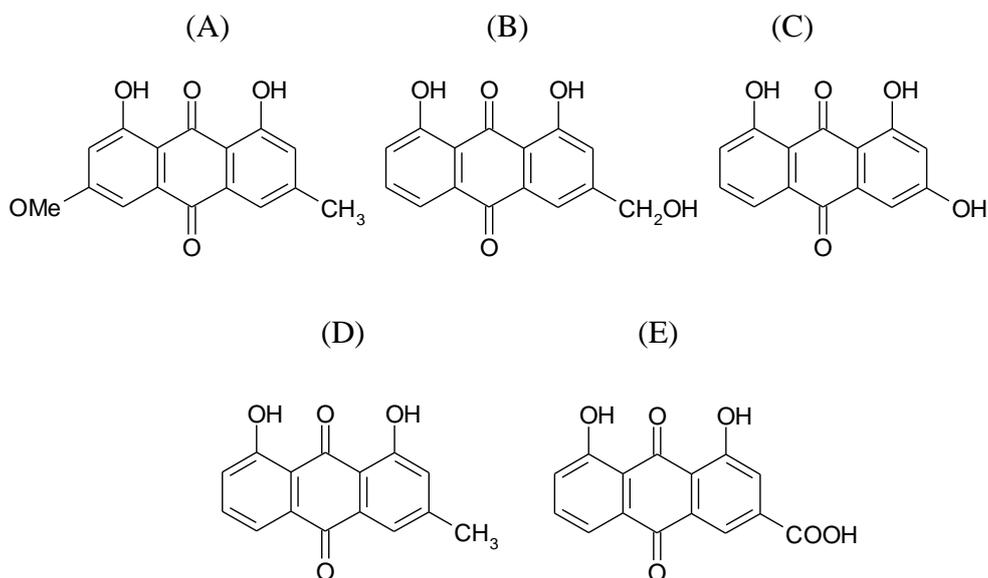


Fig. 39. Structure de la rhéochrysidine (A), l'émodine (B), la questine (C), le chrysophanol (D) et la rhéine (E).

Thiazoloquinone

Un composé qui porte un groupement thiazole accolé à une structure paraquinone a été développé. Ce composé BN82685 sous forme de benzoate (Fig. 40), inhibe les phosphatases CDC25 avec des CI_{50} comprises entre 170 et 250nM pour les trois isoformes, ce composé est actif sur les tumeurs de souris xénotreffées. De plus, une faible concentration de ce composé, combinée avec le Paclitaxel, inhibe la prolifération des cellules de cancer colorectal (Brezak *et al.* 2005).

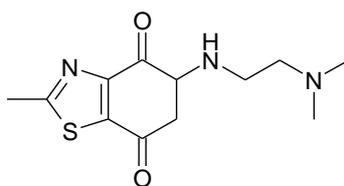


Fig. 40. Structure du composé BN82685.

Orthoquinones

Plusieurs composés qui possèdent une structure orthoquinone ont été répertoriés comme des inhibiteurs de CDC25. Les naphtofuranediones sont capables de bloquer le cycle cellulaire et d'inhiber les CDC25 de manière réversible. Le composé 5169131 (Fig. 41) possède par exemple des CI_{50} pour les isoformes A, B et C respectivement de 5 μM , 10,4 μM , et 8,8 μM , et induit un arrêt en phase G_1/S et G_2/M (Brisson *et al.* 2004). Ce composé est l'un des premiers inhibiteurs réversibles décrits qui possède une activité sur les cellules. En effet il inhibe la croissance des cellules dans les lignées tumorales PC-3 (prostate) et dans la lignée MDA-MB-435 (cellules de mélanome, utilisées à tort en tant que lignée de cancer du sein dans cette étude). Les indolyldihydroquinones sont eux aussi des composés réversibles *in vitro* mais ils ne présentent toutefois pas d'activité sur les cellules (Sohn *et al.* 2003).

Une autre série de naphtofuranediones de la famille des tanshinones, la cryptotanshinone (Fig. 41) et ses analogues, présentent une activité inhibitrice contre CDC25B. Ils sont retrouvés dans les rhizomes de la plante *Salvia miltiorrhiza* utilisée en médecine traditionnelle chinoise. La cryptotanshinone et ses dérivés possèdent des CI_{50} comprises entre 3,2 μM et 11 μM vis-à-vis de CDC25B et sont cytotoxiques dans la lignée cancéreuse pulmonaire A549 (Wei Gang *et al.*).

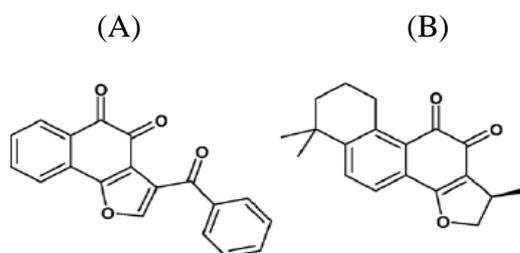


Fig. 41. Structure des composés 5169131(A) et cryptotanshinone (B).

Bis-Quinone

Un composé de nature bis-quinonoïque présente des caractéristiques intéressantes de spécificité vis-à-vis des phosphatases CDC25 et non des autres PTP. Le composé IRC-083864 (Fig. 42) possède des CI_{50} comprises entre 10 et 50nM vis-à-vis des CDC25. Il est actif contre de nombreux types tumoraux y compris contre des cellules résistantes à certains traitements anticancéreux (Brezak *et al.* 2009 ; Boutros *et al.* 2007 ; Contour-Galcerà *et al.* 2007).

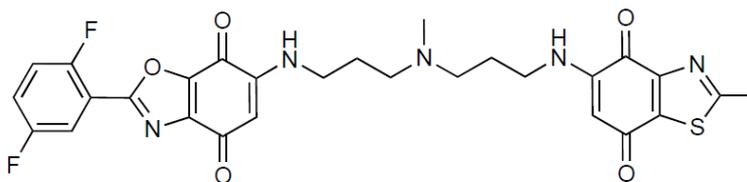


Fig. 42. Structure du composé IRC-083864.

6. Développement de nouveaux inhibiteurs

Comme nous l'avons vu dans cette partie, il existe de nombreux inhibiteurs de CDC25 qui appartiennent à diverses classes de composés. L'ensemble de ces données a été obtenu par des criblages de chimiothèques mais aussi par des screening *in silico* (ex. Montes *et al.* 2008). Le recoupement des diverses caractéristiques de ces inhibiteurs et de leur structure permet d'affiner les recherches d'inhibiteurs efficaces.

Dans le contexte de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt dans le traitement du cancer, les CDC25 apparaissent comme des cibles de choix.

Bien que les quinones constituent à l'heure actuelle les inhibiteurs les plus puissants des CDC25, ils ne sont pas des candidats parfaits pour la thérapeutique en raison de leur toxicité. De plus, peu de ces composés présentent une activité *in vivo* sur des tumeurs humaines xénogreffées chez la souris. Néanmoins, de faibles différences dans les propriétés chimiques des quinones peuvent parfois se traduire par de grandes différences d'activité biologique et de toxicité (Monks *et al.* 1992). Ces résultats suggèrent la possibilité de trouver un composé quinonoïque efficace et peu toxique.

La mise au point de dérivés biodisponibles qui présentent des structures variées et possèdent une action moins toxique sur les cellules non tumorales apparaît être une nécessité, ces dérivés seraient idéalement plus stables sous leur forme réduite (Lavecchia *et al.* 2012b).

L'analyse des relations structure/activité des inhibiteurs et les avancées constantes dans la compréhension des rôles et des mécanismes autour des CDC25 et de leur structure permettent un *design* rationalisé d'inhibiteurs potentiels.

D'autres classes de molécules sont régulièrement mises en évidence comme étant inhibitrices des CDC25. C'est le cas par exemple des flavones (Fig. 43) qui sont potentiellement

intéressantes pour le développement d'inhibiteurs chez l'homme. En effet ces composés sont capables d'inhiber CDC-25.1 chez *Caenorhabditis elegans* (Kim *et al.* 2009) et d'induire un arrêt du cycle cellulaire.

En observant la structure de ces composés il est possible d'imaginer que d'autres classes structurellement analogues et moins toxiques pourraient convenir comme par exemple les coumarines (Fig. 43) dont l'activité cancéreuse a déjà été mise en évidence dans le passé (Lacy & O'Kennedy 2004 ; Lopez-Gonzalez *et al.* 2004). Ces composés possèdent une faible toxicité cellulaire chez l'Homme (Lake 1999).

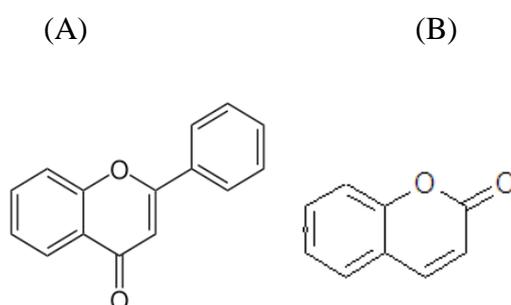


Fig. 43. Structures à noyau benzopyrane : flavone (A) et coumarine (B).

C'est dans cette optique de développement de nouveaux inhibiteurs que nous avons engagé les travaux de recherche décrits dans cette thèse.

VI. Les modèles d'étude

L'étude d'inhibiteurs des CDC25 et d'autres cibles peut se faire à différents niveaux. Il est possible de travailler au niveau protéique, cellulaire ou à l'échelle d'un organisme. Différents systèmes existent pour chacun de ces niveaux, apportant chacun des informations complémentaires. Leur mise en œuvre peut parfois être extrêmement laborieuse et cette difficulté est proportionnelle à la fidélité du modèle par rapport à une tumeur *in situ* et réciproquement les modèles les plus simples sont aussi les plus dédifférenciés (Fig. 44) en comparaison à la tumeur d'un patient, et éloignés de la situation réelle *in vivo*.

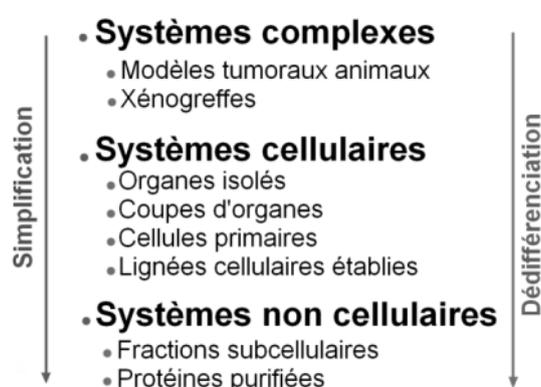


Fig. 44. Complexité des modèles *in vitro* et *in vivo*.

1. Modèles *in vitro*

L'utilisation de modèles *in vitro* permet un contrôle optimal de l'ensemble des paramètres des expériences et permet de récolter les informations de base qui concernent le fonctionnement d'un inhibiteur sur l'enzyme et dans la cellule.

Criblage sur des protéines recombinantes

Après avoir réalisé un *design* rationnel d'inhibiteurs ou après avoir choisi une famille de composés potentiellement actifs à tester, un premier criblage *in vitro* peut-être mis en place. L'utilisation de protéines recombinantes pour des essais enzymatiques permet de réaliser un criblage à moyenne ou grande échelle à des coûts bien plus réduits qu'en culture cellulaire. Elle nécessite la production de protéines, leur purification et leur utilisation dans des conditions optimales pour leur fonctionnement, tant en terme de pH, que de température et de

composition du tampon environnant. Cette approche *in vitro* constitue une première étape qui permet d'écarter les composés n'ayant aucune action sur l'activité des CDC25.

Les multiples expériences réalisables sur des protéines recombinantes permettent d'obtenir des précisions sur le type d'inhibiteur et le type d'inhibition observé, il est ainsi possible de déterminer son caractère réversible ou irréversible, son mode d'inhibition compétitif, non compétitif, mixte, etc. La réalisation de ces expériences hors de la cellule permet de s'affranchir de l'influence des autres composants cellulaires ce qui présente l'avantage majeur de ne pas avoir de biais dans l'inhibition des CDC25. L'inconvénient réside dans la sur-simplification du modèle, et aucune conclusion ne pourra être tirée quant à l'efficacité du composé dans la cellule et encore moins sur la tumeur *in vivo*. Une fois un composé actif ainsi découvert, il faut donc passer à un modèle cellulaire, plus complexe.

Criblage *in silico*

Outre l'approche *in vitro*, un pré-criblage *in silico* est possible. Le croisement de la structure des CDC25 obtenue en cristallographie avec la structure de composés chimiques contenus dans une chimiothèque permet de prédire, avec plus ou moins de fiabilité et de précision, l'affinité de certains composés pour les CDC25. Plusieurs études de ce type ont permis de découvrir des inhibiteurs. C'est le cas par exemple des travaux réalisés sur la chimiothèque ChemBridge *database* (qui comprend plus de 420 000 composés) qui ont permis l'identification d'une centaine de composés potentiellement inhibiteurs. Deux d'entre eux ont été testés *in vitro* et présentent des CI_{50} de 13 et 19 μ M vis-à-vis de CDC25B (Montes *et al.* 2008).

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont l'un des outils principaux utilisés dans les études précliniques en cancérologie. Des quantités importantes de données sur le cancer du sein ont été obtenues ces 40 dernières années grâce à l'utilisation de ces modèles. Les premières lignées ont été établies dans les années 60 et 70 et très peu de lignées ont été développées depuis. Pour le cancer du sein, il existe une centaine de ces lignées et trois d'entre elles font l'objet d'une utilisation importante. Ces trois lignées (MCF-7, MDA-MB-231 et T47D) sont citées dans environ 80% des publications qui mentionnent les lignées cellulaires de cancer du sein (Lacroix & Leclercq

2004). Ces lignées diffèrent principalement par leur statut des récepteurs aux œstrogènes et aux progestérones (EGR/PGR/HER2).

L'utilisation des lignées cellulaires établies présente de nombreux avantages, notamment :

- Un contrôle complet des conditions environnementales et un milieu nutritif standardisé ; une reproductibilité importante des expériences ;
- Une possibilité de cryo-préserver les souches à très long terme ;
- Un coût moindre que l'utilisation de modèles *in vivo* et des questions éthiques moindres en comparaison avec les modèles *in vivo*.

L'ensemble de ces avantages a fait de ces modèles des références pour l'étude des mécanismes de la tumorigenèse, pour l'étude de traitements ainsi que pour la mise en évidence de marqueurs tumoraux et l'établissement de profils génétiques et protéiques complets.

Ces modèles comportent toutefois des inconvénients. Bien que ces souches soient cryopréservées, elles subissent une dédifférenciation sournoise qui résulte des multiples sous cultures, et perdent à terme certaines caractéristiques particulières. La pertinence des modèles cellulaires est également limitée en raison de leur sur-simplification, ce qui rend les résultats obtenus difficilement extrapolables à la tumeur *in vivo*. En effet, ces lignées sont homogènes, c'est-à-dire qu'elles ne comportent généralement qu'un ou deux types de cellules tandis qu'une tumeur est généralement constituée de multiples types clonaux. De plus, l'ensemble des lignées cellulaires disponibles n'est pas représentatif de la totalité des cancers car les caractéristiques retrouvées dans les tumeurs des patients ne sont pas toujours présentes. C'est le cas par exemple pour le cancer du sein où la centaine de lignées disponibles est majoritairement issue d'épanchement pleuraux et de métastases qui sont déjà différentes de la tumeur primaire et qui ont par exemple un statut EGR/PGR/HER2 différent de cette tumeur.

Dans cette situation, l'établissement de lignées primaires, c'est-à-dire issues directement de la tumeur, apparaît être une solution optimale. Toutefois ces lignées souffrent d'une instabilité importante pour une utilisation à long terme et elles sont très difficiles à obtenir en raison des nombreuses contaminations dues au stroma environnant (Amadori *et al.* 1993 ; Gazdar *et al.* 1998 ; Shen *et al.* 2009).

L'utilisation de cellules « non cancéreuses » permet quant à elle d'avoir un point de comparaison aux lignées cancéreuses. Toutefois, bien que ces lignées ne soient pas tumorales, elles souffrent de multiples altérations génétiques qui ont permis de les immortaliser. Elles sont semblables à des cellules normales mais n'en sont pas, ce qui limite leur représentativité du tissu sain.

D'autres modèles *in vitro* plus proches de la tumeur existent cependant. C'est par exemple le cas de la culture directe de fragments tumoraux sous forme de coupes fines de 200 μM d'épaisseur (Nissen *et al.* 1983) ou encore de cultures organotypiques de tumeurs qui permettent de maintenir des tumeurs en culture sur plusieurs mois (Vaira *et al.* 2010). Ces modèles ne sont pas aisés à mettre en place et peu de tests peuvent être effectués sur un même échantillon, ce qui limite leur utilisation à grande échelle. L'utilisation de plusieurs lignées en co-culture est aussi possible, elle permet de s'affranchir du manque de diversité clonale. Il est aussi possible de cultiver des cellules tumorales sous forme de sphéroïde, permettant ainsi de reproduire un gradient d'oxygène et de nutriments mimant la structure d'une tumeur *in vivo* (Hirschhaeuser *et al.* 2010). Mais ces modèles souffrent des mêmes inconvénients que les lignées seules en ce qui concerne leur manque de représentativité par rapport à la tumeur initiale.

2. Modèles *in vivo*

Xénogreffes

Les xénogreffes constituent un modèle abouti et complexe. Elles consistent généralement en l'injection de cellules tumorales humaines issues de lignées établies (ex. MCF-7 ou MDA-MB-231 pour le cancer du sein) dans un modèle murin immunodéficient (ex. souris *nude*).

L'utilisation de ce modèle permet de bénéficier de la régulation nerveuse et hormonale de l'animal et l'utilisation de lignées établies permet de garder une correspondance relative entre les résultats obtenus *in vitro* sur les mêmes lignées et ces résultats.

Toutefois, l'utilisation de souris soulève plusieurs questions sur leur représentativité. Le modèle murin présente des différences majeures avec le corps humain en ce qui concerne les régulations physiologiques et biochimiques. De plus, le stroma qui entoure la tumeur *in vivo*

sera murin, ce qui donnera naissance à une tumeur chimérique homme-souris dont les caractéristiques sont éloignées de celles de l'homme (Kim *et al.* 2004).

Tumeurs spontanées et induites

D'autres modèles purement murins peuvent être utilisés. Certaines souches de souris développent des cancers spontanément ou sous l'influence d'inducteurs (Russo & Russo 1996). Ces tumeurs ne sont pas chimériques et suivent un développement normal au sein de l'organisme entier, toutefois il existe de très grandes différences entre les tumeurs murines et humaines. Par exemple, la plupart des cancers mammaires murins résultent d'une infection virale et ne sont pas hormono-dépendants, contrairement aux cancers mammaires humains dont la plupart sont œstrogènes dépendants. Par ailleurs la biologie des tumeurs murines spontanées diffère de celle de l'homme de par leur taille, leurs cibles oncogéniques, les degrés de maturation et la différenciation des cellules entre les deux espèces. Ces caractéristiques les rendent difficilement comparables et ne permettent pas une extrapolation des résultats chez l'Homme.

Ethique

Il faut souligner que l'utilisation de modèles animaux soulève aussi de nombreuses questions éthiques. Dans un souci de respect de cette éthique la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) établie en 1959 (Russell & Bursch 1959) pose un principe de rationalisation des choix de modèles. Sur ce principe, l'utilisation de modèles animaux doit se faire en dernier, lorsqu'un maximum de données a été récolté par les modèles *in vitro* et qu'il est possible d'espérer un apport supplémentaire d'informations par les modèles vivants.

3. Choix des modèles

Comme nous l'avons présenté, aucun modèle n'est parfait et suffisant pour représenter la situation *in vivo* chez l'homme. Une combinaison entre des modèles *in vitro* et *in vivo* est nécessaire, les lignées cellulaires établies et l'utilisation de protéines recombinantes sont indispensables à la compréhension des mécanismes de base impliqués lors de traitements avec des composés chimiques.

Au cours de cette étude, nous nous sommes appliqués à utiliser les deux premiers types de modèles *in vitro*, protéiques et cellulaires afin d'obtenir les informations essentielles au développement éventuel d'un modèle murin plus poussé.

OBJECTIFS ET STRATEGIE

I. Objectifs

Comme nous l'avons présenté précédemment, les phosphatases CDC25 jouent un rôle central dans la progression entre les différentes phases du cycle cellulaire et elles sont surexprimées dans certains cancers. Cette surexpression est liée à un mauvais pronostic de la maladie et à des caractéristiques d'agressivité accrue (Boutros *et al.* 2007). Ces enzymes sont donc des cibles d'intérêt pour le développement de thérapies dont l'inhibition pourrait permettre de freiner ou de stopper la croissance tumorale. Une association avec d'autres traitements déjà existants pourrait permettre une meilleure efficacité de ces derniers.

Ces travaux de thèse ont pour objectif la mise au point et l'évaluation de nouveaux composés inhibiteurs des phosphatases CDC25. Dans ce cadre, ce projet a pour vocation de :

- Découvrir de nouvelles classes d'inhibiteurs des CDC25 à fort potentiel en réalisant un design rationnel de nouveaux composés à partir des données de la littérature et des données récoltées au laboratoire ;
- D'en analyser le mécanisme inhibiteur sur les protéines afin de déterminer si l'inhibiteur se lie de manière réversible ou non à l'enzyme, s'il est de type compétitif, incompétitif ou mixte ;
- De vérifier leur efficacité dans la cellule tumorale afin de les valider comme molécules d'intérêt thérapeutique;
- De déceler les mécanismes mis en jeu dans cette action antitumorale afin de déterminer de quelle manière le composé inhibe ou stoppe la croissance tumorale dans la cellule.

II. Stratégie

Sélection d'inhibiteurs d'intérêt

Le criblage de séries de composés a été réalisé sur des protéines CDC25 A, B et C recombinantes dont l'expression et la purification est réalisée au laboratoire. Ces protéines sont les outils principaux utilisés pour discriminer les molécules d'intérêt et leur mode d'action. Les séries de molécules ont été créées par l'équipe de chimie du laboratoire ou par des équipes collaboratrices selon une approche rationalisée.

Dans un premier temps les molécules non inhibitrices sont éliminées du panel, ensuite les molécules inhibitrices sont classées selon leur CI_{50} relative pour les trois isoformes. Le mode d'action et de fixation des composés les plus actifs est ensuite évalué.

Etude des effets dans les cellules

Les composés sélectionnés *in vitro* qui présentent la meilleure inhibition et le mode d'action le plus intéressant ont été testés sur des lignées cellulaires. La plupart de ces lignées sont dérivées d'adénocarcinomes mammaires humains aux caractéristiques bien connues (MCF-7 et MDA-MB-231), mais aussi des dérivés résistants aux thérapeutiques classiques (VCR-Res) ainsi qu'une lignée d'hépatocarcinome humain (HepG2).

Les premiers tests ont consisté à déterminer la CI_{50} pour les lignées et à déterminer le caractère cytotoxique et/ou cytostatique du composé.

Puis, des analyses approfondies sur les effets du composé dans la cellule ont été réalisées : effets sur le cycle cellulaire, la phosphorylation des CDK, la génération d'espèces réactives de l'oxygène, l'apoptose, etc.

Ces expériences permettent de valider ou non le composé pour des tests plus poussés, éventuellement sur des modèles plus complexes.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Criblage *in vitro* de composés de synthèse

Ces travaux de thèse ont pour objectif de mettre en évidence de nouveaux inhibiteurs des phosphatases CDC25, d'en comprendre les mécanismes d'action et d'évaluer leur potentiel thérapeutique. Dans un premier temps, une étude par criblage *in vitro* de plusieurs séries d'inhibiteurs synthétisés par l'équipe de chimie du LIMBP du P^f Kirsch ou par des collaborateurs extérieurs a été réalisée. Dans un second temps, ces composés ont été testés sur des protéines recombinantes CDC25 humaines.

1. Production et calibration des enzymes CDC25

Le criblage *in vitro* est un préalable indispensable pour la discrimination des composés d'intérêt pour l'inhibition des CDC25. Ce criblage consiste en la mise en contact de composés chimiques candidats avec les isoformes de CDC25 actives. L'activité des CDC25 sera affectée ou non par les composés inhibiteurs. Les isoformes employées sont des protéines recombinantes humaines obtenues par un système de production bactérien.

Plusieurs étapes sont nécessaires à la production de ces enzymes :

- La construction d'un vecteur plasmidique qui porte la séquence codante d'une isoforme de CDC25 ;
- L'insertion du plasmide dans un vecteur bactérien de type *E.coli* par l'intermédiaire d'un choc thermique ;
- La sélection du meilleur clone bactérien qui a incorporé le plasmide ;
- L'amplification à grande échelle du clone sélectionné ;
- L'extraction et la purification des protéines recombinantes ;
- Le calibrage des enzymes purifiées.

Le laboratoire disposait de trois constructions plasmidiques A complète, B tronquée et C complète gracieusement fournies par les P^{ts} Laurent Meijer et Ingrid Hoffmann. Au cours de ces travaux, le P^f Bernard Ducommun nous a gracieusement fourni la construction CDC25 B complète. Après avoir transformé les bactéries compétentes et sélectionné le meilleur clone, nous avons obtenu quatre productions de protéines recombinantes : les isoformes A, B et C complètes ainsi qu'une isoforme B tronquée ne comprenant que le site catalytique de CDC25 B. Nous

montrons plus tard l'intérêt de travailler sur la forme tronquée et sur la forme complète d'une isoforme (cf. paragraphe « Etude des propriétés du composé SV37 »).

Lors de la production de ces enzymes, il est nécessaire de réaliser un contrôle qualité. En effet la production est longue, les stocks d'enzyme sont instables (stables quelques mois à -80°C) et la quantité d'enzyme obtenue à chaque production est limitée. Il est de plus nécessaire de travailler sur un même lot d'enzyme pour une même série de composés afin d'obtenir des résultats comparables et donc d'assurer un contrôle qualité des analyses. La production de ces enzymes se révèle donc fastidieuse et le contrôle qualité y est essentiel. C'est pourquoi, une fois les protéines purifiées, chaque lot est testé et calibré de manière à obtenir une efficacité catalytique optimale lors des essais ainsi que des lots comparables et une quantité adéquate d'enzyme à utiliser par test. Ainsi, nous nous plaçons en conditions de vitesse initiale de réaction afin d'obtenir une vitesse constante et maximale tout au long de l'expérience qui doit durer au moins 2 heures.

La figure ci-dessous, qui représente les résultats obtenus avec différentes quantités de CDC25, reflète l'importance de cette calibration pour une utilisation optimale de l'enzyme (Fig. 45).

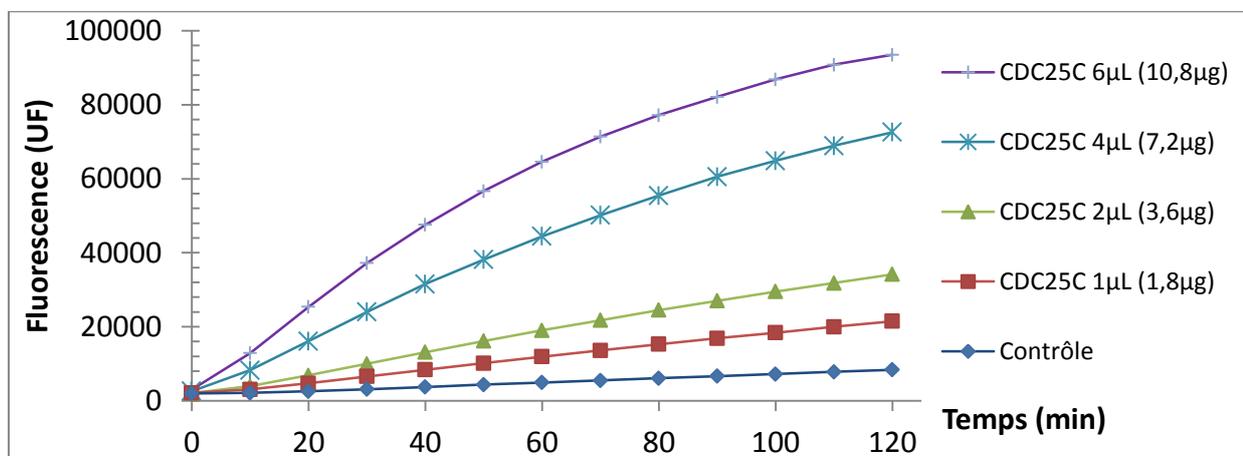


Fig. 45. Exemple de courbe de calibration d'un lot de CDC25 C purifiée. L'activité est testée en présence du substrat 3-OMFP et suivie pendant 2 heures à 30°C . Les quantités qui ont été retenues pour une calibration optimale sont 1 et $2\mu\text{L}$, elles présentent respectivement des vitesses de transformation de 110 et $219\text{ UF}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les essais enzymatiques sont réalisés par mise en contact de l'enzyme avec le substrat fluorescent 3-O-méthylfluoresceine phosphate (3-OMFP) dans un tampon adéquat (Fig. 46, cf. Matériel et méthode). La vitesse de transformation du substrat est calculée en UF/min (unités de fluorescence par minute).

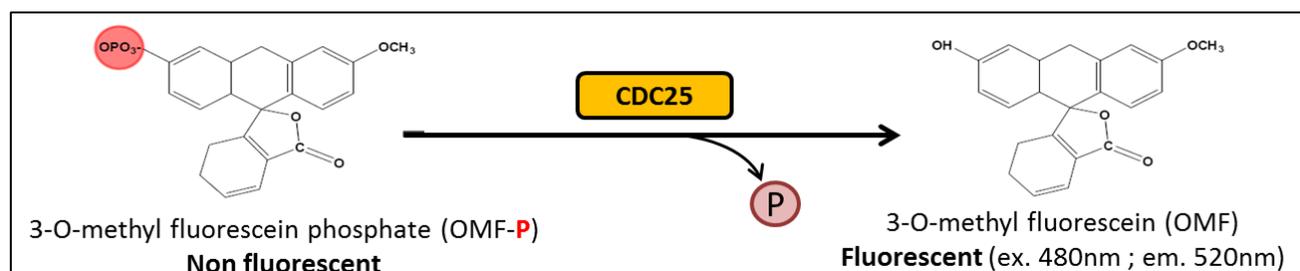


Fig. 46. Transformation du phosphate de méthyl fluorescéine en méthyl fluorescéine par les phosphatases CDC25.

2. Evaluation du potentiel inhibiteur de composés d'intérêt

Il existe de nombreuses classes de composés inhibiteurs des CDC25 (cf. Contexte scientifique, IV). Toutefois, malgré les efforts déployés pour obtenir des composés efficaces dans la cellule et l'animal, aucune molécule n'a jusqu'à présent, à notre connaissance, dépassé les essais cliniques de phase I (Contour-Galcera *et al.* 2007). C'est la raison pour laquelle la recherche de nouveaux inhibiteurs de CDC25 aux structures innovantes est nécessaire.

La découverte de nouveaux composés peut se faire par le criblage haut débit de chimiothèques déjà existantes ou par la conception de composés dérivés d'inhibiteurs déjà connus dans la littérature. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé la seconde stratégie et nous avons réalisé le criblage de plusieurs séries de composés.

Lors de ce criblage, la première étape vise à tester une série avec une dose élevée de composé. Cette méthode sur critère d'exclusion que nous avons placée à 100µM, nous permet d'éliminer les molécules peu ou pas inhibitrices et de ne pas omettre de faux positifs. Ces tests sont réalisés sur les trois isoformes des CDC25. Dans une seconde étape, les concentrations qui inhibent 50% de l'activité enzymatique (CI_{50}) sont déterminées pour les composés les plus actifs. Des évaluations plus poussées concernant le mode de liaison de l'inhibiteur à l'enzyme, ou encore le type d'inhibition, sont alors réalisées sur les composés les plus puissants.

Dérivés stéroïdiens

Plusieurs dérivés stéroïdiens ont été testés sur les isoformes B et C des CDC25 (les résultats pour l'isoforme A ont déjà été évalués au laboratoire). Ces dérivés stéroïdiens ont été synthétisés par l'équipe du Pr. Poirier du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Laval, au Canada. Ces composés présentent un noyau hydrophobe commun aux stéroïdes et aux

cyclopentanoperhydrophénanthrène (Fig. 47). Certaines structures de ces composés ne nous ont pas été fournies pour des raisons de confidentialité.

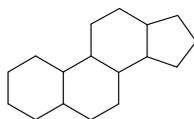


Fig. 47. Structure d'un noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène

Dans la littérature, il existe un exemple de dérivés stéroïdiens capables d'inhiber CDC25, le 2-méthoxy œstradiol (Kar *et al.* 2008). Ce composé est capable d'inhiber les trois isoformes (CI_{50} de 1 à 10 μM) et induit une cytotoxicité dans des cellules d'hépatocarcinome humain (Hep3B, HepG2, PLC/PRF5) et de rat (McA-RH7777, JM-1) avec des CI_{50} de 0,5 à 3 μM mais pas dans les hépatocytes non cancéreux humains (CRL-11233) et de rat (CRL-1439) aux doses testées ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$).

Dans les composés testés dans ce travail, les chaînes attachées au noyau stéroïdien présentent pour la plupart une longueur importante, leur procurant une différence majeure avec le composé de la littérature.

Le criblage à la concentration de 100 μM n'a pas permis de les identifier en tant qu'inhibiteurs de CDC25 (voir Annexe D). Ces résultats peuvent éventuellement s'expliquer par l'encombrement spatial induit par les chaînes secondaires, qui sont de taille importante et laissent supposer un rôle majeur de la partie stéroïdique dans l'inhibition.

Dérivés thiophéniques

Plusieurs études de la littérature ont mis en évidence la capacité de composés thiazolés à inhiber les phosphatases CDC25. En effet, des thiazolopyrimidines inhibitrices de CDC25B ont été décrites (CI_{50} aux alentours de 10 μM), dont certaines sont capables d'induire une cytotoxicité dans les cellules HeLa (Kolb *et al.* 2009). Une autre équipe a découvert une structure quinone-thiazole, BN82685, qui fait partie des inhibiteurs les plus puissants de la littérature. Ses capacités inhibitrices de CDC25 (CI_{50} comprises entre 0,1 et 0,2 μM) et son fort potentiel inhibiteur vis-à-vis des cellules cancéreuses pancréatiques Mia PACA-2 xénotransplantées chez la souris, en font l'un des meilleurs inhibiteurs étudié *in vivo* jusqu'à ce jour (Brezak *et al.* 2005).

Par ailleurs, des composés à structure thiophénique ont déjà été décrits comme inhibiteurs des PTPs (Ye *et al.* 2010). Compte tenu de la présence commune du motif HCX₅R dans le site catalytique des PTPs et des CDC25, il apparaît pertinent d'étudier les dérivés thiazolés comme potentiels inhibiteurs des CDC25.

Sur la base des résultats précédemment cités, une série de 6 composés thiazolés qui comprennent 5 composés constitués d'un cycle thiophène accolé à un thiazole et un composé qui contient un noyau aminopyrimidine-thiophène (Fig. 48) ont été synthétisés par l'équipe de chimie du P^r G. Kirsch (Z. Xu).

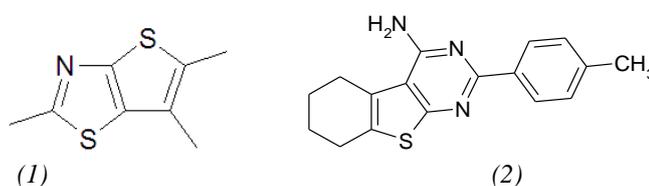


Fig. 48. Structure centrale des dérivés thiophéniques : noyau thiophène-thiazole (1) et composé BC33 aminopyrimidine-thiophène (2)

Les résultats obtenus (voir Annexe II) montrent que les composés de cette série sont capables d'inhiber les phosphatases CDC25 mais avec une efficacité moindre que celle rapportée dans la littérature. En effet, dans l'exemple précité (Ye *et al.* 2010) la CI₅₀ pour la PTP1B (comportant le motif catalytique HCX₅R) était de 2 µM, tandis que les composés utilisés dans cette étude présentent des CI₅₀ voisines de 30 µM. La présence de groupements secondaires plus ou moins encombrants semble là aussi influencer de manière assez importante les capacités d'inhibition des composés. Au vu de ces résultats, aucun des composés de cette série n'a été retenu pour une analyse plus précise.

Dérivés coumariniques

Les coumarines (α -benzopyrones) sont des composés organiques aromatiques de la famille des benzopyrones (Fig. 49), dont les autres membres sont les flavonoïdes (γ -benzopyrones). Ces composés sont présents dans de très nombreuses plantes alimentaires (légumes, thé, chicorée, noix, baies, fruits, etc.), mais aussi dans plusieurs microorganismes (ex. novobiocine et coumermycine chez *Streptomyces* ; aflatoxines chez *Aspergillus*). L'absorption alimentaire de diverses benzopyrones est estimée à 1g par jour en moyenne pour un régime occidental (Lacy & O'Kennedy 2004).

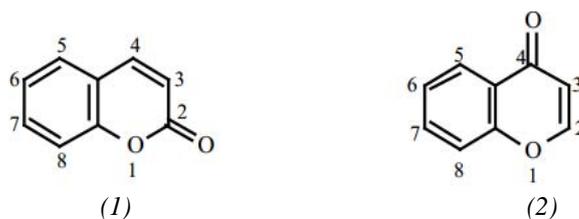


Fig. 49. Structure des Benzopyrones : α flavonoïdes (1) et γ coumarines (2).

Les coumarines présentent un intérêt en thérapeutique, compte tenu de leurs propriétés biologiques. En particulier, leur activité bactériostatique et anti tumorale en fait des molécules de choix pour des modifications structurelles à visée thérapeutique, ou pour la conception de nouveaux composés anticancéreux. Les coumarines et leurs dérivés sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire de plusieurs lignées tumorales comme les lignées LNCaP (carcinome prostatique) ou K562 et HL-60 (leucémie myéloïde) (Lacy & O'Kennedy 2004). Plusieurs auteurs ont déjà rapporté l'utilisation des coumarines (1,2-benzopyrone) ou de leurs métabolites (7-méthoxycoumarine) pour le traitement de certains cancers. Aucun effet secondaire des coumarines n'a été reporté chez l'homme pour des doses qui vont jusqu'à 7g par jour pendant deux semaines de traitement continu, ce qui en fait une famille de composés peu toxiques (Lake 1999). Par ailleurs, nous trouvons dans la littérature des flavonolignanes actives sur les trois isoformes dans la lignée PC3 (Deep *et al.* 2008). Certaines flavones sont également capables d'inhiber CDC-25.1 chez *C.elegans* (Kim *et al.* 2009).

En s'appuyant sur les résultats précités et sur le modèle du noyau flavone (Fig. 50), l'équipe de chimie du P^r G. Kirsch (S. Valente) a synthétisé une série de coumarines SV (Fig. 51).

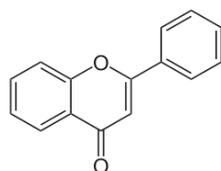


Fig. 50. Structure d'une flavone

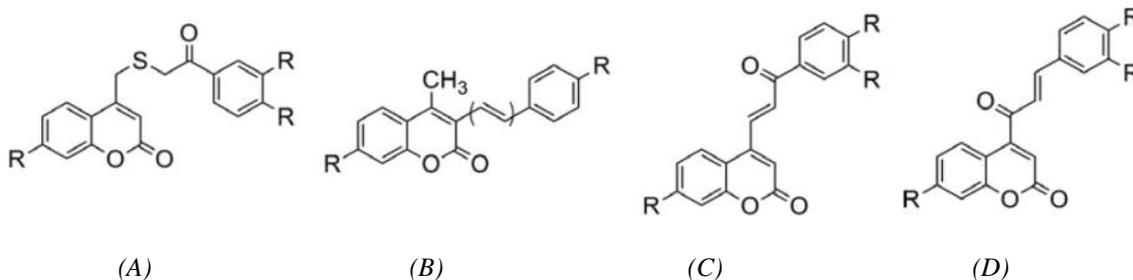


Fig. 51. Structure centrale des différents types de coumarines synthétisés, série SV 1 à 20.

Parmi les coumarines testées, nous avons trouvé plusieurs composés qui présentent une inhibition modérée (CI_{50} de l'ordre de 30 à 80 μM , voir Annexe III) lorsqu'on les compare aux meilleurs inhibiteurs de la littérature. Ainsi, les deux composés les plus actifs, SV3 et SV8 présentent des CI_{50} aux alentours de 20 μM pour CDC25 A et C. Par ailleurs, nous observons toujours une inhibition moindre vis-à-vis de l'isoforme B ($CI_{50} > 100 \mu\text{M}$) ce qui suggère une importance de la chaîne N-terminale soit dans l'attachement des inhibiteurs à l'enzyme, soit dans la conformation spatiale globale de la protéine et de son site actif.

En comparant deux à deux les résultats des composés SV 3, 4 et 5 avec les résultats des composés 12, 13 et 14, dont les structures ne diffèrent que par la position de la double liaison à l'oxygène central (Fig. 52), nous observons que les composés 12, 13 et 14 ne présentent pas d'inhibition notable (activité résiduelle à 100 μM pour CDC25A respectivement de 55%, 99,8% et 92,6%), tandis que les composés 3, 4 et 5 présentent une inhibition bien plus importante (activité résiduelle à 100 μM pour CDC25A respectivement de 5,8%, 33,6% et 38,5%). Nous observons par ailleurs que la présence d'un ou plusieurs groupes MeO diminue fortement le potentiel inhibiteur du composé. La flexibilité de la molécule inhibitrice et son encombrement semblent donc jouer un rôle important pour l'inhibition des CDC25.

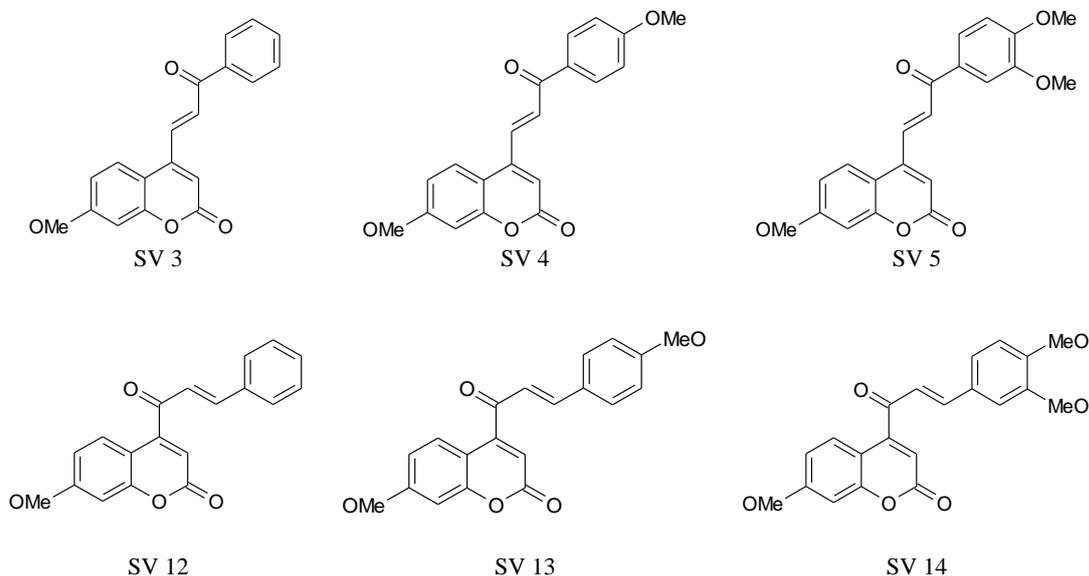


Fig. 52. Structure des composés SV 3, 4, 5, 12, 13 et 14.

Nous avons montré que ces composés présentent une activité inhibitrice moyenne vis-à-vis des CDC25. Cependant, c'est la première fois que des coumarines sont répertoriées en tant qu'inhibiteurs de CDC25. Bien qu'il ne s'agisse pas d'inhibiteurs très puissants, leur squelette de

base constitue un très bon point de départ pour le développement de nouveaux inhibiteurs dans la mesure où des ajouts de groupements secondaires semblent grandement modifier leur capacité d'inhibition vis-à-vis des CDC25. Ces résultats ont été intégrés dans une publication qui présente leur synthèse et leur potentiel inhibiteur (Valente *et al.* 2010). Cette première série de composés a permis le développement de nouveaux dérivés dont les résultats seront présentés plus loin dans ce chapitre.

Dérivés imidazoles

Une série de composés OT comprenant des chromones et des coumaronones liées à une seconde partie oxoimidazole et portant un ou plusieurs cycles secondaires (Fig. 53), a été synthétisée par l'équipe Portugaise du P^r. A. Silva (O. Talhi) en collaboration avec l'équipe du P^r G. Kirsch.

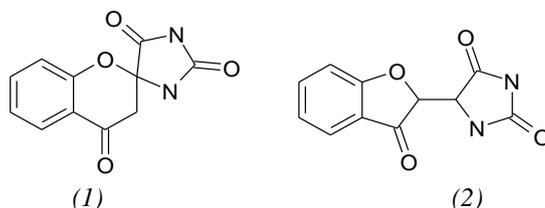


Fig. 53. Structure centrale des composés OT : chromone-oxoimidazole (1) et coumaronone-oxo-imidazole (2).

De par leur proximité structurale avec les coumarines, cette série de composé présente un intérêt pour l'inhibition des CDC25. Comme le montrent les résultats (voir Annexe IV), seuls les composés OT 24 et 27 présentent une légère inhibition vis-à-vis de CDC25C (24% d'activité résiduelle à 100 μ M). Par ailleurs, cette inhibition semble être plus spécifique de CDC25C que de CDC25A où l'activité résiduelle à 100 μ M est de 60 à 80%. Cette série de composés n'a pas été retenue pour une analyse approfondie.

Dérivés coumariniques polysoufrés

Les polysulfures sont capables de réagir avec les groupements thiols par des réactions de thiolation et l'activité biologique de ces composés a déjà été mise en évidence par le passé (Münchberg *et al.* 2007). De nombreuses protéines, dont les CDC25, sont porteuses de résidus cystéines dont le groupement thiol est susceptible d'être impliqué dans des réactions de thiolation. Une telle réaction peut conduire à la formation de perthiol capable de réagir avec les oxydants tels que le dioxygène, pour générer des ERO. Par ailleurs, la réactivité des polysulfures

conduit à la formation de plusieurs espèces sulfurées elles mêmes hautement réactives dans la cellule (Fig. 54, Radicaux R-Sx, sulfure d'hydrogène H₂S, anions sulfures Sx⁻ ou HS⁻, etc.).

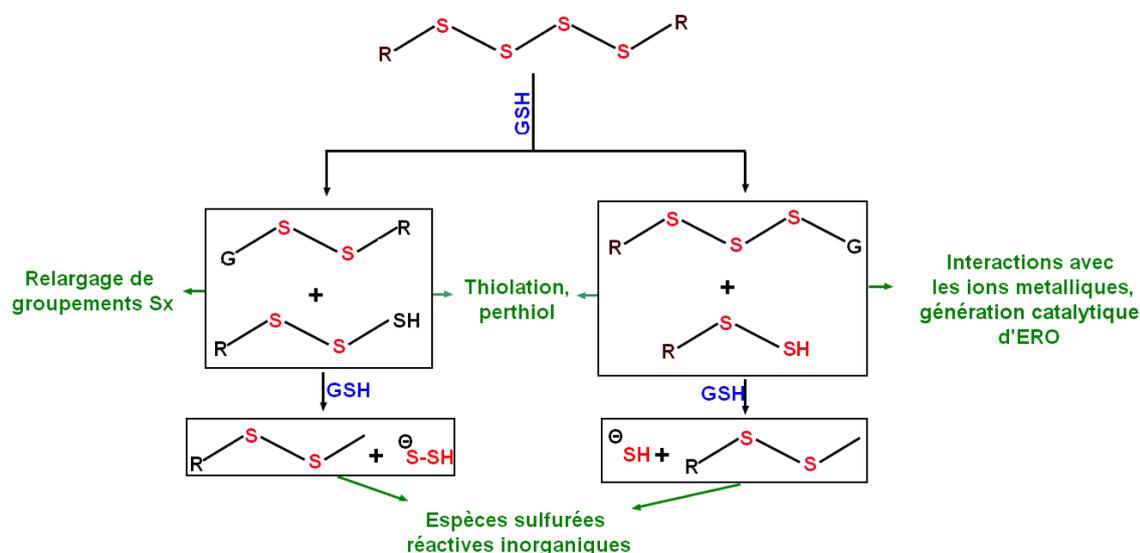


Fig. 54. Réactions des polysulfures avec le glutathion (GSH) intracellulaire

En s'appuyant sur ces observations et sur les précédents résultats obtenus sur les coumarines, trois structures coumarine-polysulfurées (SV25, 28 et 29) ont été synthétisées par l'équipe du P^r G. Kirsch (S. Valente) et évaluées sur les isoformes A, B tronquée et C. Ces structures sont des coumarines polysulfures : di, tri ou tetra-sulfures (Fig. 55).

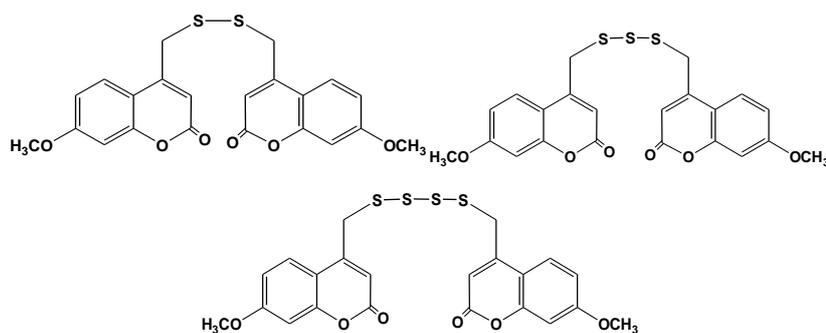


Fig. 55. Structure des composés polysulfurés : SV25(1) di-soufré, SV29(2) tri-soufré et SV28(3) tetra-soufré

Bien que ces trois composés ne présentent pas d'inhibition complète à la concentration de 100 μ M (voir Annexe V et Fig. 56), nous pouvons constater un lien entre le nombre d'atomes de soufre et le potentiel inhibiteur de ces structures. En effet, plus le nombre d'atomes sulfurés est important, plus l'inhibition est forte (SV25 << SV29 << SV28). Les résultats montrent que le composé SV29 tetrasoufré présente la meilleure CI₅₀ pour les isoformes A et C (respectivement

28 et 18 μM). Un parallèle peut être établi entre ces résultats et ceux obtenus précédemment au laboratoire pour les allyls polysulfures, composés de l'ail, pour lesquels un effet similaire avait été observé sur CDC25 (Viry *et al.* 2011).

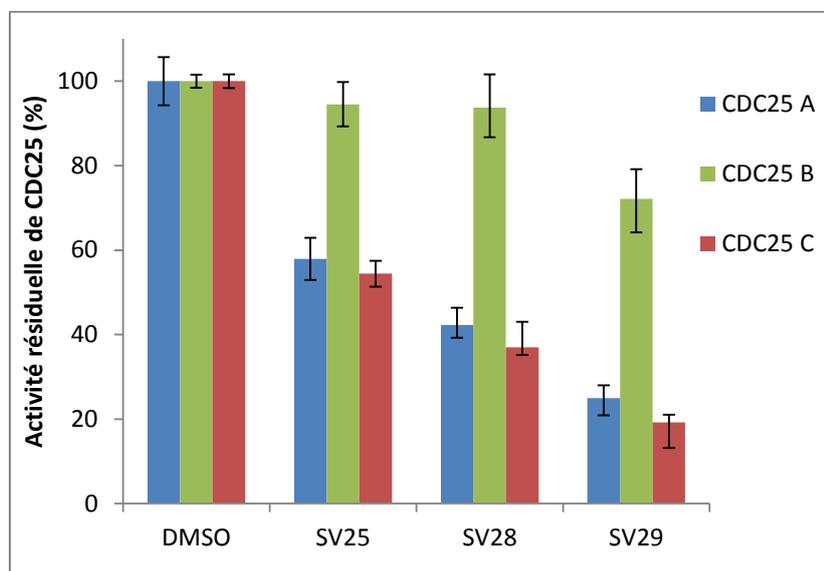


Fig. 56. *Activité résiduelle des phosphatases CDC25 mises en contact avec les composés polysoufrés à 100 μM (A et C complètes et B tronquée). N=9.*

Une étude des effets intracellulaires de ces composés sur la lignée de cancer colorectal HCT116 a été menée avec l'équipe du P^f Montenarh en Allemagne (N. Saidu). Ces travaux ont été publiés (Saidu *et al.* 2012) et ont permis de mettre en évidence un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M lié à l'inhibition de la quantité de CDC25C dans les cellules. Ces résultats soulignent l'importance du criblage *in vitro* dans la compréhension des mécanismes d'action des composés sur les cellules.

Dérivés coumariniques-quinonoïques

D'après les résultats obtenus sur les coumarines, et sur la base des résultats de la littérature qui concernent les composés quinonoïques, il semblait judicieux d'associer ces deux structures. L'équipe de chimie du P^f G. Kirsch (S. Valente et Z. Xu) a donc synthétisé une nouvelle série de composés (SV37, 58 et 59, Annexe VI, première série) qui comprend des quinone-coumarines et des coumarine-dioxocyclopentane (Fig. 57).

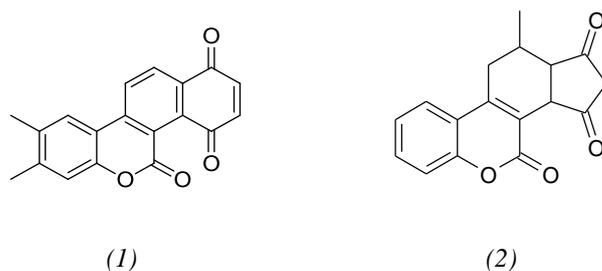


Fig. 57. Structure des composés coumarine-quinone (1) et coumarine-dioxocyclopentane (2) de la série SV-XU.

Dans cette première série, le composé SV58 présente un potentiel inhibiteur faible (activité résiduelle supérieure à 60% pour un traitement à une concentration de 100 μM) tandis qu'on observe une forte activité inhibitrice pour les composés SV59 (CI_{50} pour les isoformes A, B et C respectivement de 13 ; 50 et 2,2 μM) et SV37 (CI_{50} pour les isoformes A, B et C respectivement de 4,3 ; 9,1 et 0,9 μM).

Le composé SV37 (dont les résultats *in vitro* seront approfondis dans la prochaine sous-partie de ce chapitre : « 3. Etude des propriétés d'inhibition du composé SV37 ») constituant le meilleur inhibiteur obtenu jusqu'à présent au laboratoire, une étude biologique approfondie a été réalisée (cette étude sera l'objet du prochain chapitre : « II. Etude des effets du composé SV37 sur les cellules tumorales »).

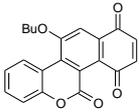
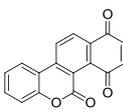
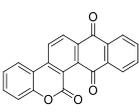
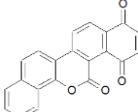
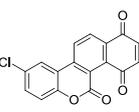
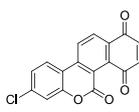
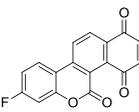
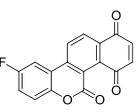
Au vu des résultats biologiques prometteurs, les chimistes ont décidé de synthétiser une seconde série de dérivés coumarines-quinones (XU01 à XU30, Annexe VI, seconde série) dont les composés présentent un potentiel inhibiteur encore plus intéressant *in vitro*. Cependant, pour des raisons de calendrier, l'étude des effets biologiques de ces composés n'a pas pu être réalisée au cours de ces travaux de thèse, et fera l'objet d'un travail ultérieur. Les paragraphes ci-après détaillent donc les premiers résultats obtenus *in vitro* pour cette seconde série.

Les composés coumarine-quinone de cette seconde série présentent une inhibition forte vis à vis des isoformes A et C (CI_{50} comprises entre 0,1 et 8 μM pour les plus actifs, voir Annexe VI, seconde série), à la différence des composés qui portent un dioxocyclopentane et leurs intermédiaires qui présentent peu ou pas d'inhibition vis-à-vis des CDC25. La partie quinone apparaît donc comme essentielle pour l'inhibition dans cette série.

Par ailleurs, en comparant les composés XU02 et XU03 (Tab. 1) qui sont tous deux des composés quinonoïques, nous observons une nette différence de potentiel inhibiteur pour les essais réalisés à une concentration de 25 μM (respectivement, une activité résiduelle pour les

isoformes A et C comprise entre 0 et 0,4 % avec XU02 ; 47 et 58 % XU03, cf. Annexe VI). La différence entre ces composés repose sur l'encombrement de la partie quinone, accolée à un cycle benzène supplémentaire dans le cas du composé XU03. En comparant le composé XU02 avec le composé SV59 (Tab. 1) qui diffère seulement par la présence d'un groupement butyle sur la partie quinone, nous observons aussi une diminution d'efficacité résultant de l'ajout de ce groupement.

En revanche, si nous comparons le composé XU02 avec les deux composés XU21 et XU22 (Tab. 1) qui portent un chlore en position 6 ou 7 de la partie coumarine, nous n'observons peu ou pas de différence dans le potentiel inhibiteur. De plus, pour les composés XU23 et XU25 qui portent un fluor en position 6 ou 7 de la coumarine nous n'observons que peu de différences (Tab. 1). L'addition d'un cycle benzène à l'extrémité du noyau coumarine dans le composé XU30 n'affecte pas ses capacités d'inhibition, les améliorant même légèrement en comparaison avec le composé XU02.

Composé	SV59	XU02	XU03	XU30	XU21	XU22	XU23	XU25
Structure								
CI ₅₀ (μM) CDC25 A	13 ±0,8	2,1±0,2	24 ±0,3	1,5 ±0,4	2,6 ±0,2	1,6 ±0,4	2,2 ±0,2	3,5 ±0,2
CI ₅₀ (μM) CDC25 C	2,2 ±0,8	0,9 ±0,1	>25	0,1 ±0,01	1,4 ±0,2	0,8 ± 0,1	0,7 ±0,02	0,4 ±0,1

Tab. 1. Structure et activité des composés SV 59, XU 02, 03, 21, 22, 23, 25 et 30 sur CDC25 A et C.

Au vu de ces résultats, nous pouvons en conclure que l'addition d'un groupement sur la partie quinonoïque de ce noyau coumarine-quinone diminue l'efficacité de la molécule tandis que l'addition d'un groupement sur la partie coumarine ne diminue pas son efficacité mais peut éventuellement l'améliorer.

Ces résultats soulèvent des questions quant à la pertinence d'une structure coumarine-quinone plutôt que d'une structure quinone seule pour l'inhibition des CDC25. Cette pertinence repose sur plusieurs résultats de la littérature qui montrent clairement une toxicité des composés quinonoïques seuls, tandis que les composés coumariniques sont faiblement toxiques. En effet, même si les quinones constituent les meilleurs inhibiteurs des CDC25 à l'heure actuelle, leur toxicité limite grandement leur application thérapeutique. Outre la possibilité d'induction d'ERO *via* le cycle redox des quinones (Cf. Contexte scientifique, IV.3. Inhibiteurs à structures

quinonoïques), les quinones ont aussi des propriétés électrophiles et une capacité de photoréaction qui génère une phototoxicité et des réactions photoallergiques (Monks *et al.* 1992). Par ailleurs, certaines quinones peuvent présenter une toxicité vis-à-vis des cellules hépatiques, liée à la capacité d'arylation/alkylation de certaines quinones électrophiles, mais aussi au cycle redox des quinones dans une moindre mesure (Ishihara & Shimamoto 2007). A l'inverse des quinones, les coumarines ne présentent pas de propriétés génotoxiques ou carcinogènes chez l'homme, même pour des doses importantes. Cette tolérance est relative à chaque espèce (Lake 1999).

Il est par ailleurs connu que des modifications mineures de la structure d'une quinone peuvent parfois se traduire par une activité biologique et une toxicité différente de celle de départ (Ollinger & Brunmark 1991 ; Monks *et al.* 1992 ; Monks & Jones 2002), ce qui permet d'envisager la synthèse d'un composé quinonoïque efficace et peu toxique. C'est pourquoi la structure quinone-coumarine peut éventuellement présenter un avantage en thérapeutique.

3. Etude des propriétés d'inhibition du composé SV37

Comme nous l'avons évoqué précédemment, bien que d'autres composés de la seconde série quinone-coumarine présentent des CI_{50} plus faibles que celle du composé SV37, c'est ce dernier qui a fait l'objet de l'approfondissement de ce travail de thèse, les autres quinones-coumarines ayant été synthétisées tardivement, suite aux résultats biologiques obtenus sur le composé SV37. Nous avons donc évalué en détail le potentiel inhibiteur du composé SV37 ainsi que de ses sous-parties naphthoquinone et 7-methoxycoumarine-4-thiol afin de déterminer l'intérêt de ce type de structures. Ce composé est constitué d'une quinone reliée à une coumarine par une liaison sulfure (Fig. 58).

L'étude de l'inhibition à la concentration 100 μ M (Fig. 59), montre que le 7-methoxycoumarine-4-thiol n'affecte pas l'activité des CDC25. En revanche, le composé naphthoquinone inhibe totalement chacune des isoformes de CDC25, ce résultat concorde avec les résultats de la littérature (Ham *et al.* 1998). Le composé SV37 présente une inhibition des isoformes équivalente à celle de la partie naphthoquinone seule. Ces résultats montrent que la combinaison entre les parties quinone et coumarine dans la molécule SV37, est équivalente à celle de la naphthoquinone seule à la concentration de 100 μ M. Ceci suggère que l'activité inhibitrice est

principalement portée par la partie quinone, nous verrons ultérieurement l'intérêt d'une telle combinaison.

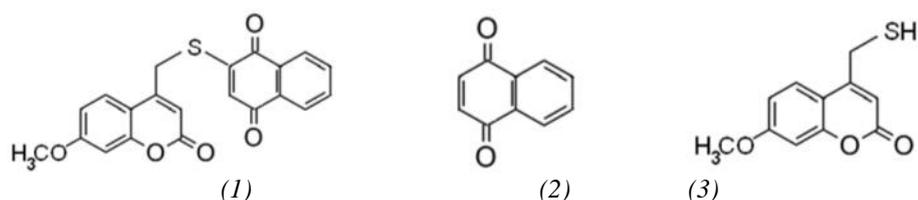


Fig. 58. Structure du composé SV37 (1) et de ses deux sous-parties : naphthoquinone (2) et 7-méthoxycoumarine-4-thiol (3).

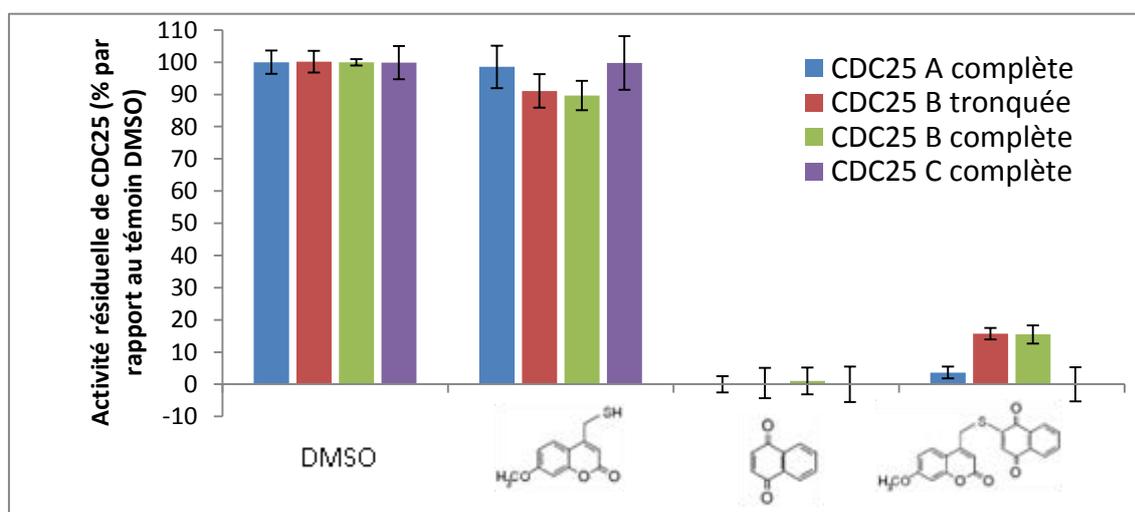


Fig. 59. Activité résiduelle des phosphatases CDC25 A, B et C complète ainsi que B tronquée, mises en contact avec les composés SV37, naphthoquinone et 7-methoxycoumarine-4-thiol. N=9.

L'évaluation de la CI_{50} a été réalisée par un modèle d'approximation non linéaire basé sur la méthode des moindres carrés (Fig. 60). Les valeurs obtenues pour les isoformes A, B tronquée, B complète et C sont respectivement de $4,3 \mu\text{M} \pm 0,1$; $35 \mu\text{M} \pm 9,8$, $9,1 \mu\text{M} \pm 0,6$ et $0,9 \mu\text{M} \pm 0,1$.

Ces résultats montrent que les CI_{50} obtenues pour les isoformes complètes sont équivalentes (entre 1 et $10 \mu\text{M}$). En ce qui concerne la forme tronquée de CDC25B (site actif seul), la CI_{50} est 3 à 4 fois plus élevée que celle obtenue pour la forme partielle, ce qui suggère que la partie N-terminale de la protéine est impliquée dans l'inhibition de la protéine par SV37, mais non indispensable. On peut alors supposer que la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme intervient non seulement sur la partie catalytique, mais aussi sur la partie N-terminale, ou éventuellement entre les deux. Une autre hypothèse suppose que la présence de la chaîne N-terminale dans la protéine

recombinante affecte la conformation de la partie catalytique, et qu'en son absence, il est plus malaisé pour l'inhibiteur d'y accéder.

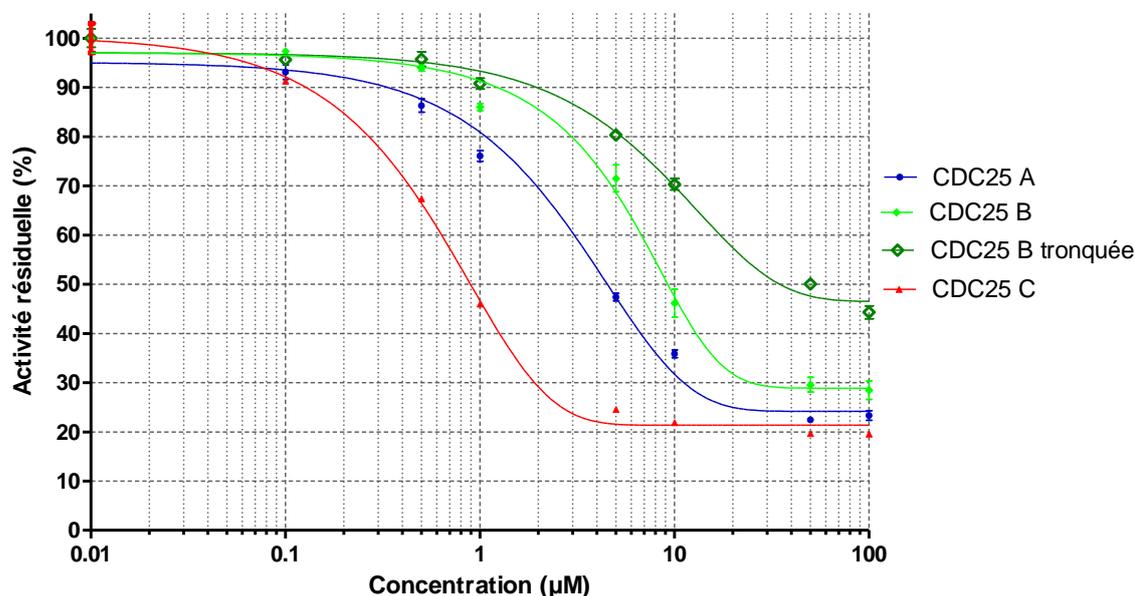


Fig. 60. Courbes de CI_{50} du composé SV37 pour les trois isoformes de CDC25 complètes ainsi que pour l'isoforme B tronquée. Modélisation réalisée avec Graphpad Prism d'après une interpolation non linéaire par la méthode des moindres carrés. $N=3$.

Ce composé peut être considéré comme efficace dans la mesure où les CI_{50} sont inférieures à 10 μM ce qui le place parmi les meilleurs inhibiteurs décrits dans la littérature (CI_{50} comprises entre 0,1 et 40 μM , Lavecchia *et al.* 2012a).

Evaluation du mode de fixation

Le mode de fixation des composés SV3 et SV37 a été évalué, respectivement en tant que coumarine, et quinone-coumarine. Les inhibiteurs enzymatiques peuvent se fixer de manière réversible ou irréversible sur leur cible. Cette fixation dépend entre autres des interactions faibles ou fortes que le composé exerce sur la molécule, de son site de fixation, ou encore de sa polarité. L'étude du mode de fixation permet de déterminer si le composé peut se décrocher de son site de fixation, ou si l'enzyme sera inhibée jusqu'à son élimination.

Le test repose sur un principe d'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme après dilution. Le principe technique est décrit dans la figure ci-après (Fig. 61). Il s'agit de mettre en contact une quantité d'inhibiteur suffisante pour inhiber la plus grande partie des CDC25 (idéalement une

concentration $> CI_{80}$), d'incuber le mélange suffisamment longtemps pour permettre la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme (1), puis de diluer le mélange de façon à obtenir une concentration très faiblement inhibitrice (2) (idéalement une concentration $< CI_{20}$). L'activité enzymatique est ensuite mesurée en présence du substrat 3-OMF-P. Le caractère réversible/irréversible est apprécié par la récupération/non-récupération totale ou partielle de l'activité de CDC25 après dilution (3). Un inhibiteur irréversible ne permettra pas à l'enzyme de retrouver toute son activité après dilution, tandis qu'un inhibiteur réversible se décrochera de l'enzyme et permettra un recouvrement de l'activité enzymatique (Brisson *et al.* 2004 ; Sohn *et al.* 2003).

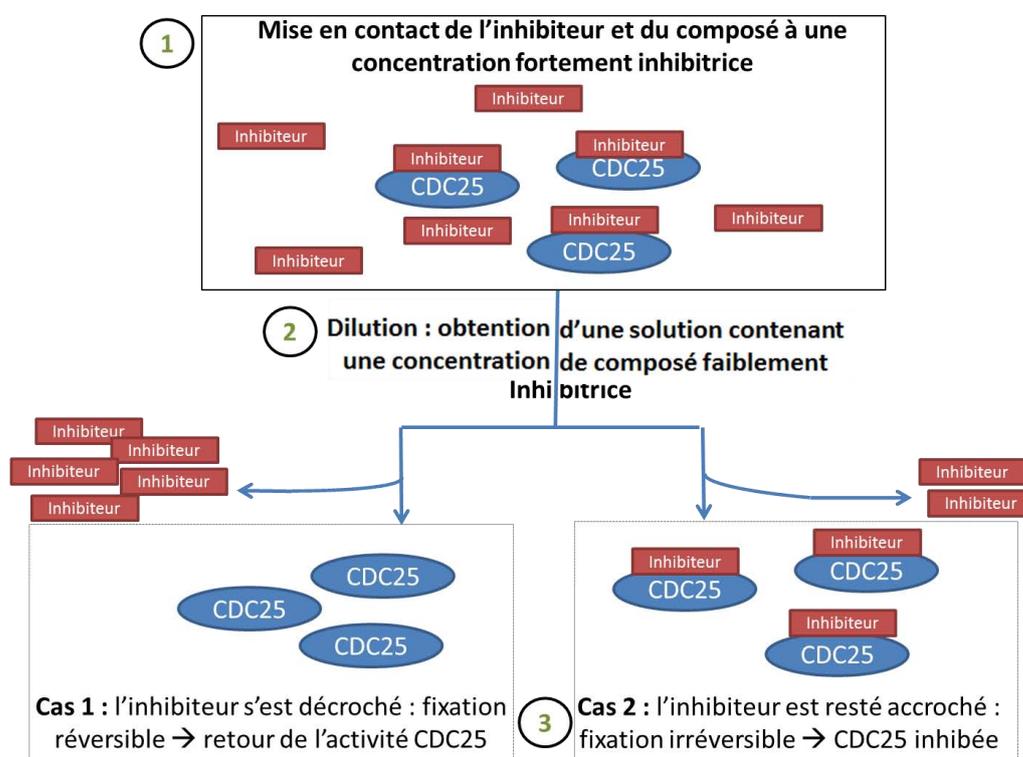


Fig. 61. Principe du test d'évaluation du mode de fixation d'un composé sur CDC25. L'enzyme est mise en contact avec le composé à une concentration fortement inhibitrice et incubée à 30°C un temps suffisant pour permettre aux liaisons de s'établir (1). Dans un second temps, une dilution du mélange doit permettre de décrocher les composés qui ne sont pas fixés de manière irréversible (2 et 3).

Dans un premier temps, nous avons déterminé les concentrations adéquates à utiliser pour ce test en se référant aux courbes de CI_{50} pour les composés SV3 et SV37 (Fig. 62). Nous avons choisi une concentration fortement inhibitrice de 100 μM pour SV3 et de 22 μM pour SV37. Cette concentration, une fois diluée 100 fois pour SV3 et 280 fois pour SV37, permet d'obtenir une concentration faiblement inhibitrice de 1 μM pour SV3 et de 0,12 μM pour SV37.

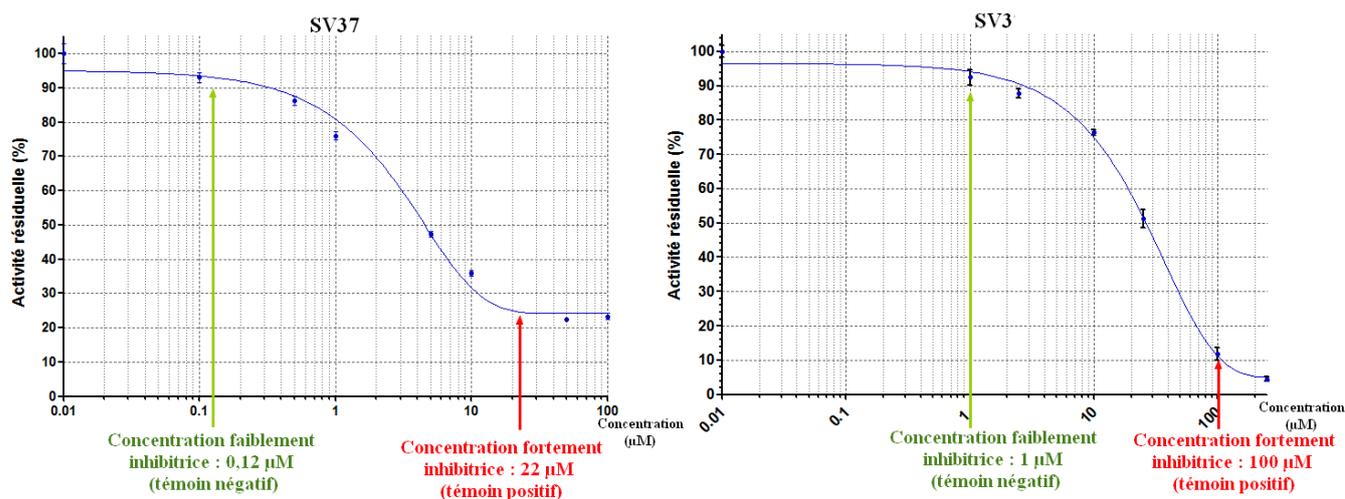


Fig. 62. Courbes de CI_{50} des composés SV37 (gauche) et SV3 (droite) pour CDC25A. Modélisation réalisée avec Graphpad Prism d'après une interpolation non linéaire par la méthode des moindres carrés. En vert et rouge sont indiquées les concentrations qui ont été choisies comme témoins positifs et négatifs pour réaliser le test d'évaluation du mode de fixation de ces deux inhibiteurs à CDC25A. $N=3$.

Pour valider ce test, nous avons besoin d'un témoin positif et d'un témoin négatif nous permettant d'apprécier l'inhibition du composé. La comparaison est réalisée avec un témoin DMSO et deux témoins d'inhibition positive et négative. Dans ces témoins, la concentration de CDC25 est identique à la concentration finale de l'essai (afin d'avoir une activité équivalente lors de la mesure) et les concentrations en inhibiteurs sont égales à la concentration inhibitrice maximale (22 μM pour SV37, 100 μM pour SV3) dans le cas du témoin positif, et minimale (0,12 μM pour SV37 et 1 μM pour SV3) dans le cas du témoin négatif.

L'étude des courbes de réversibilité/irréversibilité obtenues (Fig. 63), montre une récupération de plus de 70% de l'activité des phosphatases CDC25A inhibées par le composé SV37, tandis que le composé SV3 présente moins de 40% d'activité résiduelle après 90min de d'incubation avec le composé. Cette récupération de l'activité, au même niveau que le contrôle d'inhibition négatif pour SV37, montre une réversion de l'inhibition. Le composé SV37 se comporte donc comme un inhibiteur réversible. Le résultat de SV37 tranche avec le résultat obtenu sur la coumarine SV3 qui montre un comportement plutôt irréversible avec plus de 60% d'inhibition persistante après dilution pour une mise en contact préalable de 90min avec le composé.

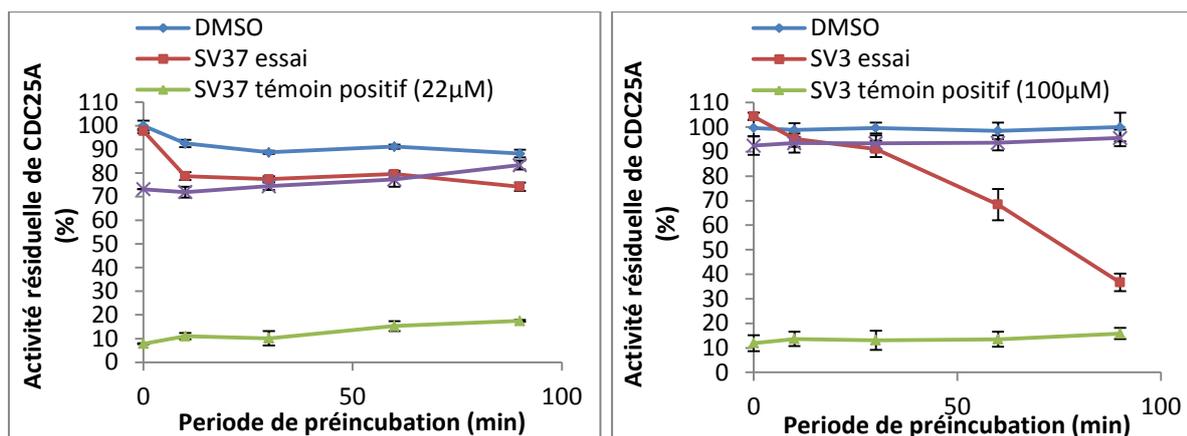


Fig. 63. Activité résiduelle de CDC25A mise en contact pendant différents temps avec le composé SV37 (gauche) et SV3 (droite) au cours du test de réversibilité (cf. paragraphes précédents). N=3.

Ce même test de réversibilité a été réalisé pour SV37 sur l'isoforme C (les concentrations faiblement et fortement inhibitrices choisies sont identiques à celles de l'isoforme A). Les résultats présentent un profil similaire à celui observé sur l'isoforme A (Fig. 64).

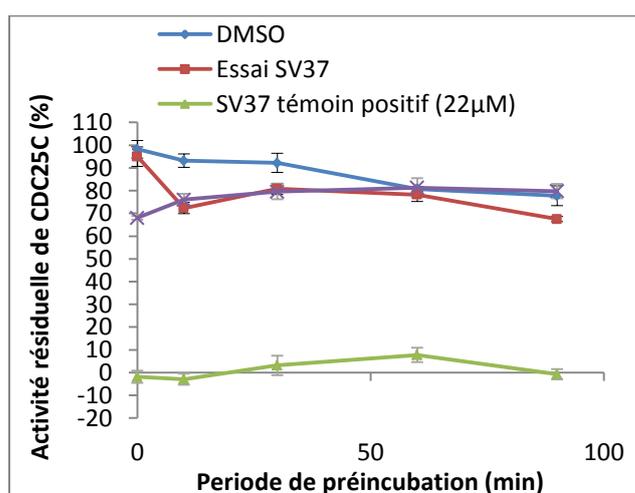


Fig. 64. Activité résiduelle de CDC25C mise en contact pendant différents temps avec le composé SV37 au cours du test de réversibilité. N=3.

En parallèle de ces essais enzymatiques, une collaboration avec l'équipe de chimie du LSMCL (P^r P. Chaimbault et E. Sibille) a permis de mettre au point une méthode de détermination du caractère réversible/irréversible d'un composé. Il s'agit d'un criblage par spectrométrie de masse qui emploie une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur à temps de vol (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry* : MALDI-TOFMS).

Le test consiste en une incubation de la molécule candidate avec la totalité de la protéine cible, suivie d'une étape d'ultrafiltration. Le rétentat est ensuite directement analysé par MALDI-TOFMS. Dans le cas d'un inhibiteur réversible, l'énergie du laser est suffisante pour casser la liaison faible existant entre le composé et la CDC25. Une fois cette liaison rompue, le ligand libre est ensuite détectable. Dans le cas des inhibiteurs irréversibles, afin de déterminer si le composé est lié de manière covalente à la cible, le rétentat est digéré par trypsination, puis le produit de digestion est analysé par la technique de l'empreinte peptidique de masse (*peptide mass fingerprinting* : PMF). Dans le cas d'un inhibiteur réversible, le site actif des CDC25 est détecté, tandis que dans le cas d'un inhibiteur irréversible, ce dernier masque le site actif qui n'est pas détecté.

Ce travail collaboratif réalisé sur le composé SV37 et testé sur les isoformes A et C a permis de confirmer les résultats obtenus par la méthode enzymatique, validant ce test de criblage rapide permettant la détection du caractère réversible/irréversible des inhibiteurs de CDC25 à partir d'une préparation d'échantillon simple (Sibille *et al.* 2012).

Evaluation du type d'inhibition

Dans le cas d'un inhibiteur réversible, la fixation du composé à l'enzyme est non covalente. Ce type d'inhibition peut être compétitif, incompétitif ou mixte. Dans le but de déterminer ce type d'inhibition, une étude de la cinétique (Fig. 65) du comportement de CDC25A vis-à-vis du substrat 3-OMF-P en présence du composé SV37 a été réalisée. Les constantes K_M , V_{max} , K_i et K_i' (respectivement, constantes de formation des complexes enzyme-inhibiteur et enzyme-substrat-inhibiteur) ont été déterminées en présence de doses croissantes de ce composé.

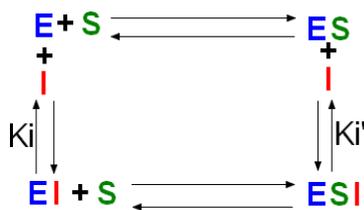


Fig. 65. Représentation de la cinétique du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur. *S* : substrat, *I* : inhibiteur, *E* : enzyme, K_i constante de formation du complexe enzyme-inhibiteur, K_i' : constante de formation du complexe enzyme-substrat-inhibiteur

Les représentations graphiques utilisées pour déterminer le type d'inhibition ont été adaptées d'après l'équation de Michaelis et Menten $V_i = (V_{max} \cdot [S]) / ([S] + K_M)$ (Fig. 66) dans le cas d'une cinétique Enzyme-Substrat-Inhibiteur. La méthodologie employée est précisément décrite dans la section « Matériel et Méthodes I.3 ».

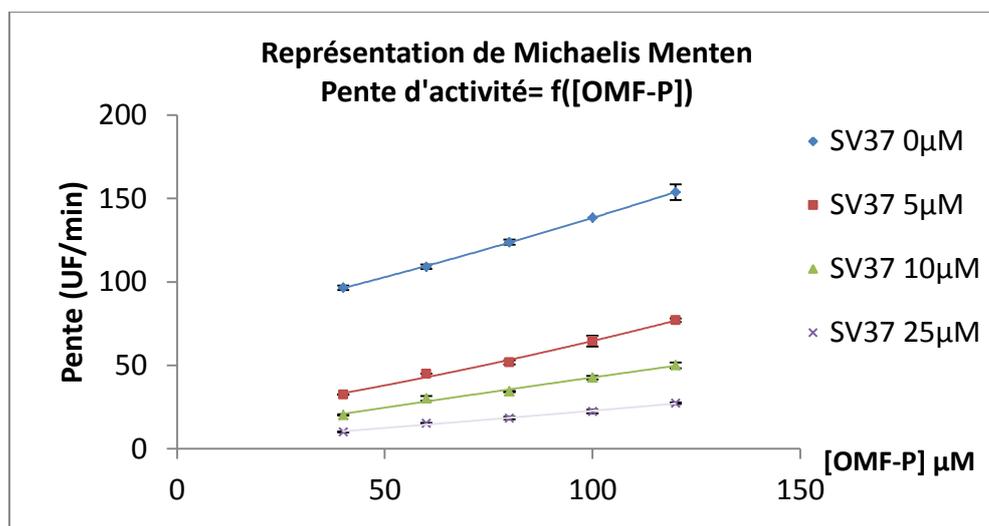


Fig. 66. Représentation de Michaelis et Menten modélisant d'activité de la phosphatase CDC25 pour différentes concentrations de substrat 3-OMFP. $N=3$.

En traçant la représentation graphique de Lineweaver-Burk (Fig. 67) nous obtenons directement K_M , V_{max} , α et α' dont sont déduits K_i et K_i' (Tab. 2). A partir de ces constantes nous en déduisons le type d'inhibition :

- inhibition compétitive : $\lim_{[I] \rightarrow \infty} (K_i') = \infty$; $\lim_{[I] \rightarrow \infty} (K_i) = \infty$; V_{max} reste inchangé ; K_M augmente ;
- inhibition non compétitive : $K_i = K_i'$; V_{max} diminue ; K_M reste inchangé ;
- inhibition mixte : $K_i \neq K_i'$; V_{max} diminue ; K_M augmente.

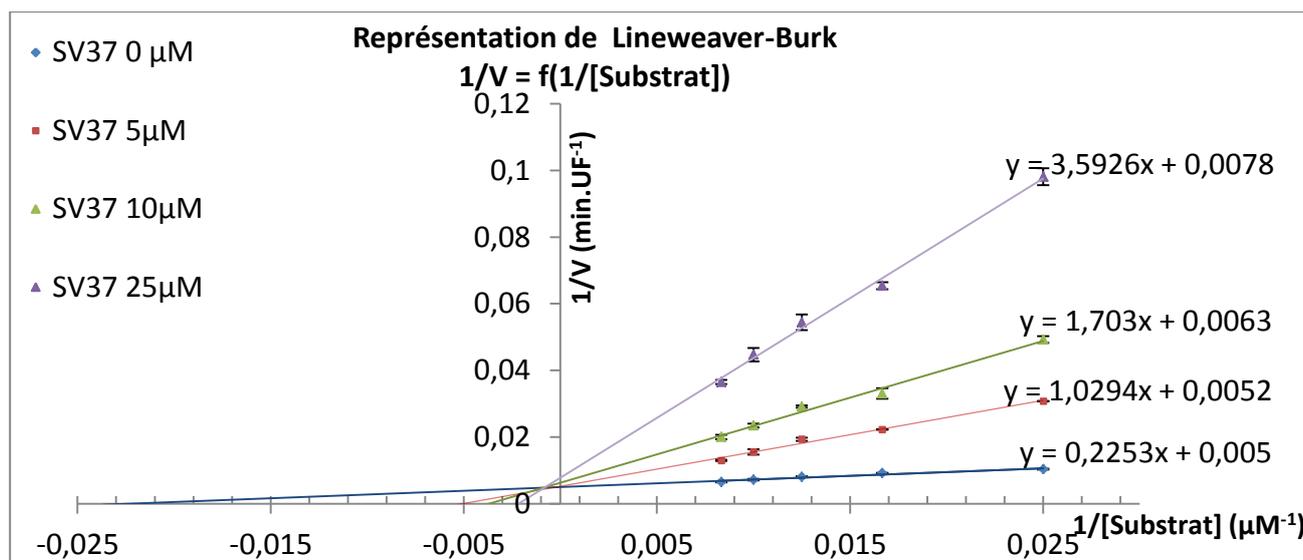


Fig. 67. Représentation de Lineweaver Burk modélisant l'activité de CDC25A pour différentes doses de l'inhibiteur SV37 en présence de différentes concentrations de substrat 3-OMFP. N=3.

[SV37](μM)	K_M (μM)	V_{\max} (UF/min)	α	α'	K_i (μM)	K_i' (μM)
0	45.06	200	1	1	-	-
5	197.96	192.31	4.57	1.04	8.77	125
10	270.32	158.73	7.55	1.26	1.53	38.46
25	460.59	128.21	15.93	1.56	1.67	44.64

Tab. 2. Valeur des constantes K_i et K_i' (déduites de α et α'), K_M et V_{\max} .

Cette évaluation des caractéristiques cinétiques de l'enzyme nous permet de classer le composé SV37 parmi les inhibiteurs mixtes car nous observons que lorsque la dose d'inhibiteur augmente, K_M augmente et V_{\max} diminue, ce qui indique que l'inhibiteur perturbe la liaison du substrat à l'enzyme mais aussi qu'une forte concentration de substrat n'est pas capable de déplacer l'inhibiteur de son site de fixation.

Dans le cas d'une inhibition mixte, nous pouvons déterminer les liaisons préférentielles de l'inhibiteur à la forme libre de l'enzyme ($K_i \ll K_i'$) ou à un complexe enzyme-substrat déjà formé ($K_i \gg K_i'$). Or nous observons que $K_i' > K_i$ ce qui suggère une liaison préférentielle mais non impérative de l'inhibiteur à la forme libre du substrat. Donc une fixation préférentielle lorsque le site catalytique est libre. Ces observations concordent avec les résultats obtenus pour l'isoforme B tronquée (site catalytique uniquement) et B complète, qui montraient une CI_{50} plus importante lorsque la chaîne N-terminale était présente, ce qui suggère une fixation de l'inhibiteur sur un site allostérique, différent du site de liaison du substrat mais qui participe à sa liaison et/ou à sa catalyse.

D'une manière générale, on peut considérer qu'un composé irréversible aura un plus grand effet sur les cellules cancéreuses et non cancéreuses dans la mesure où sa fixation sera permanente. De la même manière, dans les cellules non cancéreuses périphériques à la tumeur et ne surexprimant pas CDC25, un inhibiteur réversible sera en principe moins toxique. Les inhibiteurs réversibles peuvent donc présenter un intérêt dans la limitation des effets délétères sur les cellules saines.

Ce composé, de par ses qualités inhibitrices (faible CI_{50}) et ses caractéristiques particulières d'inhibition mixte réversible, constitue un candidat intéressant pour la poursuite de tests sur les cellules. Nous avons donc poursuivi l'étude de ce composé dans les lignées cellulaires pour définir son potentiel thérapeutique et son mode d'action.

II. Etude des effets du composé SV37 sur les cellules tumorales et non tumorales

Cette étude a été réalisée sur plusieurs lignées cellulaires comprenant : trois lignées issues de carcinome mammaire humain (MCF-7, MDA-MB-231 et VCR-Res : dérivée de cellules MCF-7 résistantes aux traitements anticancéreux) ; une lignée issue d'hépatocarcinome humain (HEP-G2) et une lignée de cellules mammaires immortalisées (hTERT-HME1).

1. Evaluation du caractère cytostatique/cytotoxique

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'effet du composé SV37 et de ses sous-parties coumarinique et quinonoïque sur la croissance cellulaire évaluée à l'aide du test MTT.

Les CI_{50} obtenues sur les lignées cellulaires (Tab. 3) concordent avec celles obtenues *in vitro*. En effet, la sous-partie 7-méthoxycoumarine-4-thiol inhibe peu ou pas la croissance des cellules tandis que la sous-partie naphthoquinone et le composé SV37 présentent des CI_{50} aux environs de 5 à 10 μ M pour les meilleures. Ces résultats suggèrent que la partie quinonoïque du composé est principalement responsable de la diminution de la croissance cellulaire dans ces lignées, ce qui concorde avec l'inhibition des CDC25 *in vitro*.

Le composé SV37 semble peu actif sur la lignée HepG2. Ceci peut s'expliquer par le fait que la lignée HepG2 possède la plupart des fonctions hépatocellulaires, et notamment la plupart des enzymes métaboliques de phase II (Westerink & Schoonen 2007) nécessaires à la conjugaison et à l'élimination des quinones (Ishihara & Shimamoto 2007 ; Ishihara *et al.* 2011). Cette lignée est d'ailleurs largement employée comme modèle pour les études de cytotoxicité hépatique (Knasmüller *et al.* 2004 ; Mersch-Sundermann *et al.* 2004). Par ailleurs, la lignée non cancéreuse hTERT-HME1 semble être plus résistante au composé SV37 que les lignées de carcinome mammaire. Ceci peut suggérer une bonne tolérance des cellules non cancéreuses vis-à-vis de ce composé. De plus, la lignée VCR-Res présente une sensibilité comparable à celles des lignées de carcinome mammaire ce qui constitue un résultat intéressant car cette lignée est connue pour sa multi-résistance à plusieurs agents anticancéreux (ex. vincristine, adryamycine, cisplatine, étoposide, Osbild *et al.* 2006 ; Whelan *et al.* 1992).

Lignée cellulaire	SV37 CI ₅₀ (μM)	Naphtoquinone CI ₅₀ (μM)	7-méthoxycoumarine-4-thiol CI ₅₀ (μM)
MCF-7	11,2 ±0,7	6,2 ±0,2	>100
MDA-MB-231	9,5 ±1,0	6,8 ±0,4	69,8 ±4,6
VCR-Res	12,8 ±1,9	18,9 ±0,5	ND
hTERT-HME1	18,1 ±1,3	5,8 ±0,5	ND
Hep G2	65,4 ±4,7	32,8 ±2,3	ND

Tab. 3. CI₅₀ des composés SV37, naphtoquinone ou 7-méthoxycoumarine-4-thiol pour les lignées MCF-7, MDA-MB-231, VCR-Res, hTERT-HME1 et Hep G2

Nous nous sommes ensuite intéressés à la nature de cette inhibition de croissance par SV37 dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231. Grâce à un test d'exclusion au bleu de trypan nous avons pu déterminer si ce composé était cytostatique ou cytotoxique. Les courbes de CI₅₀ des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Fig. 68) nous ont permis de choisir une valeur proche de la CI₅₀ des deux lignées (10 μM) et une proche de la CI₇₅ des deux lignées (25 μM) pour réaliser les tests de cytotoxicité/cytostaticité.

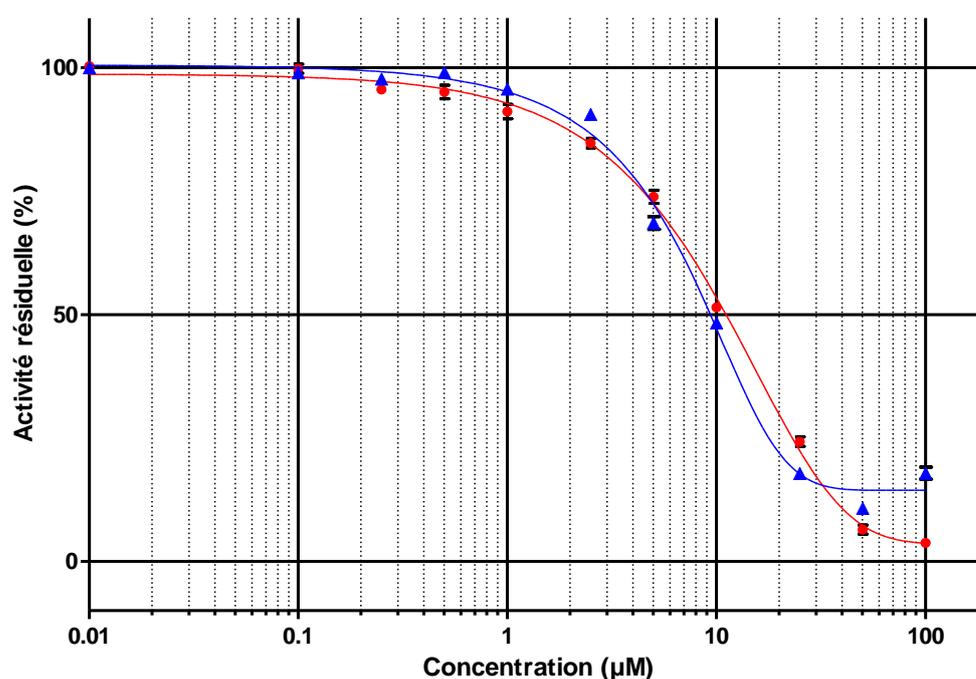


Fig. 68. Courbe de CI₅₀ du composé SV37 pour MCF-7 (rouge) et MDA-MB-231 (bleu). Modélisation réalisée avec Graphpad Prism d'après une interpolation non linéaire par la méthode des moindres carrés. N=3.

Les courbes de population des cellules viables et non viables (Fig. 69) montrent un effet cytostatique pour MCF-7 à la concentration de 10 μM (valeur proche de la CI_{50}). En effet, le nombre de cellules mortes n'augmente pas par rapport au témoin à cette dose, alors que la population totale ne croit pas aussi rapidement que dans le témoin. En revanche, à la concentration de 25 μM (valeur proche de la CI_{75}), nous observons une nette augmentation de la mortalité dès 12h de traitement. Pour MCF-7 nous observons donc un effet dose dépendant, cytostatique à la concentration de 10 μM et cytotoxique au-delà.

Pour la lignée MDA-MB-231, nous observons un fort effet cytotoxique pour une concentration de 10 μM dès 24h de traitement, et dès 12h de traitement pour une concentration de 25 μM . Ces résultats suggèrent un mode d'action du composé SV37 différent selon la lignée cellulaire utilisée.

Cette différence de comportement peut éventuellement être liée aux mécanismes moléculaires spécifiques à chaque lignée. En effet, la lignée MCF-7 est déficiente en caspase 3 (Jänicke *et al.* 1998) à l'inverse de la lignée MDA-MB-231. L'absence de caspase 3 contribue clairement à la résistance aux composés chimiques en altérant l'exécution de la réponse apoptotique, bien que sa présence ne soit pas indispensable au déclenchement de l'apoptose (Jänicke *et al.* 1998 ; Blanc *et al.* 2000). Par ailleurs, les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 présentent un statut ER/PR différent : la lignée MCF-7 est ER+/PR+/HER2- et à l'inverse la lignée MDA-MB-231 est ER-/PR-/HER2- (Subik *et al.* 2010 ; Papanikolaou *et al.* 2009). Un lien entre ces différences et la sensibilité des cellules aux agents chimique a été suggéré par plusieurs études qui montrent que les lignées ER négatives sont plus sensibles aux agents chimiothérapeutiques que les lignées ER positives (Berry *et al.* 2006 ; Sui *et al.* 2007 ; Brady-West & McGrowder 2011). Nos résultats soutiennent donc cette thèse.

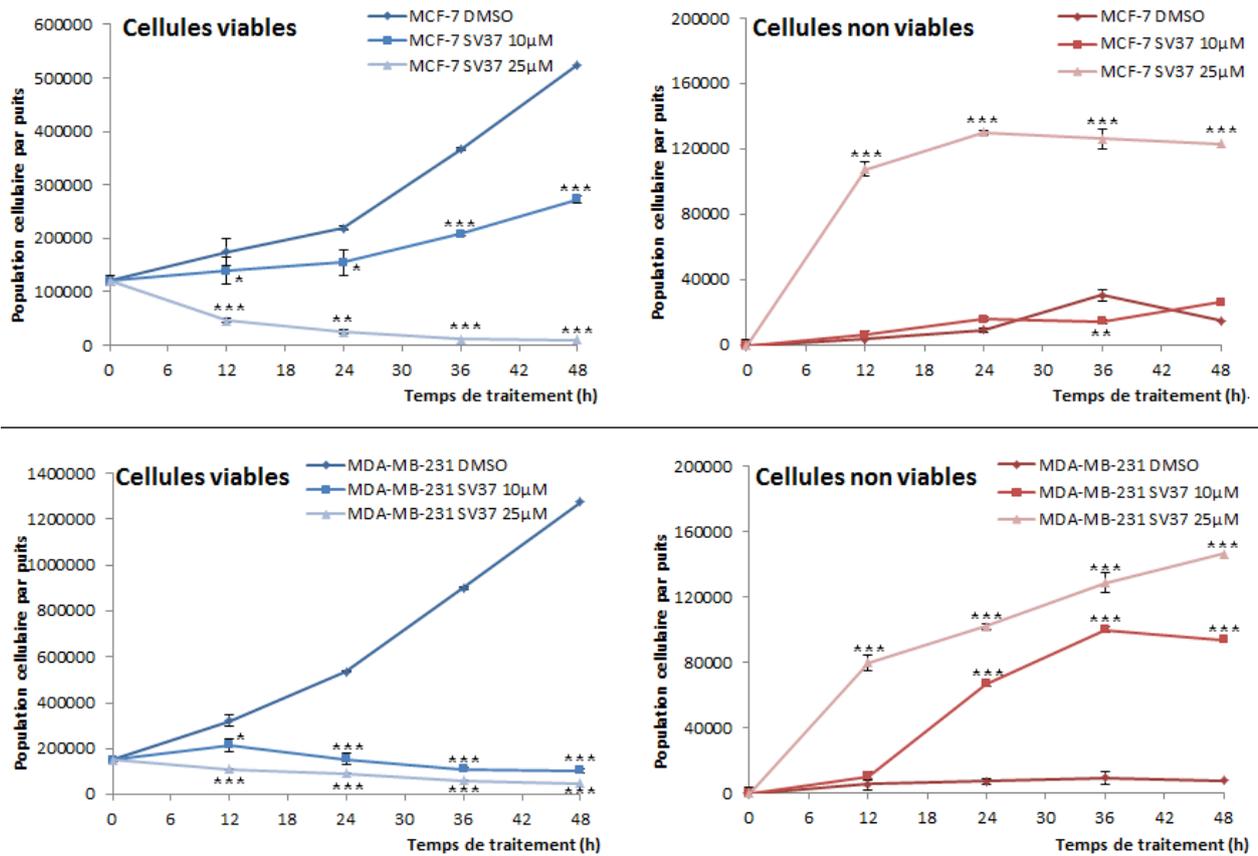


Fig. 69. Population cellulaire viable et non viable des lignées MCF-7 (haut) et MDA-MB-231 (bas) traitées avec une concentration de 10 ou 25 μM de composé SV37 ou avec du DMSO. Les cellules viables (gauche) et non viables (droite) ont été comptées par microscopie après coloration au bleu de trypan. La significativité est calculée par rapport au contrôle DMSO correspondant. $N=3$.

En plus des tests de viabilité en bleu de trypan, le suivi en microscopie des cellules traitées (système Incucyte) montre des altérations cellulaires caractéristiques d'une mort cellulaire dans les cellules MDA-MB-231. Les changements morphologiques (condensation nucléaire, apparition de vésicules, dislocation de la membrane) apparaissent dès 8h de traitement à une concentration de 10 μM (Fig. 70). Ces changements suggèrent la mort cellulaire dans cette lignée. En ce qui concerne les cellules MCF-7, un arrêt de la prolifération a été observé, il est accompagné par des changements morphologiques dès 16h de traitement (Fig. 71), puis les cellules restent dans le même état pendant au moins 64h. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par coloration au bleu de trypan qui montrent un effet cytotoxique dans les cellules MDA-MB-231 et cytotatique dans les cellules MCF-7.

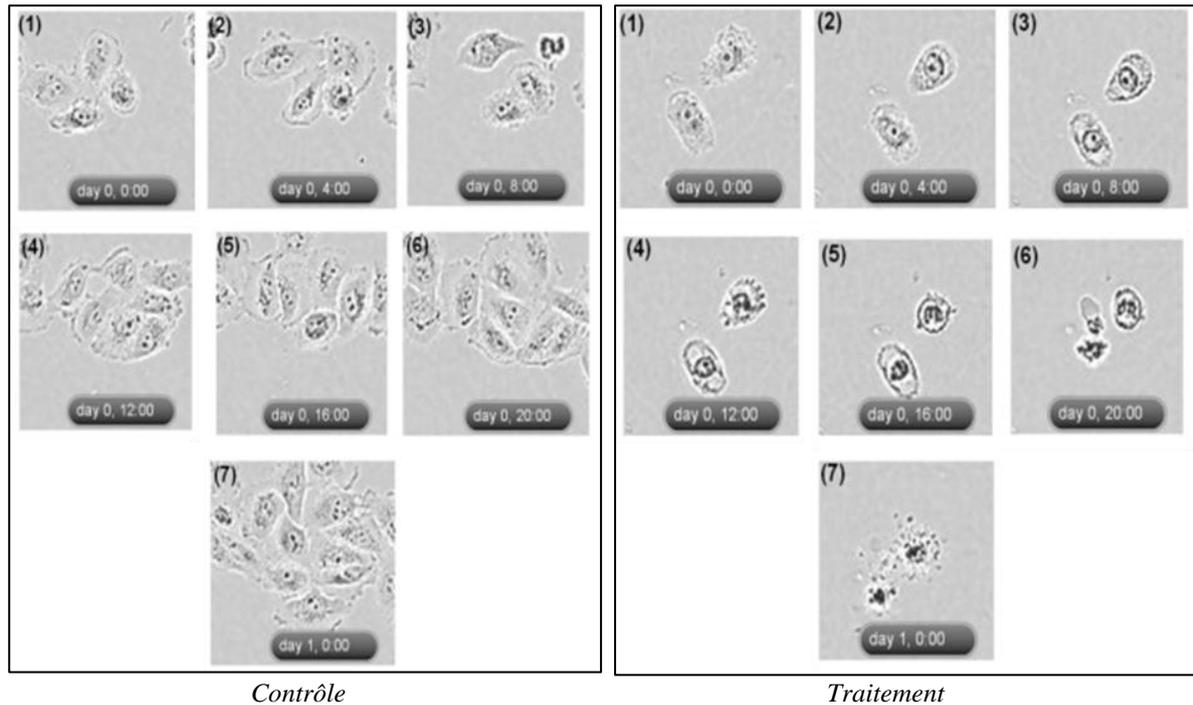


Fig. 70. Observation microscopique des cellules MDA-MB-231 traitées par SV37 à une concentration 10 μ M pendant 24h

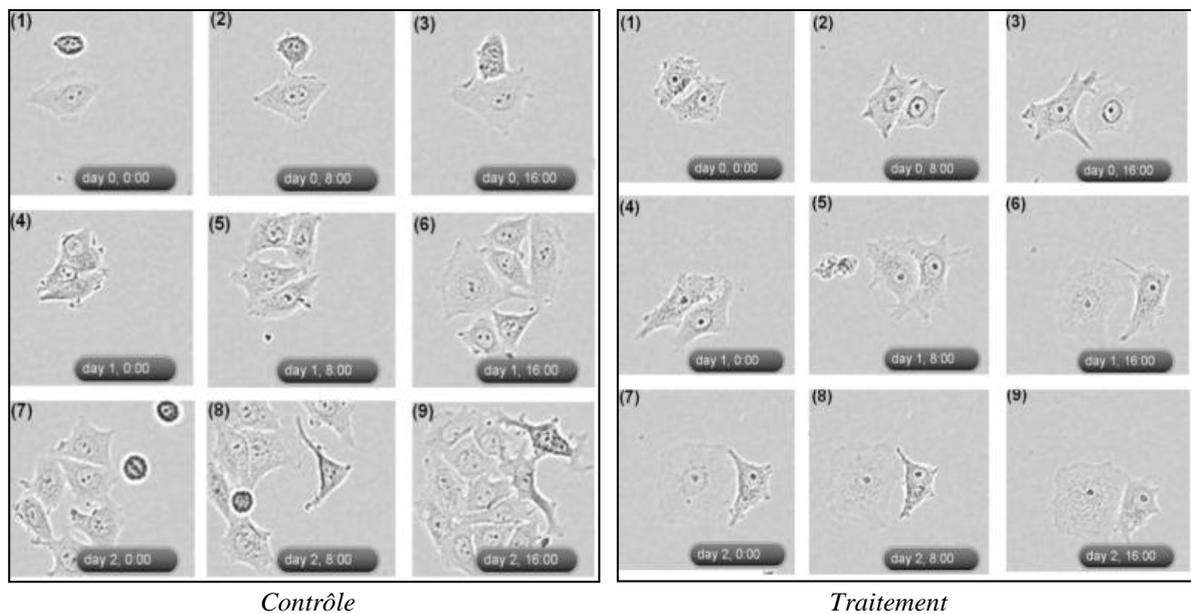


Fig. 71. Observation microscopique des cellules MCF-7 traitées par SV37 à une concentration de 10 μ M pendant 64h.

2. Analyse du cycle cellulaire dans la lignée MCF-7

Nous nous sommes intéressés à l'effet cytostatique du composé sur la lignée MCF-7. Afin de confirmer un arrêt de la croissance, une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux a été

réalisée. Les cellules MCF-7 ont été mises en contact pendant 48h avec le composé SV37 à une concentration de 10 μ M. Les résultats montrent une augmentation de la proportion de cellules en phase G₀/G₁ par rapport aux témoins, et ce, dès 12h de traitement. Parallèlement à cette accumulation, nous observons une chute de la proportion des cellules en phase S et G₂/M. Ces résultats suggèrent un arrêt du cycle cellulaire après le traitement, confirmé par l'effet cytostatique observé en microscopie.

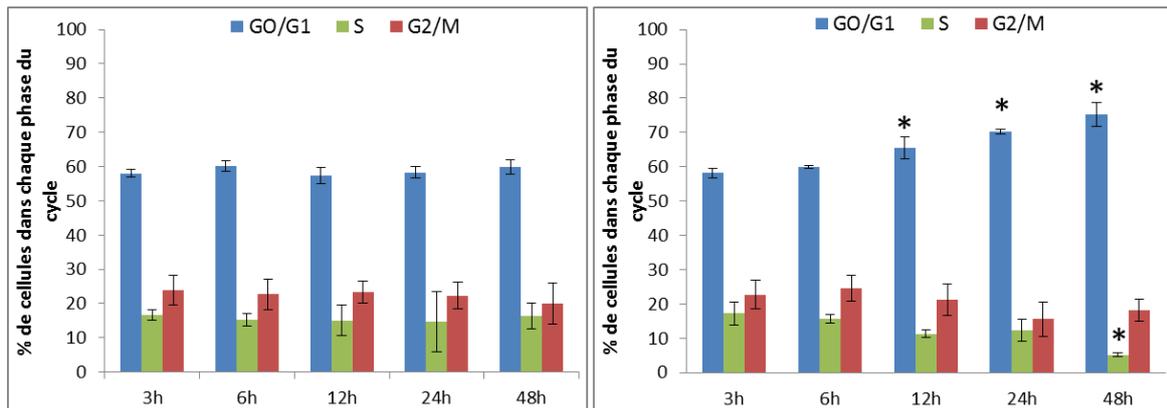


Fig. 72. Répartition des cellules dans les différentes phases du cycle G₀/G₁ (bleu), S (vert) et G₂/M (rouge) pour différents temps dans les cellules témoins non traitées (à gauche) et traitées (à droite). N=3.

L'arrêt du cycle cellulaire observé semble peu important en comparaison avec les résultats obtenus avec le bleu de trypan qui montrent un arrêt massif de la croissance. Compte tenu du fait que le composé SV37 est capable d'inhiber les trois isoformes de CDC25 *in vitro*, nous pouvons supposer qu'une telle inhibition induirait un blocage dans toutes les phases du cycle dans les cellules (dans l'éventualité d'une inhibition des trois isoformes de CDC25 dans la cellule). Cet arrêt serait donc difficilement visible lors de l'analyse.

Une synchronisation des cellules avant traitement pourrait permettre de dégager des informations plus claires de cette analyse du cycle. Nous nous sommes donc appliqués à choisir une méthode de synchronisation efficace pour les cellules MCF-7.

3. Evaluation des méthodes de synchronisation cellulaire

Il existe de nombreuses méthodes de synchronisation cellulaire (Ashihara & Baserga 1979 ; Tate 2005 ; Schorl & Sedivy 2007). Ces techniques sont hautement dépendantes de la lignée cellulaire utilisée et des conditions de culture employées. Il convenait donc d'adapter les méthodes à nos lignées.

Etant donné la multitude d'agents existants et le peu de détails quant à leurs effets, nous avons choisi le nocodazole, un agent couramment reporté dans la littérature pour la synchronisation de la lignée MCF-7 (Wang *et al.* 1997 ; Blajeski *et al.* 2002 ; Jiao *et al.* 2007 ; Woeller *et al.* 2007). Cet agent est un inhibiteur de l'assemblage des microtubules et donc capable d'arrêter les cellules en phase G₂/M. Dans la cellule, le nocodazole se lie directement à la tubuline, et induit un changement de conformation spatiale de cette dernière, ce qui la rend plus exposée aux espèces radicalaires. Cette exposition induit la dépolymérisation des dimères de tubuline.

Les protocoles de la littérature présentent des doses et des temps d'incubation très variables qui vont de 12h à 24h et de 10 à 400 ng.mL⁻¹ de nocodazole. Aucune méthode consensuelle n'est décrite spécifiquement pour cet agent et aucun test de cytotoxicité ou de vérification de la synchronisation n'a été décrit dans la littérature. Nous avons donc choisi dans un premier temps de réaliser des tests approfondis pour déterminer la dose optimale, les effets cytotoxiques éventuels et la durée effective de la synchronisation.

La viabilité cellulaire pour différentes doses et temps de traitement a été estimée après coloration au bleu de trypan (Fig. 73). Les résultats montrent une faible toxicité du nocodazole (viabilité supérieure à 80%) même à de fortes doses. L'étude de la population totale montre un fort effet cytostatique dose dépendant. Ces deux résultats suggèrent un arrêt du cycle cellulaire sans mortalité.

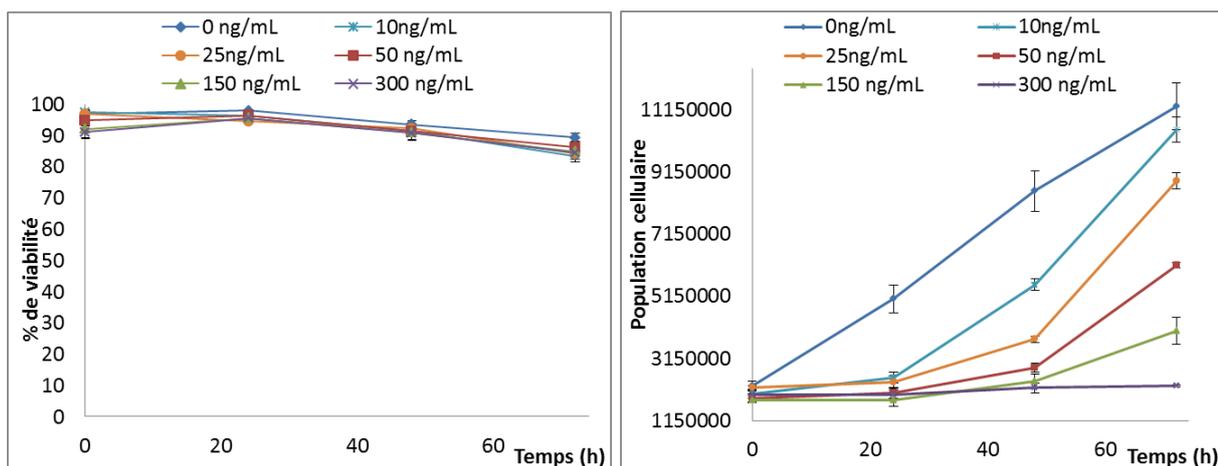


Fig. 73. Pourcentage de viabilité cellulaire (gauche) et population totale (droite) des cellules MCF-7 traitées par différentes doses de nocodazole et différents temps après le retrait du nocodazole. N=3.

Par ailleurs, les observations microscopiques montrent un arrondissement des cellules traitées caractéristique du phénomène de pseudo-détachement mitotique (Fig. 74).

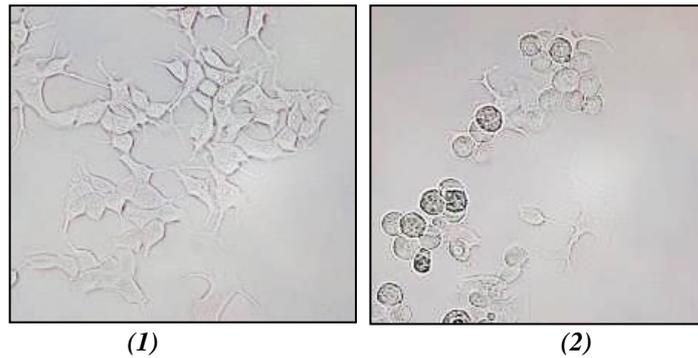


Fig. 74. Observation microscopique des cellules MCF-7 non traitées (1) et traitées (2) par le nocodazole à 50 ng/mL

L'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (Fig. 75) montre une forte accumulation de la population en phase G_2/M pour des doses qui vont de 25 à 300 ng/mL après retrait du nocodazole. Toutefois, dès 24h après le retrait du nocodazole, les cellules ne sont plus synchronisées dans une même phase du cycle, et les populations retrouvent une distribution semblable à celle du témoin. Cette observation montre que la synchronisation ne dure pas plus d'un cycle cellulaire, il apparaît donc impossible d'utiliser cette technique dans ces conditions pour synchroniser les cellules MCF-7.

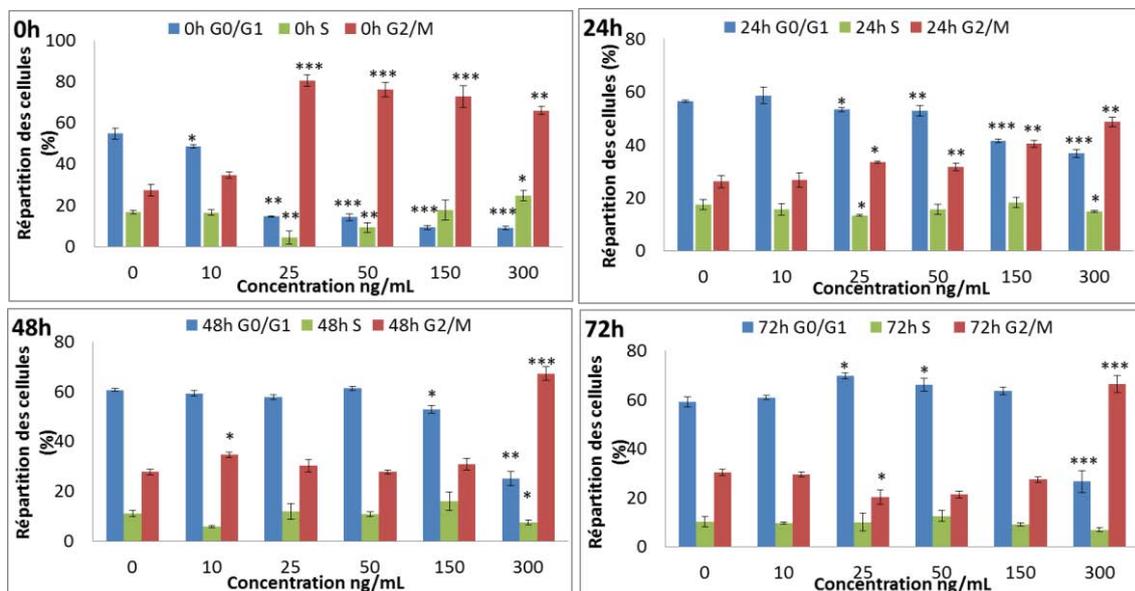


Fig. 75. Analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle (en pourcentage par rapport à la totalité des cellules), pour les différentes concentrations en nocodazole et différents temps après le retrait du nocodazole. N=3.

Nous pouvons supposer que les cellules ne sont pas arrêtées exactement au même stade de la phase G_2/M dans la mesure où l'inhibition des microtubules affecte les cellules du début de la

phase G₂ à la fin de la phase M. Il est probable que cette différence soit suffisamment importante pour que les cellules ne reprennent pas tout à fait simultanément le cours de leur cycle après élimination du nocodazole.

Afin de palier ce défaut, nous avons essayé de combiner la technique de synchronisation chimique par le nocodazole, à une technique physique : le *shake-off* ou technique du détachement mitotique (Terasima & Tolmach 1963 ; Taylor *et al.* 1983). Cette technique repose sur la propriété de pseudo-détachement des cellules en mitose. En effet, lors de la mitose, les cellules ont tendance à relâcher leur attachement au support et à être moins fermement adhérentes à ce dernier. En réalisant une succession de secousses sur le support, il est possible de détacher ces cellules et d'obtenir ainsi des cellules uniquement en phase M. Dans un premier temps, nous avons réalisé un traitement avec le nocodazole pour enrichir la population en phase G₂/M, puis les cellules en phase M ont été récupérées et mises en culture. Elles sont donc a priori toutes synchrones.

L'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle après traitement par le nocodazole, puis récupération par *shake-off* (Fig. 76), montrent que la quasi-totalité des cellules se trouve bien en phase G₂/M. Toutefois 24h après retrait du nocodazole, nous pouvons observer une désynchronisation et les cellules se répartissent dans les phases du cycle jusqu'à retrouver le profil type du contrôle.

Ce phénomène peut s'expliquer par une désynchronisation des cellules après le passage en phase G₁. Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature, et le maintien de la synchronisation est parfois controversé car la plupart des méthodes ne permettent pas de synchroniser plus de 2 à 3 cycles cellulaires consécutifs (Keyomarsi *et al.* 1991). Nous assistons parfois à une désynchronisation des cellules lors du passage en phase G₁, toutefois bien peu d'études s'assurent de la pérennité de la synchronisation avant de l'employer, il nous est donc difficile de comparer nos résultats avec la littérature.

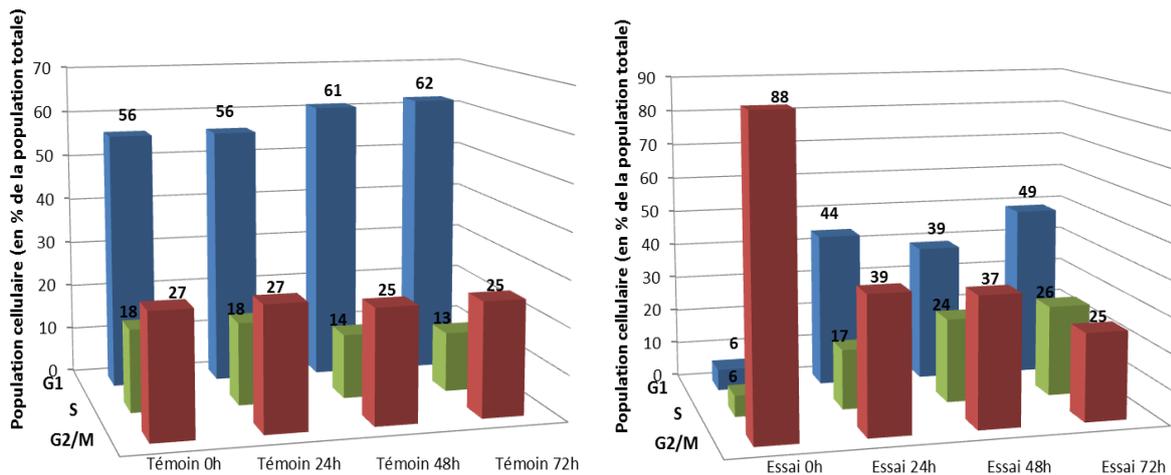


Fig. 76. Répartition des cellules MCF-7 dans les différentes phases du cycle pour des cellules non traitées (gauche) et traitées (droite) par le nocodazole et différents temps après le retrait du nocodazole. N=2.

Ces résultats peu encourageants ne nous permettent pas d'utiliser une telle méthode pour synchroniser les cellules MCF-7 afin de vérifier si l'arrêt du cycle induit par le composé SV37 intervenait uniquement en phase G₀/G₁.

4. Analyse de la mort cellulaire dans la lignée MDA-MB-231

Nous avons poursuivi notre étude en mettant l'accent sur l'analyse de l'effet cytotoxique du composé SV37 sur la lignée MDA-MB-231 dans le but d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de ce traitement. Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence ou l'absence de marqueurs de l'apoptose. Par une analyse du contenu protéique cellulaire par la technique du *western blotting*, nous avons vérifié la présence des marqueurs pour différents temps de traitements à la CI₅₀ dans les cellules MDA-MB-231.

Nous avons observé un clivage des procaspase 3 et 7 (Fig. 77) qui intervient dès 16h de traitement et indique l'activation de la cascade apoptotique. Ces caspases effectrices sont la cible des caspases initiateuses de l'apoptose. Elles sont activées après le relargage de cytochrome c de la mitochondrie et l'activation des caspases initiateuses dans le cas d'une apoptose intrinsèque, ou suite à l'activation de la voie extrinsèque par des signaux externes (Fig. 78). L'apparition de ce clivage coïncide avec les observations réalisées en vidéo-microscopie, indiquant des changements morphologiques conduisant à la destruction de la cellule.

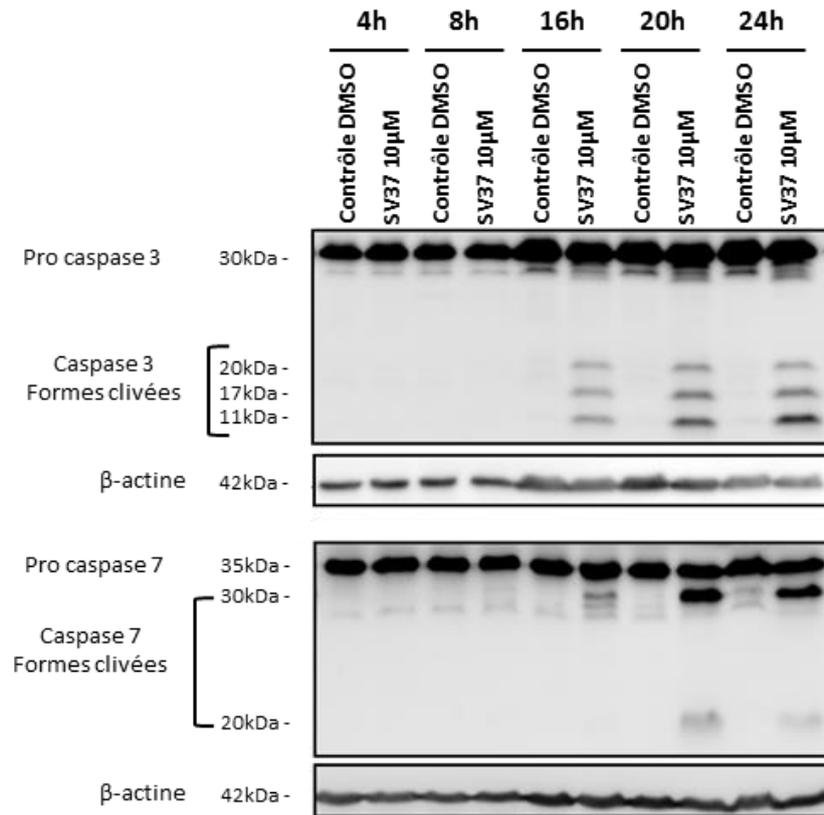


Fig. 77. Etude du clivage des caspases 3 et 7 par Western blotting après traitement des cellules MDA-MB-231 avec une concentration de 10 μM de composé SV37 pour différents temps. La procaspase 3 présente une masse de 30kDa et ses formes clivées présentent une masse de 11, 17 et 20kDa. La procaspase 7 présente une masse de 35 kDa et ses deux formes clivées présentent une masse de 20 et 30 kDa. La β-actine est utilisée comme témoin de chargement, elle présente une masse de 42 kDa.

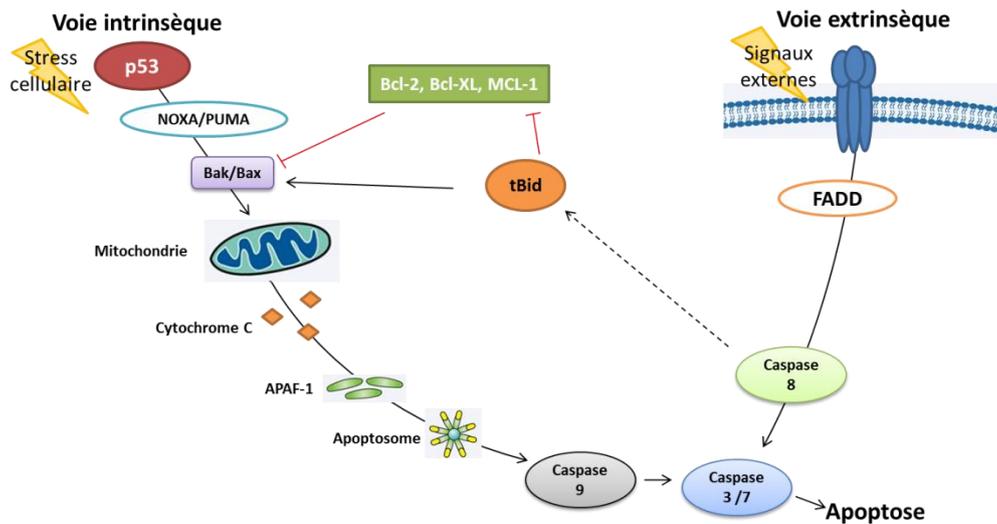


Fig. 78. Voies apoptotique intrinsèque et extrinsèque.

Le composé SV37 est donc capable d'induire la voie apoptotique dès 16h de traitement à la CI_{50} . Les mécanismes liés au déclenchement de cette apoptose ont été étudiés, dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la génération d'espèces réactives de l'oxygène, puis nous avons étudiés les dommages à l'ADN, et enfin nous avons analysé le statut pCDK des cellules.

5. Evaluation de la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène : ERO

Compte tenu de la nature quinonoïque du composé SV37, nous nous sommes intéressés à sa capacité de générer des ERO par un cycle redox (cf. contexte scientifique, inhibiteurs de CDC25, Inhibiteurs à structures quinonoïques). La présence d'ERO pourrait être lié à la mort cellulaire observée dans la lignée MDA-MB-231, ou responsable de l'inhibition des CDC25, comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Contour-Galcera *et al.* 2007 ; Beillerot *et al.* 2012).

Nous avons donc étudié la génération éventuelle d'ERO dans les cellules MDA-MB-231 mais aussi MCF-7, juste après la mise en contact avec le composé. La détection a été réalisée grâce à la sonde H_2DCFDA (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) capable de détecter les espèces réactives oxygénées et nitrées en cytométrie de flux (Fig. 79). Nous observons une induction significative d'ERO dès 5 minutes de traitement dans les deux lignées (Fig. 80), et maximale 10 à 20 minutes après le début du traitement. Ces résultats suggèrent une induction d'ERO transitoire courte.

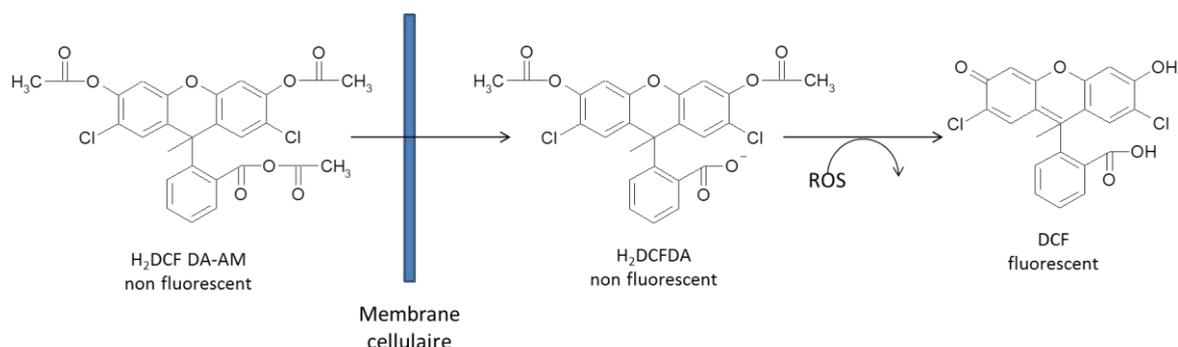


Fig. 79. Détection des espèces réactives de l'oxygène par la sonde H_2DCFDA .

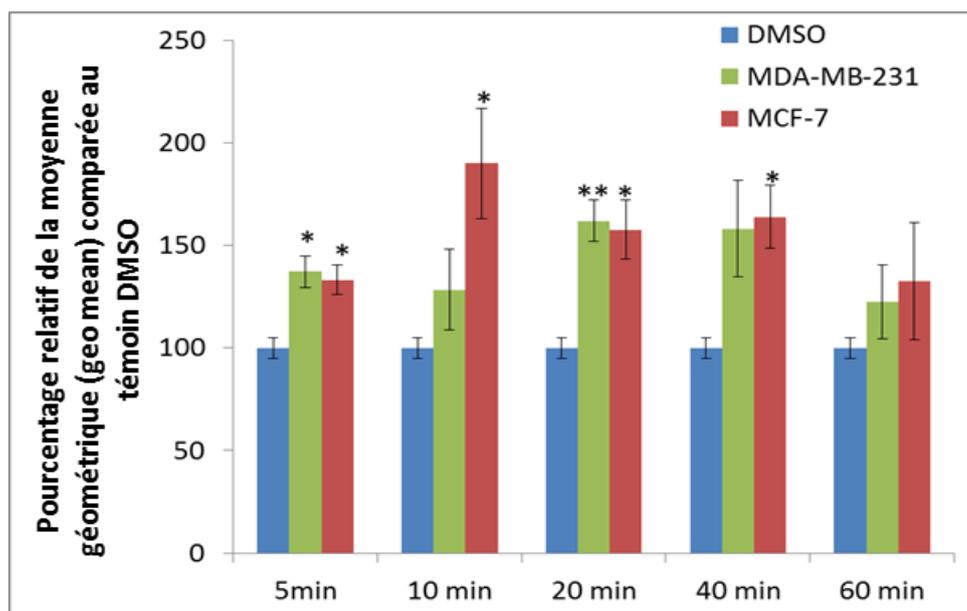


Fig. 80. Détection des ERO dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7, non traitées (DMSO) et traitées par le composé SV37 à une concentration 10 µM. La mesure du signal de fluorescence de la sonde H₂DCFDA permet d'estimer le taux d'ERO présentes en comparaison avec le témoin. N=3.

En parallèle de ces essais sur les ERO, nous avons voulu vérifier si une partie du signal observé à l'aide de la sonde H₂DCFDA résultait d'espèces réactives nitrées (ERN). Ces espèces nitrées sont détectables par la sonde DAF2DA en cytométrie de flux. Les résultats obtenus (Fig. 81) montrent un signal d'ERN comparable au témoin dans la lignée MDA-MB-231. Nous pouvons en déduire que les espèces réactives nitrées constituent une part négligeable ou nulle du signal.

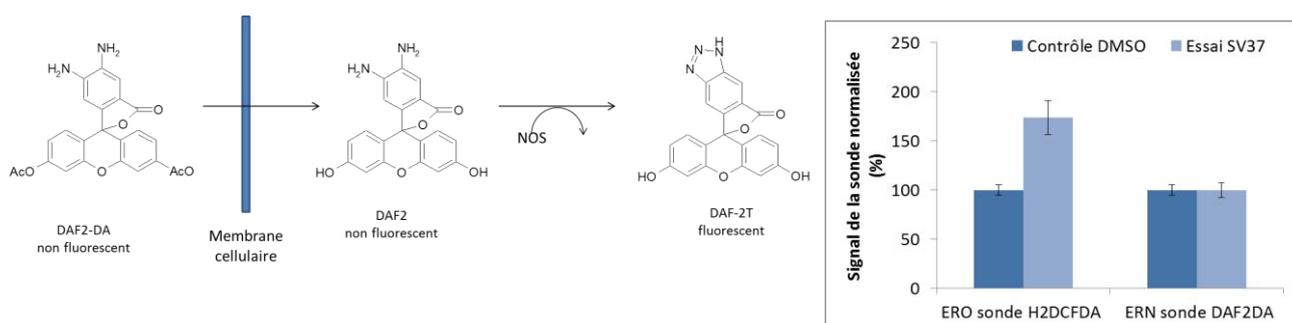


Fig. 81. Réaction de la sonde DAF₂DA avec les espèces réactives nitrées (gauche). Détection des espèces réactives oxygénées (sonde H₂DCFDA) et nitrées (sonde DAF₂DA) dans les cellules MDA-MB-231 non traitées et traitées par le composé SV37 à une concentration 10 µM pendant 15 minutes (droite). La mesure du signal de fluorescence de la sonde H₂DCFDA permet d'estimer le taux d'espèces réactives oxygénées et nitrées, tandis que la sonde DAF₂DA permet d'estimer le taux d'espèces réactives nitrées. N=3.

Afin de détecter la présence d'anions superoxydes potentiellement induits par le composé (non détectables par la sonde H₂DCFDA), nous avons employé la sonde *Redox Sensor Red*. Lors de

ces essais, nous avons associé le traitement SV37 à un prétraitement avec la N-Acétyl-Cystéine (NAC). Ce composé constitue un important donneur de groupement thiols, susceptibles de réagir avec les ERO et les neutraliser. Il est de plus capable d'augmenter la concentration de GSH intracellulaire. Les résultats indiquent un très fort signal d'ERO généré par le traitement SV37 à une concentration de 10 μ M pendant 15 minutes (Fig. 82). Proportionnellement, ce signal est trois fois plus important que celui détecté avec la sonde H₂DCFDA ce qui suggère une quantité importante d'anions superoxydes dans les ERO détectés. Par ailleurs, le prétraitement par la NAC inhibe la totalité des ERO émis indiquant une forte réaction des thiols libres avec les ERO émis par le composé.

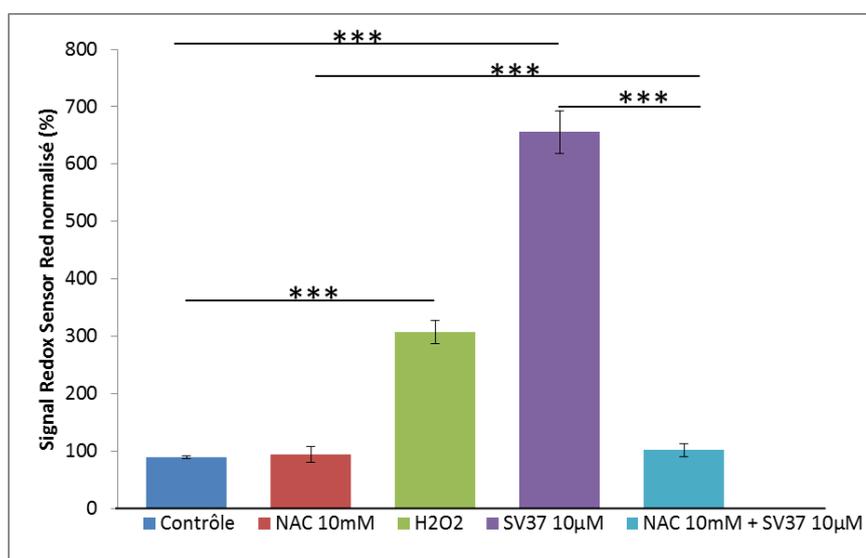


Fig. 82. Détection des ERO par la sonde Redox Sensor Red dans la lignée MDA-MB-231. Les cellules ont été traitées par le composé SV37 à la concentration de 10 μ M ou par le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 500 μ M, en présence ou en absence d'un prétraitement de 4 heures par la NAC à 10mM. N=3.

Nous avons vérifié les effets du traitement SV37 avec ou sans prétraitement par la NAC sur la croissance des cellules MDA-MB-231 par vidéo-microscopie. Nous observons que les cellules prétraitées avec la NAC puis traitées par le composé SV37 présentent une croissance restaurée en comparaison avec les cellules traitées seulement par SV37, dont la croissance était nulle (Fig. 83). Cette restauration suggère que les ROS induits par le composé SV37 sont directement à l'origine de l'arrêt de croissance des cellules.

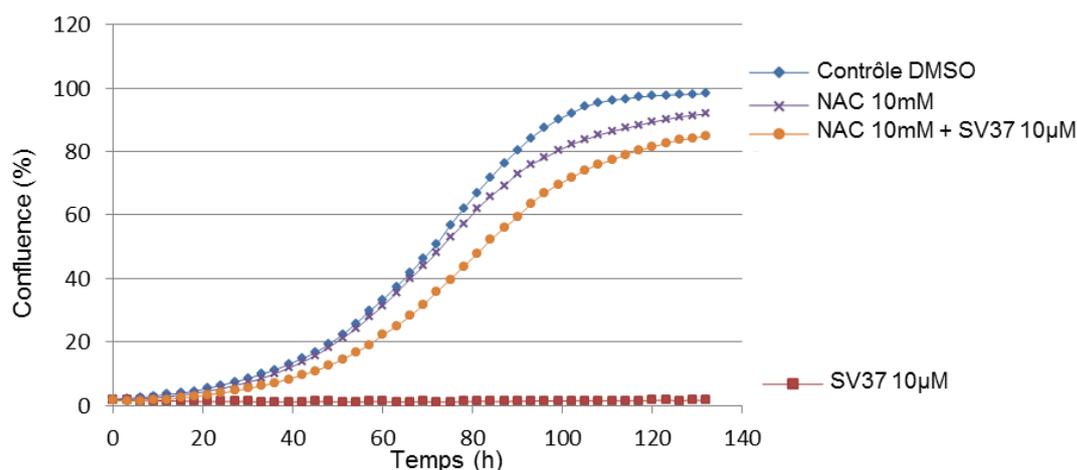


Fig. 83. Croissance des cellules MDA-MB-231 prétraitées par la NAC. Les cellules ont été prétraitées 4h par la NAC à 10mM, puis le traitement SV37 à une concentration de 10 µM a été appliqué. La confluence a été déterminée par le système de vidéo-microscopie Incucyte.

Nous avons donc démontré que le composé SV37 est capable d'induire des ERO dès sa mise en contact avec les cellules MDA-MB-231. Cette génération d'ERO peut être contrée par un prétraitement avec la NAC qui permet aussi la restauration de la croissance cellulaire. Le mécanisme d'inhibition des cellules MDA-MB-231 semble donc être lié à la génération d'ERO, et par extension, au cycle redox des quinones.

6. Etude des dommages à l'ADN

Dans le but d'approfondir la compréhension du mécanisme lié à la mort des cellules MDA-MB-231, nous avons étudié les marqueurs de la fragmentation de l'ADN : le clivage de la Poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la phosphorylation des histones H2A. La PARP, enzyme de réparation de l'ADN, est l'une des premières cibles des caspases 3 et 7, ces dernières étant capables d'y reconnaître un site de clivage particulier. L'histone H2AX est quant à elle phosphorylée par les kinases de la famille ATR/ATM en réponse à des dommages de l'ADN. Ces dommages interviennent suite à la libération des protéines AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) lors de la rupture de la membrane mitochondriale dans le processus apoptotique intrinsèque ou suite à l'activation des ADNases CAD (*Caspase Activated DNases*) par les caspases. Ces protéines sont responsables de la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine, elles interviennent en fin de processus apoptotique (Fig. 84).

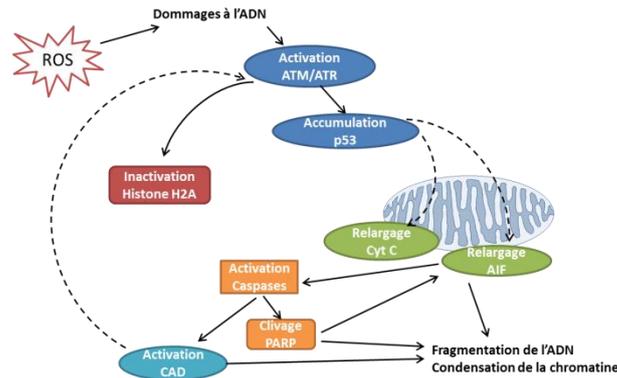


Fig. 84. Implication des ROS dans la phosphorylation de l'histone H2A et le clivage de la PARP lié aux dommages à l'ADN.

Nous observons un clivage de la PARP (Fig. 85) et une phosphorylation des histones H2A.X dès 16h, ce qui indique des dommages à l'ADN. Ces observations sont concomitantes avec le clivage des caspases, ce qui suggère que les dommages de l'ADN résultent de la cascade apoptotique induite par le composé SV37 dans la lignée MDA-MB-231.

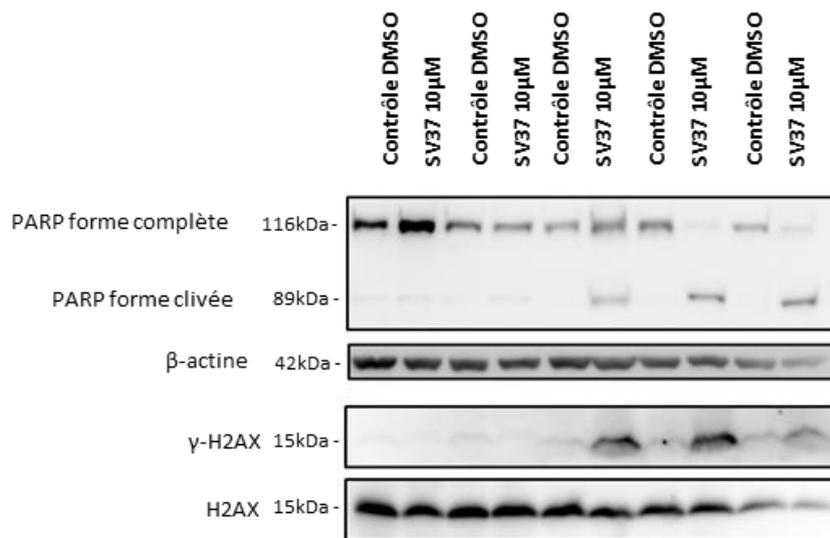


Fig. 85. Etude du clivage de la PARP et de la phosphorylation de l'histone H2A.X par western blotting après traitement des cellules MDA-MB-231 avec une concentration de 10 µM de composé SV37 pour différents temps.

La PARP entière présente une masse de 116 kDa et sa forme clivée 89 kDa, la forme phosphorylée de l'histone H2A.X (γ) présente une masse de 15 kDa. La β-actine est utilisée comme témoin de chargement pour la PARP, elle présente une masse de 42 kDa, l'histone H2A.X est utilisée comme témoin pour sa forme phosphorylée γH2AX, elle présente la même masse que cette dernière.

Le clivage de PARP et la phosphorylation de l'histone H2A.X sont observés au même moment que le clivage des caspases 3 et 7, indiquant que des dommages à l'ADN interviennent à la suite de la cascade apoptotique. L'émission d'ERO, intervenant dans la première heure de traitement,

ne semble donc pas directement responsable des dommages à l'ADN compte tenu du temps de déroulement des évènements, on ne peut toutefois pas exclure complètement cette possibilité

7. Evaluation du statut CDK/pCDK dans les lignées MDA-MB-231

Afin d'évaluer l'impact du traitement sur les phosphatases CDC25 intracellulaires, nous avons évalué l'état de phosphorylation des CDK dans les cellules MDA-MB-231 après traitement, grâce à la technique du *western blotting*. L'état de phosphorylation des CDK découle directement de l'activité des phosphatases CDC25. Cette méthode constitue donc un moyen indirect mais très utile pour déterminer leur inhibition.

Nous observons une augmentation de la phosphorylation des CDK1 et CDK2 après 4h et 8h traitement (Fig. 86), ce qui suggère une inhibition des phosphatases CDC25 dans les cellules par le composé SV37.

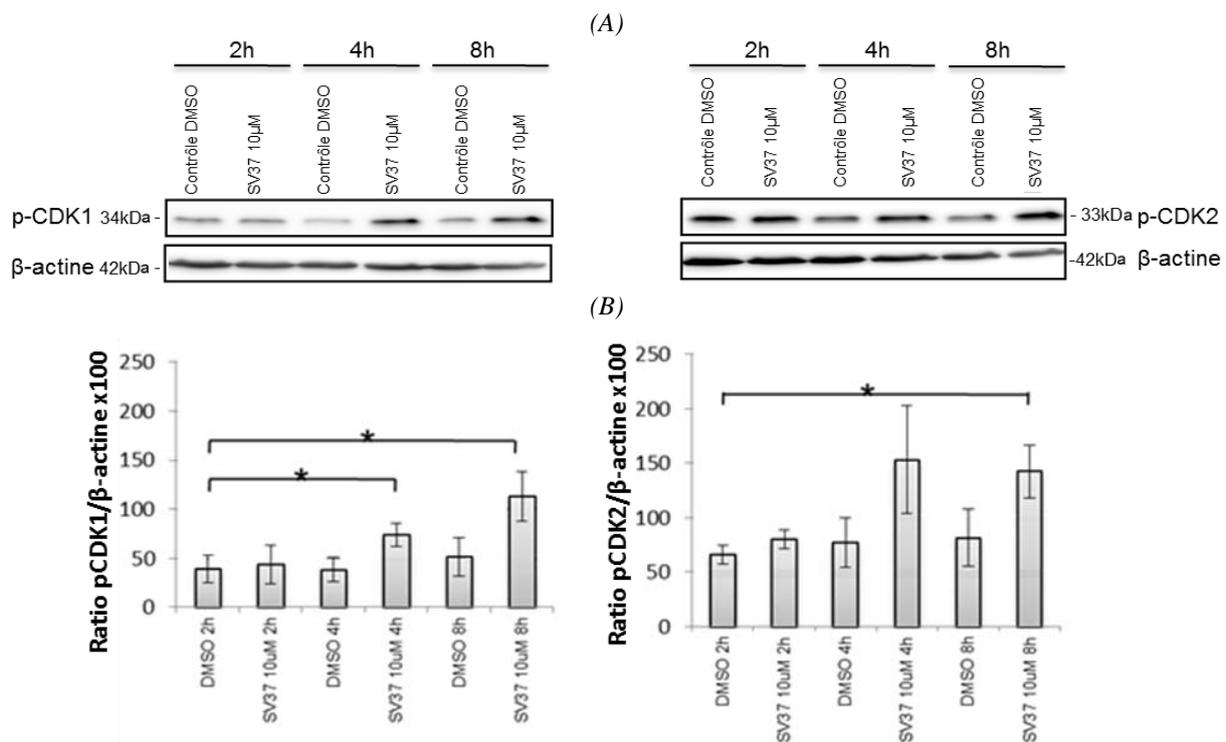


Fig. 86. Etude de la phosphorylation des CDK1 et CDK2 après traitement des cellules MDA-MB-231 avec une concentration de 10 μ M de composé SV37 pendant différents temps. (A) Western blotting : les pCDK présentent une masse de 33 kDa. La β -actine est utilisée comme témoin de chargement, elle présente une masse de 42 kDa. (B) Ratios pCDK1/ β -actine et pCDK2/ β -actine des westerns blotting présentés ci-avant. Les ratios obtenus pour les cellules traitées sont normalisés par rapport à leurs témoins respectifs non traité. N=3.

Dans le but de vérifier l'existence d'un lien entre la génération d'ERO et l'inhibition des CDC25 dans la cellule, nous avons analysé la phosphorylation des CDK1 et 2 dans des cellules prétraitées pendant 4h avec la NAC à 10mM, puis traitées par SV37 15min à une concentration de 10 μ M. Les résultats montrent qu'un prétraitement par la NAC empêche l'accumulation des formes phosphorylées des CDK dans la cellule (Fig. 87). Ce résultat nous permet de supposer un lien direct entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène, et l'inhibition des CDC25.

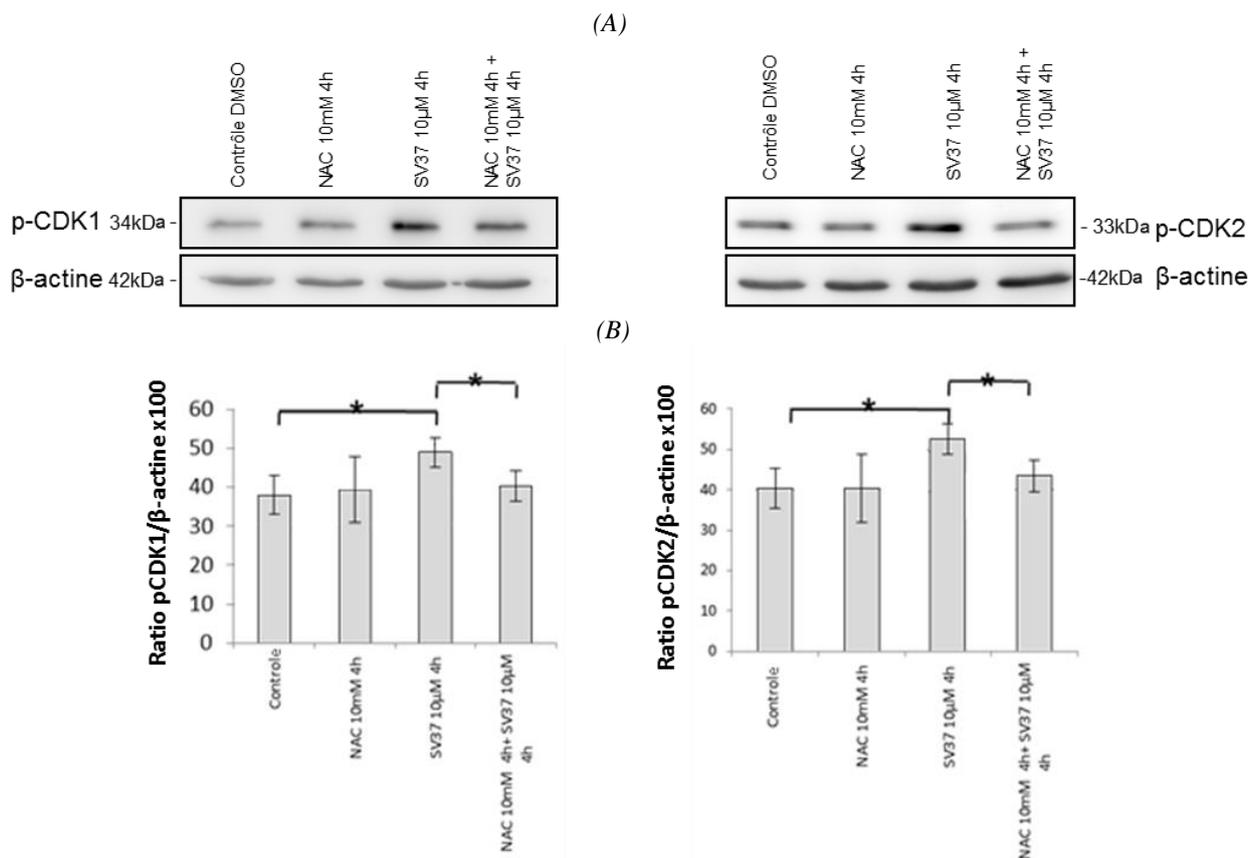


Fig. 87. Etude de la phosphorylation des CDK1 et CDK2 prétraitées par la NAC, puis traitées avec une concentration de 10 μ M de composé SV37 pendant 4h. Les p-CDK présentent une masse de 33 kDa. (A) Western blotting : les pCDK présentent une masse de 33 kDa. La β -actine est utilisée comme témoin de chargement, elle présente une masse de 42 kDa. (B) Ratios pCDK1/ β -actine et pCDK2/ β -actine des westerns blotting présentés ci-avant. Les ratios obtenus pour les cellules traitées sont normalisés par rapport à leurs témoins respectifs non traités. N=3.

8. Conclusion sur les effets intracellulaires

L'ensemble des évènements qui interviennent dans les cellules MDA-MB-231 après le traitement par le composé SV37 est résumé dans la figure ci-après (Fig. 88).

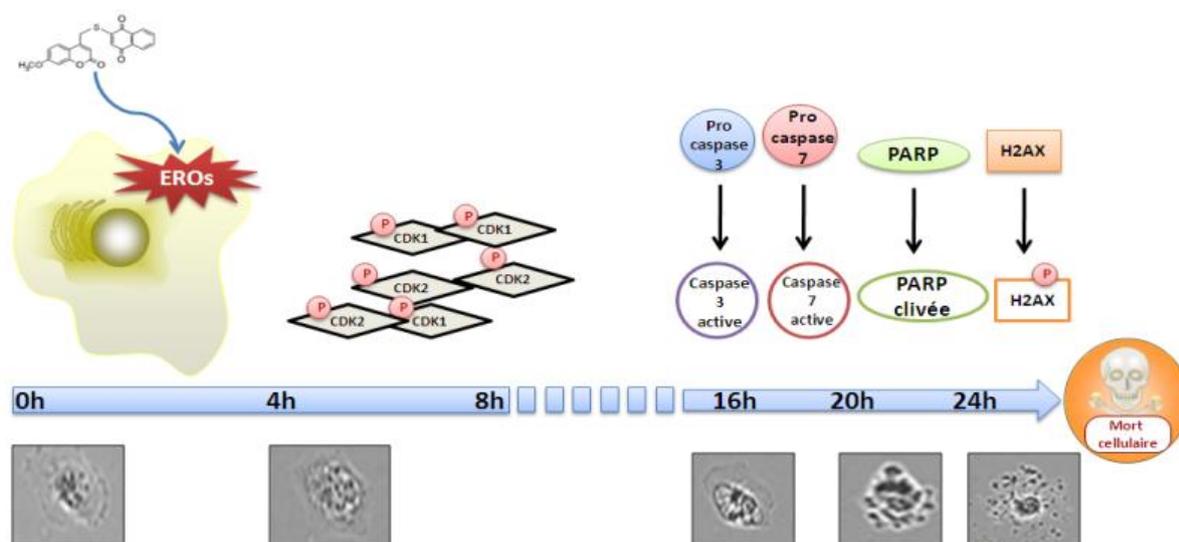


Fig. 88. Ligne des évènements intervenant après traitement des cellules MDA-MB-231 par une concentration de 10 µM de composé SV37

L'ensemble des résultats de cette partie nous permet de proposer un mode d'action du composé SV37 dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 89). L'accumulation des pCDK intervient 4h après l'émission d'espèces réactives de l'oxygène, nous pouvons émettre l'hypothèse que les phosphatases CDC25 ont été inhibées par les EROs et/ou directement par le composé comme c'est le cas *in vitro*. Cette inhibition des phosphatases CDC25 empêche la déphosphorylation de leur substrat CDK. Cette déphosphorylation étant nécessaire pour le passage entre les différentes phases du cycle cellulaire, nous devrions observer un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, il n'est pas possible de constater un arrêt de cycle dans la mesure où la mort cellulaire est induite dès 16h de traitement, un temps trop court pour que les cellules s'accumulent dans une ou l'autre phase du cycle. Nous pouvons supposer que l'inhibition des CDC25 et l'accumulation des pCDK dans la cellule conduit à l'apoptose. Néanmoins, les analyses réalisées n'en donnent pas la preuve formelle, les relations de cause à effet entre ces deux évènements étant difficiles à établir.

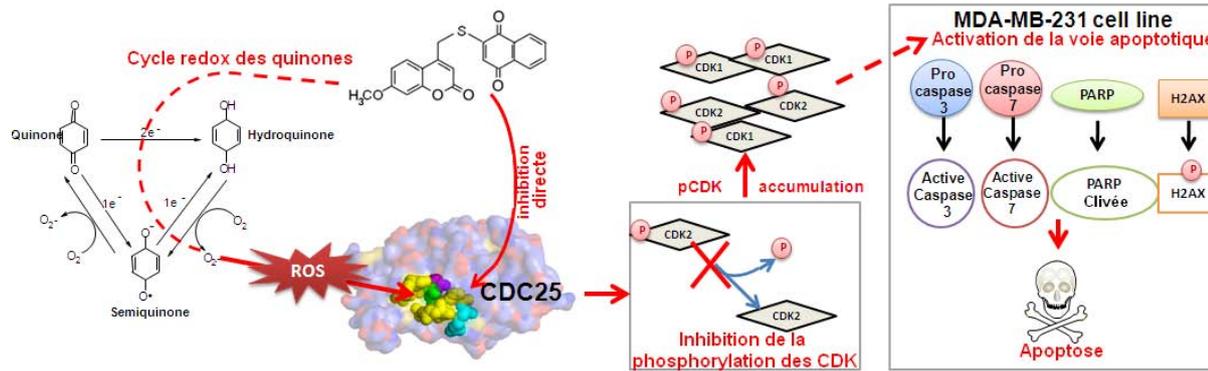


Fig. 89. Représentation du mode d'action hypothétique du composé SV37 sur les cellules MDA-MB-231

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre du développement récent de nouvelles thérapies, les phosphatases CDC25 sont apparues comme des cibles thérapeutiques potentielles. Elles constituent des éléments clés du cycle cellulaire, sont souvent surexprimées dans les cancers et leur surexpression est liée à un mauvais pronostic du cancer associé. Dans un contexte de recherche d'inhibiteurs innovants, nous avons étudié plusieurs classes de composés et leur mécanisme d'action sur les phosphatases CDC25. Nous nous sommes aussi intéressés à leur mécanisme d'action cellulaire dans deux lignées d'adénocarcinome mammaire humain.

Dans un premier temps, nous avons donc exprimé des protéines recombinantes CDC25 afin d'obtenir un stock protéique suffisant pour réaliser l'étude du mode d'action des composés *in vitro*. Les trois isoformes complètes des CDC25 ont été exprimés et purifiés, ainsi qu'une forme partielle de l'isoforme B qui contient uniquement son site actif. L'étude de l'inhibition sur une forme tronquée et non tronquée de CDC25 permet d'apporter des précisions supplémentaires concernant le mode d'action de l'inhibiteur. Un criblage a ensuite été réalisé sur 6 séries d'inhibiteurs différentes qui comprennent des dérivés stéroïdiens, thiophéniques, coumariniques et quinonoïques.

Parmi ces six classes de composés trois ont plus particulièrement retenu notre attention. Les dérivés coumariniques SV 1 à 20 se sont révélés être inhibiteurs des CDC25, bien que leur action inhibitrice ne soit pas aussi importante que les inhibiteurs les plus puissants de la littérature (CI₅₀ de 20 µM pour le meilleur composé de cette série). Par contre, ce sont des structures intéressantes pour le développement de nouveaux inhibiteurs. En effet, c'est la première fois que des coumarines sont reportées en tant qu'inhibiteurs de CDC25, de plus cette classe de molécules est peu toxique pour l'homme qui en ingère plusieurs centaines de milligrammes dans son alimentation quotidienne (régime occidental).

Nous avons aussi montré qu'une série de dicoumarines polysoufrés (SV 25, 28 et 29) présente des capacités intéressantes d'inhibition des phosphatases CDC25 avec une inhibition dépendante du nombre d'atome de soufre présents. Ces résultats corroborent une précédente étude du laboratoire qui met en évidence l'importance du nombre d'atome de soufre dans la capacité d'inhibition des CDC25 par des dérivés diallyls et dipropyl sulfures (Viry *et al.* 2011).

Enfin, une dernière série de composés quinone-coumarines (série SV37 et composés XU) a été testée et nous a permis d'obtenir une inhibition puissante des CDC25 (CI_{50} égale à 0,1 μM pour le plus puissant). Au cours de l'étude des structures des composés de cette série, nous avons montré que la présence d'un groupement supplémentaire sur la partie quinone du composé affectait ses capacités inhibitrices. En revanche, l'addition de groupement sur la partie coumarine améliore sensiblement les capacités inhibitrices du composé. Ces observations soulignent l'importance de la comparaison des résultats d'inhibition avec les structures des composés afin de créer, à l'avenir, des structures encore plus adaptées à l'inhibition des CDC25. Pour cela, une étude *in silico* est nécessaire. Une équipe italienne de l'Université de Rome (Pr Rino Ragno, Sapienza - *Università degli Studi di Roma*) souhaite collaborer avec notre laboratoire pour mettre en place un test de criblage. Dans cette optique, la transmission des résultats déjà obtenus sur nos inhibiteurs permettra de constituer une base solide pour le criblage.

Une étude plus poussée du composé SV37, membre de la série des coumarine-quinone, a révélé une fixation réversible sur les CDC25 A et C avec un mode d'inhibition mixte. De plus, les expériences menées sur les formes partielles et complètes de la phosphatase CDC25B, ainsi que l'analyse du mode d'inhibition suggèrent une fixation de l'inhibiteur sur un site allostérique, différent du site de liaison du substrat mais qui participe à sa liaison et/ou à sa catalyse. Ces observations soulignent la fixation particulière de cet inhibiteur, une étude *in silico* des interactions possibles entre ce composé et les phosphatases CDC25 apportera plus d'informations complémentaires concernant la façon dont ce composé inhibe les phosphatases.

Nous avons montré que le composé SV37, sélectionné pour étudier ses effets au niveau cellulaire, est capable d'inhiber la croissance de plusieurs lignées cancéreuses sensibles et résistantes aux agents chimiothérapeutiques (MCF-7, MDA-MB-231, VCR-Res et HepG2). La résistance de la lignée non cancéreuse hTERT-HME1 vis-à-vis du composé SV37, en comparaison avec les lignées de carcinome mammaire, suggère une bonne tolérance des cellules non cancéreuses vis-à-vis de ce composé. De plus, la sensibilité de la lignée VCR-Res est comparable à celles des lignées de carcinome mammaire, ce qui suggère que cette lignée multi-résistante à plusieurs agents anticancéreux est sensible à l'inhibition par ce type de composés.

En s'intéressant à l'inhibition dans les lignées de carcinome mammaire, nous avons observé que le composé semblait agir selon deux modes d'action distincts dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Le composé induit respectivement un effet cytotatique et un effet cytotoxique pour une concentration proche de la CI_{50} des deux lignées (10 μ M).

L'observation d'un potentiel cytotatique dans la lignée MCF-7 a pu être reliée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G_0/G_1 . Ceci suggère une inhibition des CDC25 dans la cellule. Une étude du cycle cellulaire après synchronisation des cellules nous aurait permis de dégager des informations plus précises sur l'arrêt du cycle observé, qui devrait intervenir dans chacune des phases si chacune des isoformes de CDC25 est inhibée. N'ayant pas réussi à mettre au point une méthode de synchronisation cellulaire efficace avec le nocodazole dans la mesure où les cellules se désynchronisaient lors de leur passage en phase G_0/G_1 , d'autres méthodes doivent être envisagées. Pour contourner le passage immédiat des cellules en phase G_1 , il est possible de travailler avec un agent de synchronisation qui bloque les cellules en fin de phase G_1 , et d'utiliser la technique « *block and release* » qui consiste en la synchronisation des cellules avec un agent chimique dans la phase qui précède celle d'intérêt, puis attendre que les cellules atteignent la phase du cycle à étudier. A cet effet, l'utilisation de thymidine peut être envisagée pour bloquer la synthèse des nucléotides et arrêter les cellules en fin de phase G_1 ou en début de phase S.

La cytotoxicité du composé SV37 dans les cellules MDA-MB-231 résulte du déclenchement de la cascade apoptotique. La différence de cytotoxicité qui existe entre les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 peut en partie s'expliquer par la déficience en caspase 3 de la lignée MCF-7, toutefois cette déficience n'explique pas à elle seule une telle différence. Le statut ER/PR/PGR différentiel de ces deux lignées peut influencer la résistance au composé SV37.

Les observations réalisées nous indiquent que le déclenchement de l'apoptose dans la lignée MDA-MB-231 intervient après l'accumulation des complexes phospho-CDK 1 et 2, cette accumulation intervient elle-même après l'émission d'un stress oxydant par le composé, quelques minutes après l'induction du traitement. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse d'un mode d'action du composé. De par sa nature quinonoïque, le composé SV37 est capable de réaliser le cycle redox des quinones et de libérer des ERO, ces dernières sont susceptibles de réagir avec la cystéine du site catalytique des CDC25, et d'inhiber ainsi son activité. Par ailleurs, l'atome de soufre situé entre la partie coumarine et la partie quinone peut

éventuellement se trouver libéré suite à une dégradation du composé dans la cellule. Ce groupement SH peut lui aussi aisément réagir avec la cystéine catalytique de CDC25. Le composé est aussi capable d'inhiber directement les CDC25 comme nous l'avons vu *in vitro*.

L'observation de l'accumulation des phospho-CDK constitue une mesure indirecte de l'inhibition des CDC25, la mise au point d'une technique d'immunoprécipitation des CDC25 intracellulaires pourrait permettre d'évaluer leur inhibition éventuelle dans la cellule et de détecter la fixation éventuelle d'un composé sur ces phosphatases. De plus, l'utilisation d'un traceur est envisageable pour permettre une analyse du devenir du composé SV37 dans la cellule.

Afin de comprendre les différences d'effets obtenus dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 il serait intéressant d'étudier les effets de ce type de composé quinone-coumarine sur un panel de lignées cellulaires primaires issues de biopsies qui comprendraient un couple de cellules tumorales et non tumorales. Ce type d'étude permettra de valider le potentiel de ces composés sur les cellules tumorales mais aussi d'observer leurs effets sur des cellules non tumorales. L'efficacité des inhibiteurs pourra être corrélée à divers paramètres concernant les prélèvements d'origine, ex. type de cancer et expression des variants d'épissage CDC25. Ceci permettra aussi de faire le lien avec une éventuelle résistance/sensibilité à ces composés, permettant ainsi d'obtenir des données complémentaires applicables pour une médecine personnalisée.

Par ailleurs, une application *in vivo* sur des souris xénotreffées avec des cellules de carcinome mammaire permettrait d'évaluer l'efficacité de ce type d'inhibiteur sur la croissance tumorale. Enfin, il est aussi envisageable de réaliser une étude de l'association de ces inhibiteurs de CDC25 avec des agents chimiothérapeutiques conventionnels, cette étude permettrait d'évaluer la capacité de potentialisation de certains de ces agents chimiothérapeutiques sur des cellules résistantes aux traitements conventionnels.

Nous avons été les premiers à montrer les avantages de l'association des structures coumarines et quinones *in vitro*. Bien que l'étude biologique ait été menée sur une seule de ces structures, elle souligne leur intérêt dans l'inhibition des cellules cancéreuses. Ces résultats devront être confirmés par une étude biologique des autres structures de cette série.

MATERIEL ET METHODES

I. Etude *in vitro* sur les protéines recombinantes

1. Expression et purification des protéines recombinantes GST-CDC25

Les protéines de fusion GST-CDC25 A, B, C (formes complètes) et B_p partielle (site actif seulement), sont obtenues après transformation d'une souche bactérienne de type *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS de phénotype [*E. coli* B F⁻dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]]. Cette souche est aisément transformable par choc thermique et permet l'obtention d'un rendement protéique optimal. Ces bactéries sont cultivées en milieu *Lysogeny broth* – Miller (LB) [10 g.L⁻¹ Bacto-tryptone, 5 g.L⁻¹ extrait de levure, 10 g.L⁻¹ NaCl, pH 7].

Vecteur plasmidique

Les vecteurs employés sont des plasmides de type pGEX 2T (Fig. 90, GE Healthcare Lifescience) dans lesquels ont été insérées les séquences qui codent les formes complètes des CDC25 A, B et C ainsi que pour une forme partielle de CDC25 B qui code uniquement son site catalytique. Le plasmide pGEX 2T porte la séquence codante pour la glutathion S-transferase (GST) en amont de sa cassette de clonage dans laquelle ont été insérées les séquences codantes des CDC25. Un promoteur Ptac est présent en amont de la séquence qui code la protéine de fusion et permet ainsi son expression, qui est réprimée par un répresseur codé par le gène Lac Iq. La répression est levée en présence d'IPTG (Isopropyl-1-thio-β-Dgalactopyranoside) qui forme un complexe avec le répresseur. Par ailleurs, ce plasmide est porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline qui permet une sélection des clones bactériens qui ont incorporé le plasmide lors de la transformation.

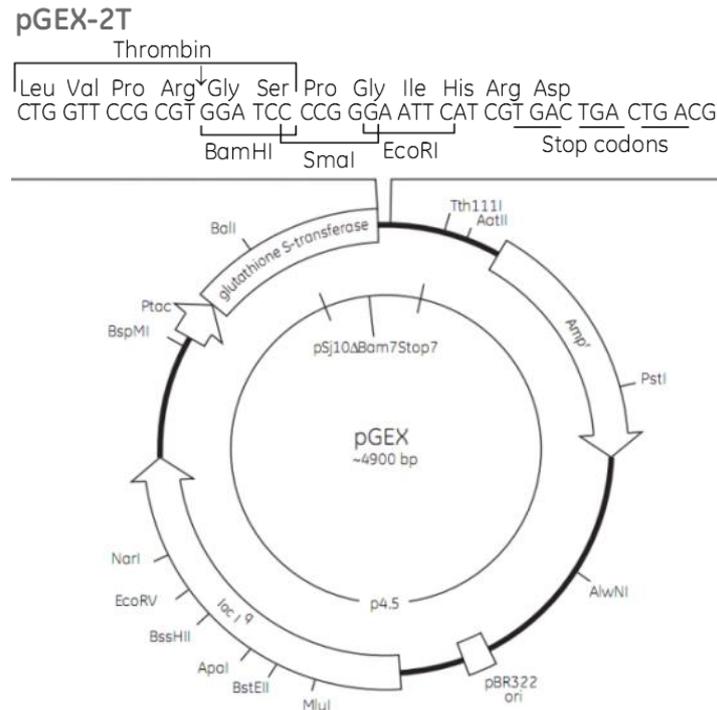


Fig. 90. Carte du plasmide pGEX 2T.

Préparation des cellules compétentes et transformation bactérienne

Après ensemencement d'un milieu LB avec le clone BL21(DE3)pLysS jusqu'à obtention d'une densité optique de 0,5 unités à 600 nm, les cellules sont rendues compétentes par mise en contact avec du chlorure de calcium (CaCl_2). Les ions calcium chargés positivement, permettent le rapprochement des brins d'ADN et des lipopolysaccharides de la paroi bactérienne, tous deux chargés négativement. Ce rapprochement permet une incorporation des fragments d'ADN lors d'un choc thermique court où les cellules sont transférées de 4°C à 42°C pendant 90 secondes puis replongées à 4°C . Ce choc thermique déstabilise la paroi bactérienne, permet l'ouverture de pores et l'entrée du plasmide à l'intérieur de la cellule bactérienne. Les cellules ainsi obtenues sont incubées une nuit à 37°C dans du milieu SOC [20 g.L^{-1} Bacto Tryptone, 5 g.L^{-1} extrait de levure, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ NaCl, $2,5 \text{ mM}$ KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose, pH 7], elles sont ensuite sélectionnées après étalement sur des boîtes de gélose LB qui contiennent de l'ampicilline à une concentration de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Production et extraction des protéines GST-CDC25

Après sélection du meilleur clone, les bactéries sont cultivées une nuit à 37°C sous agitation dans un petit volume (5 mL) de milieu LB qui contient de l'ampicilline à 50 µg.mL⁻¹.

Cette pré-culture est ensuiteensemencée dans un grand volume de LB (2L) et incubée à 37°C sous agitation jusqu'à obtention une densité optique de 0,5 unités à 600 nM. L'ajout d'IPTG à une concentration finale de 120 mg.L⁻¹ permet l'induction de la production des protéines de fusion GST-CDC25 lors d'une incubation de 4h à 30°C sous agitation. La culture est finalement centrifugée à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis le surnageant est éliminé et les culots sont stockés à -80°C jusqu'à extraction. Les culots sont re-suspendus dans du tampon de lyse froid [50 mM Tris, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton, 0,01% cocktail inhibiteur de protéases, 0,3 M PMSF], puis lysés par 5 cycles de refroidissement/sonication sur glace à raison de trois séries de 30 secondes (sonicateur Vibra-cell, Bioblock, puissance 50). Le lysat est centrifugé 15 minutes à 15000 g à 4°C, puis le surnageant est récupéré et stocké à 4°C jusqu'à purification.

Purification des protéines GST-CDC25

Les protéines de fusion contenues dans le lysat bactérien sont extraites sur une colonne qui contient des billes d'agarose couplées à un résidu glutathion (GSH), substrat de la GST. Dans un premier temps, la colonne est saturée de NaCl 1 M, puis équilibrée avec le tampon de lyse. Le lysat est ensuite incubé avec les billes GSH-Agarose (Sigma) une nuit sous agitation lente à 4°C afin de permettre la fixation des protéines de fusion CDC25-GST au GSH. La colonne est ensuite lavée avec du tampon de lyse jusqu'à élimination complète des protéines non fixées, puis la colonne est équilibrée avec du tampon Tris A [50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8,2]. L'élution se fait par dépôt sur la colonne de 20 mM d'une solution de GSH libre contenu dans du tampon Tris A. Les protéines de fusion GST-CDC25 vont se décrocher des billes d'agarose qui portent le résidu GSH, pour aller se fixer au GSH libre par un phénomène de compétitivité. Les protéines de fusion sont ainsi éluées et récupérées en différentes fractions. L'activité de chacune des fractions est évaluée, ainsi que leur pureté et leur concentration protéique. La meilleure fraction est ensuite aliquotée en petits volumes puis stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Mesure de l'activité phosphatase *in vitro*

La fonction des phosphatases CDC25 est de déphosphoryler leurs substrats phosphorylés. Cette activité est quantifiable *in vitro* par fluorimétrie et peut être modulée en présence de molécules inhibitrices ou activatrices. Les mesures fluorimétriques sont réalisées en présence d'un substrat synthétique non fluorescent, le 3-OMF-P (3-O-méthylfluoresceinphosphate) dont la déphosphorylation conduit à l'émission d'un composé fluorescent le 3-OMF (3-O-méthylfluorescein) qui peut-être excité à 480 nm pour renvoyer une longueur d'onde d'émission fluorescente à 520 nm. La vitesse de déphosphorylation du 3-OMF-P par une phosphatase est proportionnelle à son activité, il est ainsi possible de mesurer l'activité *in vitro* des CDC25 sur ce substrat et la comparer à l'activité de l'enzyme en présence de composés potentiellement inhibiteurs. En effet, en présence d'un inhibiteur, la vitesse de déphosphorylation du 3-OMF-P sera diminuée et donc la production du 3-OMF sera moindre et engendrera moins de fluorescence.

Ces réactions sont réalisées en plaques 96 puits, à 30°C dans un tampon optimal pour l'activité des CDC25 *in vitro* [Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, SAB 0,1%, pH 8,1] et dans un volume final de 100µL. Une quantité fixe de protéines recombinantes est disposée dans chaque puits (généralement 1 µg) et éventuellement mise en contact avec une molécule modulatrice pendant 20 minutes à 30°C. La réaction est démarrée après addition du 3-OMFP à une concentration finale de 500 mM. L'émission de fluorescence qui résulte de la transformation du 3-OMFP en 3-OMF par les phosphatases CDC25 est mesurée toutes les 20 minutes pendant 2 heures à 30°C *via* un système CytoFluor 4000 TC (Applied/PerSeptive Biosystems) qui quantifie la fluorescence soluble ou intracellulaire d'une suspension. Cette fluorescence est mesurée *via* un tube photomultiplicateur qui quantifie et enregistre la quantité de fluorescence en unité arbitraire de fluorescence (AFU). Les tests sont réalisés en triplicats sur une même plaque et l'expérience est reproduite trois fois de manière indépendante (neuf valeurs par test au total). Les résultats sont généralement exprimés en pourcentage d'activité résiduelle des phosphatases CDC25 en présence des composés testés, ou en pourcentage d'inhibition de l'activité résiduelle des CDC25. Les sigmoïdes qui permettent d'évaluer les CI₅₀ sont calculées par une approximation non linéaire basée sur la méthode des moindres carrés (GraphPad Prism).

3. Evaluation du type d'inhibiteur

La caractérisation du type d'inhibiteur se fait par analyse des données obtenues par la méthode fluorimétrique : L'enzyme est mise en contact avec différentes concentrations d'inhibiteur puis le substrat 3-OMFP est ajouté en diverses concentrations, l'activité enzymatique est ensuite mesurée de la même manière que celle décrite précédemment. Les représentations de Michaelis et Menten nous permettent de déterminer le type de l'inhibiteur :

Les représentations graphiques utilisées pour déterminer le type d'inhibition ont été adaptées à partir de l'équation de Michaelis et Menten $v_i = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m}$:

Dans le cas d'une cinétique Enzyme-Substrat-Inhibiteur nous obtenons l'équation de

Michaelis et Menten suivante :
$$v_i = \frac{\frac{v_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} \cdot [S]}{[S] + K_m \cdot \frac{1 + \frac{[I]}{K_i'}}{1 + \frac{[I]}{K_i'}}$$

Après avoir défini les termes simplifiés : $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$ et $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i}$

Puis développé l'équation :
$$v_i = \frac{\frac{v_{\max}}{\alpha} \cdot [S]}{[S] + K_m \cdot \frac{\alpha}{\alpha'}}$$

$$v_i = \frac{v_{\max}}{\alpha} \cdot [S] \cdot \frac{1}{[S] + K_m \cdot \frac{\alpha}{\alpha'}}$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{\alpha'}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \cdot \left([S] + K_m \cdot \frac{\alpha}{\alpha'} \right)$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{\alpha'}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{1}{[S]} K_m \cdot \frac{\alpha}{\alpha'} \right)$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot \alpha' \cdot \left(1 + [S] \cdot K_m \cdot \alpha \frac{1}{\alpha'} \right)$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(\alpha' + \frac{1}{[S]} K_m \cdot \alpha \right)$$

Nous obtenons l'équation $\frac{1}{v_i} = \frac{\alpha'}{v_{\max}} + \frac{1}{[S]} \frac{\alpha K_m}{v_{\max}}$ de la forme linéaire $y = b + a \cdot x$ correspondant à l'équation de Lineweaver-Burk $\frac{1}{V} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}}$ appliquée au complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur.

En traçant sur un graphique $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ pour les différentes concentrations en inhibiteur, nous obtenons une représentation graphique de Lineweaver-Burk permettant de lire directement K_M , V_{\max} , α et α' . Après avoir évalué α et α' on en déduit K_i et K_i' définis de la manière suivante : $\alpha' = \frac{v_{\max \text{ sans inhibiteur}}}{v_{\max \text{ avec inhibiteur}}}$ et $\alpha = \frac{\alpha' \cdot K_m \text{ avec inhibiteur}}{K_m \text{ sans inhibiteur}}$ et $K_i = \frac{[I]}{\alpha - 1}$ et $K_i' = \frac{[I]}{\alpha' - 1}$

II. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées au cours de cette thèse comprennent :

- Deux lignées de cancer du sein issues d'effusions pleurales de carcinomes canauxaires invasifs humains : MCF-7 et MDA-MB-231 (Cailleau, Young, Olive, & Reeves Jr., 1974; Soule, Vazquez, Long, Albert, & Brennan, 1973) ;
- Une lignée de cancer du sein résistante aux traitements anticancéreux : VCR-Res (aussi appelée VCREMS), dérivée de cellules MCF-7 sélectionnées pour leur résistance à la vincristine, acquise suite à un traitement par un agent mutagénique (Whelan et al, 1992) ;
- Une lignée de cellules mammaires immortalisées : hTERT-HME1, obtenues à partir des cellules HME1 (*Human mammary epithelial*) immortalisées suite à leur infection par le rétrovirus pBABEpuro-hTERT (Van der Haegen & Shay 1993; Gollahon & Shay 1996) ;
- Une lignée d'hépatocarcinome humain : HEP-G2 (Aden *et al.* 1979).

2. Milieux de culture

Les lignées MCF-7, MDA-MB-231 et Vcr-Res ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640, qui contient 10% (v/v) de BSA décomplémentée, des antibiotiques et antifongiques [Pénicilline-G 104 UI.mL⁻¹, Streptomycine 10 mg.mL⁻¹, amphotericine B 25 µg.mL⁻¹] (Eurobio, France).

La lignée HTERT-HME1 a été cultivée dans un mélange qui contient 90% de milieu RPMI-1640 additionné des composants cités ci-dessus et de 10% de milieu MEGM (Lonza Cologne GmbH) qui contient 0,5 µg.mL⁻¹ d'hydrocortisone, 5 mg.mL⁻¹ d'insuline, 10 ng.mL⁻¹ de facteur EGF (*Human Epidermal growth factor*), 0,52 µg.mL⁻¹ d'extrait pituitaire bovin et 10% (v/v) d'albumine de sérum bovin décomplémenté (SAB).

La lignée HepG2 est cultivée dans du milieu MEM qui contient 10% de SAB (v/v), des antibiotiques et antifongiques comme ceux précédemment cités.

3. Entretien des lignées, incubation, traitements.

Conditions de culture

Les milieux de culture sont remplacés par du milieu frais tous les trois jours, le milieu des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et Vcr-Res qui ne contient pas de rouge de phénol, une attention plus particulière y est apportée (pas d'indicateur de pH).

Dès sub-confluence, un passage des cellules est réalisé. Le milieu de culture est aspiré et éliminé, le tapis cellulaire est rincé au PBS-1X à 37°C, puis de la trypsine-EDTA 1X est ajoutée afin de décoller le tapis. La trypsination agit à 37°C, 3 à 5 minutes pour les lignées MCF-7 et MDA-MB-231, et 5 à 10 minutes pour les lignées HepG2 et Vcr-Res. La trypsine est neutralisée par ajout du même volume de milieu complet correspondant. Une fois décollées, un petit volume de suspension est prélevé pour comptage, et le reste de la suspension est centrifugé pendant 5 minutes à 800 g, à température ambiante. Le culot obtenu est resuspendu dans du milieu complet de manière à obtenir une concentration cellulaire de 10^6 cellules.mL⁻¹, puis éventuellement diluée selon les besoins d'ensemencement. Les cellules sont généralement repiquées au 1/10^{ème}, ou selon les besoins de l'expérience. L'incubation se fait à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂.

Les ensemencements se font à une densité de 10 000 cellules par cm², cette quantité peut varier selon les conditions expérimentales (ex. prétraitement de 48h qui nécessite moins de cellules au départ).

Congélation et décongélation

La conservation des souches se fait par cryopréservation en azote liquide. Une suspension cellulaire de 3.10^6 cellules.mL⁻¹ est réalisée dans du milieu de congélation froid (Milieu complet qui contient 20% de SVF final et 5% (v/v) de Di Methyl Sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). La suspension est disposée dans des cryotubes de 1mL qui sont congelés par la méthode des paliers : 1h à -20°C, 24h à -80°C puis dans l'azote liquide jusqu'à utilisation.

Les cellules sont utilisées à des passages inférieurs à 10. Lorsque ce passage est atteint, une nouvelle ampoule de cellules est décongelée : le cryotube est plongé dans un bain marie à 37°C jusqu'à fonte de la suspension congelée. Puis le contenu du tube est transféré goutte à

goutte dans 10mL de milieu complet. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 minutes à 800 g et resuspendues dans 5mL de milieu de culture à température ambiante. Elles sont finalementensemencées dans une flasque de 25cm² puis incubées à 37°C, 5% de CO₂ en atmosphère humide.

Traitements

Pour les traitements, les cellules sont traitées à une confluence d'approximativement 30%. Le pourcentage final de DMSO dans lequel les composés sont dilués, est de 0,5%. Sauf mention contraire, les témoins sont les cellules traitées avec 0,5% de DMSO uniquement.

III. Etude de la viabilité cellulaire

1. Test de croissance au MTT

La viabilité des cellules est évaluée par un test MTT (Mosmann 1983) qui est basé sur la réduction du 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), un composé jaune, en cristaux violets de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale, uniquement fonctionnelle dans les cellules vivantes. La quantité de cristaux formés est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

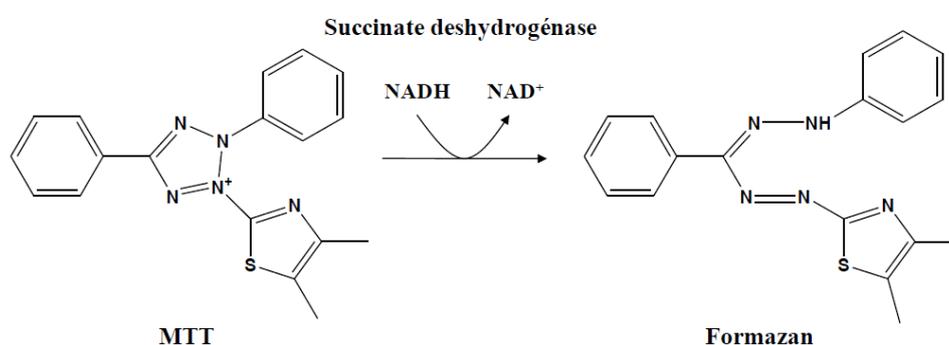


Fig. 91. Transformation du MTT en formazan

Dans un premier temps, les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits à raison de 3500 cellules par puits. Après une incubation de 24 heures, le milieu est éliminé et du milieu frais qui contient le traitement est ajouté. Les cellules sont ré-incubées pendant 24 ou 48 heures. Le milieu de culture est ensuite retiré, le tapis cellulaire est rincé avec du PBS 1X, puis une solution de MTT à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ est ajoutée. La transformation par la succinate déshydrogénase se fait à 37°C pendant 3 heures. Le réactif est finalement retiré et les cristaux de formazan formés sont dissouts dans $100\mu\text{L}$ de DMSO par puits. L'intensité de coloration est ensuite lue sur un spectrophotomètre à 550 nm (Dynatech MR5000). Douze concentrations sont testées par plaque (incluant un témoin DMSO), avec 8 essais par concentration, l'expérience est répétée trois fois de façon indépendante. Les courbes sigmoïdes de CI_{50} sont évaluées par une approximation non linéaire basée sur la méthode des moindres carrés (GraphPad Prism, Graphpad Software Inc.).

2. Etude du caractère cytotoxique/cytostatique d'un traitement

L'effet cytotoxique/cytostatique d'un composé est évalué par un test d'exclusion au bleu de trypan, un composé bleu capable d'entrer dans les cellules perméables non *viables*.

Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits à raison de 1.10^5 cellules par puits. Après incubation pendant 24 h, le milieu de culture est retiré et remplacé par du milieu frais qui contient le composé à tester ou le solvant seul (DMSO 0,5% v/v). Les cellules sont réincubées pendant différents temps, en fonction de l'expérience menée (le plus généralement 12, 24, 36, 48, 60 ou 72h). Les cellules flottantes sont récupérées et ajoutées aux cellules adhérentes préalablement décollées par trypsination. Les cellules de la suspension sont alors comptées en présence de bleu de trypan (0,4% v/v). La quantité de cellules non marquées et marquées est reportée au volume récupéré dans chaque puits, permettant ainsi d'évaluer le nombre de cellules mortes, la population aux différents temps et traitement, et leur comparaison avec le témoin DMSO. Chaque condition expérimentale est réalisée dans deux puits, et les expériences sont réalisées en triplicats indépendants.

3. Observation de la croissance cellulaire, suivi temps réel en microscopie

La croissance cellulaire est suivie en temps réel par un videomicroscope intégré dans un incubateur (Incucyte, Essen biosciences). Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits et incubées pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées ou prétraitées. Un programme informatique qui gère le microscope, capture des images précises de plusieurs champs microscopiques dans chacun des puits. Il calcule aussi la confluence des cellules et trace les courbes correspondantes en fonction du temps. Ce système permet également d'observer les changements morphologiques qui interviennent dans la cellule pendant le traitement et de le comparer aux témoins.

IV. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

La répartition de la population cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire est déterminée par l'analyse du contenu en ADN des cellules. Cette analyse permet de déterminer si les cellules se trouvent en phase G₀/G₁ (2n chromosomes), G₂/M (4n chromosomes) ou S (phase de synthèse, la quantité d'ADN est comprise entre 2n et 4n). Le marquage de l'ADN est réalisé grâce à un fluorochrome, l'iodure de propidium, qui est un agent intercalant de l'ADN. L'intensité de marquage des cellules est proportionnelle à la quantité d'ADN qu'elles contiennent. Le cytomètre en flux permet d'analyser chaque cellule et de les classer par intensité de fluorescence émise.

Les cellules sontensemencées en boîtes de Petri de 100-mm à une densité de 6.10^5 cellules, et elles sont incubées pendant 24h. Le milieu est éliminé et remplacé par du milieu frais qui contient le traitement ou le solvant seul (DMSO 0,5% v/v). Après incubation de 24 ou 48h à 37°C, les cellules flottantes et adhérentes sont récupérées et resuspendues dans de l'éthanol à 70% glacé. Elles sont incubées au minimum pendant 4h à -20°C. Les cellules sont ensuite centrifugées puis rincées deux fois au PBS 1X froid, puis incubées dans une solution qui contient de l'iodure de propidium à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de l'ARNase A à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et du Triton à 0,1%, 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Le contenu en ADN de chaque cellule est analysé par cytométrie en flux, FL2-H (FACScalibur, Becton-Dickinson, USA). L'analyse des données est réalisée par l'intermédiaire du programme FlowJo (Tree Star Inc.).

V. Evaluation du stress oxydant par cytométrie en flux

1. Analyse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène

La génération d'ERO peut être détectée par cytométrie en flux à l'aide de la sonde fluorescente H₂DCFDA (LeBel *et al.* 1992). Une fois entrée dans la cellule, le H₂DCFDA devient la cible d'estérases intracellulaires qui déacétylent la sonde en DCF, un composé non polaire et non fluorescent qui sera capable d'émettre une fluorescence verte en présence d'ERO et de espèces réactives nitrées (ERN). Sur le même principe, la sonde Redox Sensor Red à elle aussi été utilisé pour la détection des ERO. Lorsque cette sonde pénètre dans la cellule, elle est oxydée par les ERO en un composé capable d'émètre une fluorescence rouge.

La détection des ERO est sensiblement différente pour chacune des deux sondes, les espèces détectées sont résumées dans le tableau ci-après :

Détection des espèces réactives		
<i>ERO ou ERN</i>	<i>H₂DCFDA</i>	<i>Redox Sensor Red</i>
<i>Peroxyde d'hydrogène H₂O₂</i>	Oui	Oui
<i>Radical hydroxyle HO[•]</i>	Oui	Non
<i>Radical peroxyde ROO[•]</i>	Oui	Oui
<i>Anion peroxydinitrite ONOO⁻</i>	Oui	Non
<i>Anion superoxyde O₂^{•-}</i>	Non	Oui

Après ensemencement en plaques de 6 puits, les cellules sont incubées pendant 24h à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂. La sonde H₂DCFDA est ajoutée à une concentration finale de 10 µM pendant 20 minutes à 37°C. Les traitements sont réalisés simultanément selon le temps désiré. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X puis trypsinées jusqu'à leur décollement. La trypsine est neutralisée par du milieu frais et la suspension cellulaire obtenue est analysée par cytométrie en flux (FL1-H).

2. Analyse de la génération d'espèces réactives nitrées

Sur le même principe que la détection d'ERO décrite précédemment, les espèces réactives nitrées et l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) peuvent être détectées par la sonde Diaminofluorescein-2-diacetate (DAF₂DA) (Kojima *et al.* 1998). Une fois dans la cellule la sonde est hydrolysée par les estérases en DAF-2 qui deviendra fluorescent au contact de NOS ou d'ERN.

Après ensemencement en plaques 6 puits, les cellules sont incubées pendant 24h à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂. La sonde DAF₂DA est ajoutée à une concentration finale de 1 µM pendant 40 minutes à 37°C. Les traitements sont réalisés simultanément selon le temps désiré. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X puis trypsinées jusqu'à décollement. La trypsine est neutralisée par du milieu frais et la suspension cellulaire obtenue est analysée en cytométrie en flux (FL1-H).

VI. Analyses par *western blotting*

1. Préparation des lysats cellulaires

Après traitement, le milieu de culture est récupéré puis centrifugé afin d'en récupérer les cellules non adhérentes, ces dernières sont resuspendues dans du tampon de lyse [150 mM NaCl ; 50 mM Tris ; 1% NP-40 ; 0,5% déoxycholate de sodium ; 0,1% SDS ; 5 mM EDTA ; 1 mM EGTA ; 1 mM PMSF ; 0,1% Cocktail inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich) ; 10 mM NaF ; 1 mM Na₂VO₄]. Après rinçage au PBS 1X froid, les cellules adhérentes sont récupérées par grattage dans le tampon de lyse froid. Puis la totalité des cellules est incubée 30min sur glace et sous agitation. Après incubation, le lysat est centrifugé pendant 20 minutes à 10000 g et à 4°C afin de culoter les débris membranaires. Le surnageant qui contient les protéines est récupéré, dosé par la méthode de Lowry, puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Electrophorèse en conditions dénaturantes, SDS-Page

Les protéines des lysats cellulaire sont tout d'abord dénaturées par chauffage pendant 5 minutes à 96°C dans du tampon de Laemmli [2% SDS ; 10% β-mercaptoéthanol ; 10% Glycérol ; 0,0002% bleu de bromophénol ; 0,062 mM Tris HCl ; pH 6,8]. Puis elles sont chargées sur un gel de polyacrylamide (PAGE) afin de les séparer. Les anions SDS vont se lier au squelette polypeptidique pour le dénaturer, et conférer ainsi une charge négative à la protéine, proportionnelle à sa longueur. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de concentration à 5% [5% Acrylamide/Bisacrylamide ; 125 mM TrisHCl pH 6,8; 5% Glycérol ; 0,2% SDS], ainsi que d'un gel de séparation de 8 à 14% [8-14% Acrylamide/Bisacrylamide ; 375 mM TrisHCl pH 8,8 ; 5% Glycérol ; 0,2% SDS]. L'électrophorèse se fait dans une cuve Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad), au contact de tampon de migration [25 mM Tris ; 190 mM Glycine ; 0,1% SDS ; pH 8,3], sous un champ électrique de 150V pendant environ 1h30 et à température ambiante.

3. Immunoblotting

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane en nitrocellulose ou en polyvinylidène difluorure (PVDF). Le gel SDS-PAGE est appliqué sur la membrane dans un système de transfert XCellSureLock™ Mini-Cell (Invitrogen), au contact de tampon

de transfert [25 mM Tris ; 190 mM Glycine ; 10% méthanol], sous un champ électrique de 25V pendant 1h et à froid.

Après transfert, la membrane est rincée avec du PBS-T [2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄-2H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween 20, pH 7,4], puis colorée par une solution de Rouge Ponceau [0,2 % (m/v) Rouge Ponceau, 3 % (v/v) acide acétique]. Après vérification de la régularité et de l'efficacité du transfert, la membrane est lavée plusieurs fois au PBS-T afin de la décolorer, puis elle est saturée pendant 1 heure dans du tampon PBS-T contenant 5% (m/v) de lait écrémé ou 5% (m/v) de SAB (selon les recommandations du fournisseur de l'anticorps primaire).

La membrane est ensuite lavée dans du PBS-T, puis incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-T, avec, selon l'anticorps, 5% de lait écrémé (m/v) ou 5% de SAB (m/v). La dilution varie selon l'anticorps utilisé (voir tableau ci-après) et l'incubation se fait selon les recommandations du fournisseur de l'anticorps primaire, généralement une nuit à 4°C sous agitation. Après incubation, la membrane est rincée avec du PBS-T puis incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (HRP, *HorseRadish Peroxydase*), la dilution varie selon l'anticorps primaire utilisé (voir tableau ci-après).

La membrane est lavée dans du PBS-T puis mise en contact avec les réactifs du kit *luminol reagent* (Santa Cruz) contenant le substrat de la HRP. Le marquage est révélé à l'aide du bioanalyseur Chemidoc XRS (Bio-Rad).

4. Liste, références et conditions d'utilisation des anticorps

Anticorps Primaire	Fournisseur, référence	Hôte	Conditions d'utilisation de l'Ac. primaire	Conditions d'utilisation de l'Ac. Secondaire	Bandes attendues (kDa), protéine correspondante
Anti-CDK1 (cdc2)	Cell Signaling #9112	Lapin	1 :1000, TBS-T, 5% SAB, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :5000, TBS-T, 5% SAB, 1 heure à 20°C	34, CDK1 total
Anti-pCDK1 (pTpY ^{14/15})	Invitrogen 44686G	Lapin	1 :1000, TBS-T, 1% SAB, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :5000, TBS-T, 1% SAB, 1 heure à 20°C	34, Phospho-CDK1 (Thr14, Tyr15)
Anti-CDK2	Santa Cruz Sc-748	Lapin	1 :1000, TBS-T, 1% SAB, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :5000, TBS-T, 1% SAB, 1 heure à 20°C	33, CDK2 total
Anti-pCDK2 [pT14] phosphospécifique	Epitomics #2351-S	Lapin	1 :1000, TBS-T, 1% SAB, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :5000, TBS-T, 1% SAB, 1 heure à 20°C	33, phospho-cdk2 (Thr 14)

Anticorps Primaire	Fournisseur, référence	Hôte	Conditions d'utilisation de l'Ac. primaire	Conditions d'utilisation de l'Ac. Secondaire	Bandes attendues (kDa), protéine correspondante
Anti-PARP-1/2	Santa Cruz, Sc-7150	Lapin	1 :2000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :5000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	116, PARP-1 complète 89, PARP -1 C-ter 24, PARP-1 N-ter 62, PARP-2
Anti-PARP	Cell Signalling, #9542	Lapin	1 :1000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	116, PARP-1 complète 89, PARP -1 C-ter
Anti-p-21	Santa Cruz, Sc-397	Lapin	1 :1000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	21, p-21
Anti-p-27	Santa Cruz, Sc-527	Lapin	1 :1000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	27, p-27
Anti-Caspase 3	Cell Signalling, #56053	Souris	1 :1000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Souris HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	30,Caspase 3 complète 17,Caspase 3 clivée 10,Caspase 3 clivée
Anti-Caspase 6	Cell Signalling, #9762	Lapin	1 :1000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Lapin HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	35,Caspase 6 complète 15,Caspase 6 clivée
Anti-Caspase 7	Cell Signalling, #9494	Souris	1 :1000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Souris HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	35,Caspase 7 complète 30,Caspase 7 clivée 20,Caspase 7 clivée
Anti-c-Myc	BD Pharmingen, 51-1485GR	Souris	1 :250, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Souris HRP 1 :5000, TBS-T, 5% lait, 1 heure à 20°C	62, c-Myc
Anti-γH2AX	Millipore 05-636	Souris	1 :2000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Souris HRP 1 :4000, TBS-T, 5% lait, 40 minutes à 20°C	17, Histone 2 AX
Anti-Actine	Sigma A5441	Souris	1 :10000, TBS-T, 5% lait, une nuit à 4°C	Anti-Souris HRP 1 :10000, TBS-T, 5% lait, 40 minutes à 20°C	42, β-actine

Anticorps secondaire	Fournisseur, référence	Hôte
Anti-souris IgG HRP	Santa Cruz, Sc-2005	Chèvre
Anti-lapin IgG HRP	Santa Cruz, Sc-2313	Âne

BIBLIOGRAPHIE

- Aden, D.P. ; Fogel, A. ; Plotkin, S. ; Damjanov, I. ; & Knowles, B.B., **Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.** *Nature* (1979), Vol. 282, Issue 5739, p. 615–6.
- Amadori, D. ; Bertoni, L. ; Flamigni, A. ; Savini, S. ; De Giovanni, C. ; Casanova, S. ; De Paola, F. ; Amadori, A. ; Giulotto, E. ; & Zoli, W., **Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma.** *Breast Cancer Res Treat* (1993), Vol. 28, Issue 3, p. 251–260.
- Arantes, G.M., **The catalytic acid in the dephosphorylation of the Cdk2-pTpY/CycA protein complex by Cdc25B phosphatase.** *The journal of physical chemistry. B* (2008), Vol. 112, Issue 47, p. 15244–7.
- Aressy, B. & Ducommun, B., **Cell Cycle Control by the CDC25 Phosphatases.** *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* (2008), Vol. 8, Issue 8, p. 7.
- Asche, C., **Antitumour quinones.** *Mini reviews in medicinal chemistry* (2005), Vol. 5, Issue 5, p. 449–67.
- Ashihara, T. & Baserga, R., **Cell synchronization.** *Methods in Enzymology* (1979), Vol. 58, p. 248–262.
- Astuti, P. & Gabrielli, B., **Phosphorylation of Cdc25B3 Ser169 regulates 14-3-3 binding to Ser151 and Cdc25B activity.** *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* (2011), Vol. 10, Issue 12, p. 1960–7.
- Bäurle, S. ; Blume, T. ; Günther, J. ; Henschel, D. ; Hillig, R.C. ; Husemann, M. ; Mengel, A. ; Parchmann, C. ; Schmid, E. ; & Skuballa, W., **Design and synthesis of macrocyclic inhibitors of phosphatase cdc25B.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters* (2004), Vol. 14, Issue 7, p. 1673–7.
- Beillerot, A. ; Battaglia, E. ; Aline, B. ; & Bagrel, D., **Protection of CDC25 phosphatases against oxidative stress in breast cancer cells: evaluation of the implication of the thioredoxin system.** *Free radical research* (2012), Vol. 46, Issue 5, p. 674–89.
- Berry, D.A. ; Cirrincione, C. ; Henderson, I.C. ; Citron, M.L. ; Budman, D.R. ; Goldstein, L.J. ; Martino, S. ; Perez, E.A. ; Muss, H.B. ; Norton, L. ; Hudis, C. ; & Winer, E.P., **Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer.** *JAMA: the journal of the American Medical Association* (2006), Vol. 295, Issue 14, p. 1658–67.
- Blajeski, A.L. ; Phan, V.A. ; Kottke, T.J. ; & Kaufmann, S.H., **G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells.** *The Journal of clinical investigation* (2002), Vol. 110, Issue 1, p. 91–99.
- Blanc, C. ; Deveraux, Q.L. ; Krajewski, S. ; Jänicke, R.U. ; Porter, A.G. ; Reed, J.C. ; Jaggi, R. ; & Marti, A., **Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells.** *Cancer research* (2000), Vol. 60, Issue 16, p. 4386–90.
- Blasina, A. ; De Weyer, I. V ; Laus, M.C. ; Luyten, W.H. ; Parker, A.E. ; & McGowan, C.H., **A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase.** *Current biology: CB* (1999), Vol. 9, Issue 1, p. 1–10.
- Blomberg, I. & Hoffmann, I., **Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases.** *Molecular and cellular biology* (1999), Vol. 19, Issue 9, p. 6183–94.

- Bonin, S. ; Brunetti, D. ; Benedetti, E. ; Gorji, N. ; & Stanta, G., **Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and post-menopausal breast cancer.** *Virchows Archiv* (2006), Vol. 448, Issue 5, p. 539–544.
- Boutros, R. ; Dozier, C. ; & Ducommun, B., **The when and wheres of CDC25 phosphatases.** *Current Opinion in Cell Biology* (2006), Vol. 18, Issue 2, p. 185–191.
- Boutros, R. ; Lobjois, V. ; & Ducommun, B., **CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?** *Nature Reviews. Cancer* (2007), Vol. 7, Issue 7, p. 495–507.
- Brady-West, D.C. & McGrowder, D.A., **Triple negative breast cancer: therapeutic and prognostic implications.** *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* (2011), Vol. 12, Issue 8, p. 2139–43.
- Braud, E. ; Goddard, M.-L. ; Kolb, S. ; Brun, M.-P. ; Mondésert, O. ; Quaranta, M. ; Gresh, N. ; Ducommun, B. ; & Garbay, C., **Novel naphthoquinone and quinolinedione inhibitors of CDC25 phosphatase activity with antiproliferative properties.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2008), Vol. 16, Issue 19, p. 9040–9049.
- Brault, L. & Bagrel, D., **Activity of novel Cdc25 inhibitors and preliminary evaluation of their potentiation of chemotherapeutic drugs in human breast cancer cells.** *Life Science* (2008), Vol. 82, Issue 5-6, p. 315–323.
- Brault, L. ; Denancé, M. ; Banaszak, E. ; El Maadidi, S. ; Battaglia, E. ; Bagrel, D. ; & Samadi, M., **Synthesis and biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of Cdc25 dual specificity phosphatases.** *European Journal of Medicinal Chemistry* (2007), Vol. 42, Issue 2, p. 243–247.
- Brezak, M.C. ; Quaranta, M. ; Contour-Galcera, M.O. ; Lavergne, O. ; Mondesert, O. ; Auvray, P. ; Kasprzyk, P.G. ; Prevost, G.P. ; & Ducommun, B., **Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases.** *Molecular Cancer Therapeutics* (2005), Vol. 4, Issue 9, p. 1378–1387.
- Brezak, M.C. ; Quaranta, M. ; Mondesert, O. ; Galcera, M.O. ; Lavergne, O. ; Alby, F. ; Cazales, M. ; Baldin, V. ; Thurieau, C. ; Harnett, J. ; Lanco, C. ; Kasprzyk, P.G. ; Prevost, G.P. ; & Ducommun, B., **A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases: BN82002.** *Cancer Research* (2004), Vol. 64, Issue 9, p. 3320–3325.
- Brezak, M.C. ; Valette, A. ; Quaranta, M. ; Contour-Galcera, M.O. ; Jullien, D. ; Lavergne, O. ; Frongia, C. ; Bigg, D. ; Kasprzyk, P.G. ; Prevost, G.P. ; & Ducommun, B., **IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells.** *International Journal of Cancer* (2009), Vol. 124, Issue 6, p. 1449–1456.
- Brezak, M.-C. ; Kasprzyk, P.G. ; Galcera, M.-O. ; Lavergne, O. ; & Prévost, G.P., **CDC25 inhibitors as anticancer agents are moving forward.** *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* (2008), Vol. 8, Issue 8, p. 857–62.
- Brisson, M. ; Nguyen, T. ; Vogt, A. ; Yalowich, J. ; Giorgianni, A. ; Tobi, D. ; Bahar, I. ; Stephenson, C.R. ; Wipf, P. ; & Lazo, J.S., **Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase.** *Molecular Pharmacology* (2004), Vol. 66, Issue 4, p. 824–833.

- Brisson, M. ; Foster, C. ; Wipf, P. ; Joo, B. ; Tomko, R.J. ; Nguyen, T. ; & Lazo, J.S., **Independent mechanistic inhibition of cdc25 phosphatases by a natural product caulibugulone**. *Molecular pharmacology* (2007), Vol. 71, Issue 1, p. 184–92.
- Brun, M.P. ; Braud, E. ; Angotti, D. ; Mondesert, O. ; Quaranta, M. ; Montes, M. ; Miteva, M. ; Gresh, N. ; Ducommun, B. ; & Garbay, C., **Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2005), Vol. 13, Issue 16, p. 4871–4879.
- Buhrman, G. ; Parker, B. ; Sohn, J. ; Rudolph, J. ; & Mattos, C., **Structural mechanism of oxidative regulation of the phosphatase Cdc25B via an intramolecular disulfide bond**. *Biochemistry* (2005), Vol. 44, Issue 14, p. 5307–5316.
- Bulavin, D. V ; Higashimoto, Y. ; Popoff, I.J. ; Gaarde, W.A. ; Basrur, V. ; Potapova, O. ; Appella, E. ; & Fornace, A.J., **Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase**. *Nature* (2001), Vol. 411, Issue 6833, p. 102–7.
- Bulavin, D. V ; Higashimoto, Y. ; Demidenko, Z.N. ; Meek, S. ; Graves, P. ; Phillips, C. ; Zhao, H. ; Moody, S.A. ; Appella, E. ; Piwnica-Worms, H. ; & Fornace, A.J., **Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry**. *Nature cell biology* (2003), Vol. 5, Issue 6, p. 545–51.
- Bureik, M. ; Rief, N. ; Drescher, R. ; Jungbluth, A. ; Montenarh, M. ; & Wagner, P., **An additional transcript of the cdc25C gene from A431 cells encodes a functional protein**. *International journal of oncology* (2000), Vol. 17, Issue 6, p. 1251–8.
- Busino, L. ; Chiesa, M. ; Draetta, G.F. ; & Donzelli, M., **Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis**. *Oncogene* (2004), Vol. 23, Issue 11, p. 2050–6.
- Cailleau, R. ; Young, R. ; Olive, M. ; & Reeves Jr., W.J., **Breast tumor cell lines from pleural effusions**. *Journal of the National Cancer Institute* (1974), Vol. 53, Issue 3, p. 661–674.
- Cangi, M.G. ; Cukor, B. ; Soung, P. ; Signoretti, S. ; Moreira Jr., G. ; Ranashinge, M. ; Cady, B. ; Pagano, M. ; & Loda, M., **Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer**. *Journal of Clinical Investigation* (2000), Vol. 106, Issue 6, p. 753–761.
- Cao, S. ; Foster, C. ; Lazo, J.S. ; & Kingston, D.G.I., **Sesterterpenoids and an alkaloid from a Thorectandra sp. as inhibitors of the phosphatase Cdc25B**. *Bioorganic & medicinal chemistry* (2005a), Vol. 13, Issue 17, p. 5094–8.
- Cao, S. ; Foster, C. ; Lazo, J.S. ; & Kingston, D.G.I., **Four diterpenoid inhibitors of Cdc25B phosphatase from a marine anemone**. *Bioorganic & medicinal chemistry* (2005b), Vol. 13, Issue 20, p. 5830–4.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K., **Angiogenesis in cancer and other diseases**. *Nature* (2000), Vol. 407, Issue 6801, p. 249–57.
- Cazales, M. ; Boutros, R. ; Brezak, M.-C. ; Chaumeron, S. ; Prevost, G. ; & Ducommun, B., **Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly**. *Molecular cancer therapeutics* (2007), Vol. 6, Issue 1, p. 318–25.

- Chen, M.-S. ; Ryan, C.E. ; & Piwnica-Worms, H., **Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding**. *Molecular and cellular biology* (2003), Vol. 23, Issue 21, p. 7488–97.
- Chen, W. ; Wilborn, M. ; & Rudolph, J., **Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid**. *Biochemistry* (2000), Vol. 39, Issue 35, p. 10781–9.
- Choi, S.-G. ; Kim, J. ; Sung, N.-D. ; Son, K.-H. ; Cheon, H.-G. ; Kim, K.-R. ; & Kwon, B.-M., **Anthraquinones, Cdc25B phosphatase inhibitors, isolated from the roots of Polygonum multiflorum Thunb.** *Natural product research* (2007), Vol. 21, Issue 6, p. 487–93.
- Cohen, G.M. & d'Arcy Doherty, M., **Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals**. *British Journal of Cancer Supplement* (1987), Vol. 8, p. 46–52.
- Conklin, D.S. ; Galaktionov, K. ; & Beach, D., **14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1995), Vol. 92, Issue 17, p. 7892–6.
- Contour-Galcera, M.O. ; Sidhu, A. ; Prevost, G. ; Bigg, D. ; & Ducommun, B., **What's new on CDC25 phosphatase inhibitors**. *Pharmacology & Therapeutics* (2007), Vol. 115, Issue 1, p. 1–12.
- Crespi, M.D. ; Ivanier, S.E. ; Genovese, J. ; & Baldi, A., **Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1986), Vol. 136, Issue 2, p. 521–528.
- D'Hondt, V. ; Piccart, M. ; & Sotiriou, C., **Introduire les profils d'expression génomiques en clinique: à quand les signatures moléculaires au lit du malade?** *Bulletin du cancer* (2008), Vol. 95, Issue 3, p. 336–343.
- Davezac, N. ; Baldin, V. ; Gabrielli, B. ; Forrest, A. ; Theis-Febvre, N. ; Yashida, M. ; & Ducommun, B., **Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization**. *Oncogene* (2000), Vol. 19, Issue 18, p. 2179–85.
- Deep, G. & Agarwal, R., **New combination therapies with cell-cycle agents**. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* (2008), Vol. 9, Issue 6, p. 591–604.
- Deep, G. ; Oberlies, N.H. ; Kroll, D.J. ; & Agarwal, R., **Identifying the differential effects of silymarin constituents on cell growth and cell cycle regulatory molecules in human prostate cancer cells**. *International journal of cancer. Journal international du cancer* (2008), Vol. 123, Issue 1, p. 41–50.
- Demidova, A.R. ; Aau, M.Y. ; Zhuang, L. ; & Yu, Q., **Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control**. *The Journal of biological chemistry* (2009), Vol. 284, Issue 7, p. 4132–9.
- Dodo, K. ; Takahashi, M. ; Yamada, Y. ; Sugimoto, Y. ; Hashimoto, Y. ; & Shirai, R., **Synthesis of a novel class of cdc25A inhibitors from vitamin D3**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2000), Vol. 10, Issue 7, p. 615–617.
- Donzelli, M. & Draetta, G.F., **Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation**. *EMBO reports* (2003), Vol. 4, Issue 7, p. 671–7.

- Donzelli, M. ; Squatrito, M. ; Ganoth, D. ; Hershko, A. ; Pagano, M. ; & Draetta, G.F., **Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase**. The EMBO journal (2002), Vol. 21, Issue 18, p. 4875–84.
- Dranoff, G., **Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy**. Nature reviews. Cancer (2004), Vol. 4, Issue 1, p. 11–22.
- Elefsiniotis, I.S. ; Pantazis, K.D. ; Ilias, A. ; Pallis, L. ; Mariolis, A. ; Glynou, I. ; Kada, H. ; & Moulakakis, A., **Tamoxifen induced hepatotoxicity in breast cancer patients with pre-existing liver steatosis: the role of glucose intolerance**. European journal of gastroenterology & hepatology (2004), Vol. 16, Issue 6, p. 593–8.
- Falck, J. ; Mailand, N. ; Syljuåsen, R.G. ; Bartek, J. ; & Lukas, J., **The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis**. Nature (2001), Vol. 410, Issue 6830, p. 842–7.
- Fauman, E.B. ; Cogswell, J.P. ; Lovejoy, B. ; Rocque, W.J. ; Holmes, W. ; Montana, V.G. ; Piwnica-Worms, H. ; Rink, M.J. ; & Saper, M.A., **Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A**. Cell (1998), Vol. 93, Issue 4, p. 617–25.
- Fauman, E.B. & Saper, M.A., **Structure and function of the protein tyrosine phosphatases**. Trends in Biochemical Sciences (1996), Vol. 21, Issue 11, p. 413–417.
- Ferguson, A.M. ; White, L.S. ; Donovan, P.J. ; & Piwnica-Worms, H., **Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases**. Molecular & Cellular Biology (2005), Vol. 25, Issue 7, p. 2853–2860.
- Gabrielli, B.G. ; De Souza, C.P. ; Tonks, I.D. ; Clark, J.M. ; Hayward, N.K. ; & Ellem, K.A., **Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells**. Journal of Cell Science (1996), Vol. 109, Issue 5, p. 1081–1093.
- Galaktionov, K. ; Chen, X. ; & Beach, D., **Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc**. Nature (1996), Vol. 382, Issue 6591, p. 511–7.
- Galaktionov, K. ; Lee, A.K. ; Eckstein, J. ; Draetta, G. ; Meckler, J. ; Loda, M. ; & Beach, D., **CDC25 phosphatases as potential human oncogenes**. Science (New York, N.Y.) (1995), Vol. 269, Issue 5230, p. 1575–7.
- Garner-Hamrick, P.A. & Fisher, C., **Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects**. International Journal of Cancer (1998), Vol. 76, Issue 5, p. 720–728.
- Gazdar, A.F. ; Kurvari, V. ; Virmani, A. ; Gollahon, L. ; Sakaguchi, M. ; Westerfield, M. ; Kodagoda, D. ; Stasny, V. ; Cunningham, H.T. ; Wistuba II ; Tomlinson, G. ; Tonk, V. ; Ashfaq, R. ; Leitch, A.M. ; Minna, J.D. ; & Shay, J.W., **Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer**. Int J Cancer (1998), Vol. 78, Issue 6, p. 766–774.
- Giles, N. ; Forrest, A. ; & Gabrielli, B., **14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity**. The Journal of biological chemistry (2003), Vol. 278, Issue 31, p. 28580–7.

- Gunasekera, S.P. ; McCarthy, P.J. ; Kelly-Borges, M. ; Lobkovsky, E. ; & Clardy, J., **Dysidiolide: A novel protein phosphatase inhibitor from the Caribbean sponge *Dysidea etheria de Laubenfels***. *Journal of the American Chemical Society* (1996), Vol. 118, Issue 36, p. 8759–8760.
- Guo, J. ; Kleeff, J. ; Li, J. ; Ding, J. ; Hammer, J. ; Zhao, Y. ; Giese, T. ; Korc, M. ; Büchler, M.W. ; & Friess, H., **Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma**. *Oncogene* (2004), Vol. 23, Issue 1, p. 71–81.
- Ham, S.W. ; Park, J. ; LEE, S.-J.J. ; Kim, W. ; Kang, K. ; Choi, K.H. ; SEUNG WOOK, H. ; JUNGUK, P. ; WONHO, K. ; KYUNGHWA, K. ; & KYUNG HEE, C., **Naphthoquinone analogs as inactivators of cdc25 phosphatase**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (1998), Vol. 8, Issue 18, p. 2507–2510.
- Ham S.W. & Carr B.I., **Cell Division Cycle 25 (Cdc25) Phosphatase Inhibitors as Antitumor Agents**. *Drug Design Reviews - Online* (2004), Vol. 1, Issue 2, p. 10.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* (2011), Vol. 144, Issue 5, p. 646–674.
- Hernández, S. ; Hernández, L. ; Beà, S. ; Cazorla, M. ; Fernández, P.L. ; Nadal, A. ; Muntané, J. ; Mallofré, C. ; Montserrat, E. ; Cardesa, A. ; & Campo, E., **cdc25 cell cycle-activating phosphatases and c-myc expression in human non-Hodgkin's lymphomas**. *Cancer research* (1998), Vol. 58, Issue 8, p. 1762–7.
- Hirschhaeuser, F. ; Menne, H. ; Dittfeld, C. ; West, J. ; Mueller-Klieser, W. ; & Kunz-Schughart, L.A., **Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again**. *Journal of biotechnology* (2010), Vol. 148, Issue 1, p. 3–15.
- Hochegger, H. ; Takeda, S. ; & Hunt, T., **Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?** *Nature reviews. Molecular cell biology* (2008), Vol. 9, Issue 11, p. 910–6.
- Hoffmann, I. & Karsenti, E., **The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle**. *Journal of Cell Science Supplement* (1994), Vol. 18, p. 75–79.
- Institut National du Cancer (INCa), **La situation du cancer en France en 2011**. Institut National du Cancer, Collection Documents et synthèses (2011)
- Ishihara, Y. ; Ishii, S. ; Sakai, Y. ; Yamamura, N. ; Onishi, Y. ; & Shimamoto, N., **Crucial role of cytochrome P450 in hepatotoxicity induced by 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in rats**. *Journal of applied toxicology : JAT* (2011), Vol. 31, Issue 2, p. 173–8.
- Ishihara, Y. & Shimamoto, N., **A Role of Cytochrome P450 in Quinone-Induced Hepatotoxicity**. *Hepatotoxicity* (2007), Vol. Chapter 10, Issue DOI: 10.1002/9780470516751
- Ito, Y. ; Yoshida, H. ; Matsuzuka, F. ; Matsuura, N. ; Nakamura, Y. ; Nakamine, H. ; Kakudo, K. ; Kuma, K. ; & Miyauchi, A., **Cdc25A and cdc25B expression in malignant lymphoma of the thyroid: correlation with histological subtypes and cell proliferation**. *International journal of molecular medicine* (2004), Vol. 13, Issue 3, p. 431–5.

- Izumi, T. & Maller, J.L., **Phosphorylation and activation of the *Xenopus* Cdc25 phosphatase in the absence of Cdc2 and Cdk2 kinase activity.** *Molecular Biology of the Cell* (1995), Vol. 6, Issue 2, p. 215–226.
- Jänicke, R.U. ; Sprengart, M.L. ; Wati, M.R. ; & Porter, A.G., **Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* (1998), Vol. 273, Issue 16, p. 9357–60.
- Jiang, Z.-X. & Zhang, Z.-Y., **Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment.** *Cancer metastasis reviews* (2008), Vol. 27, Issue 2, p. 263–72.
- Jiao, H. ; Allinson, S.L. ; Walsh, M.J. ; Hewitt, R. ; Cole, K.J. ; Phillips, D.H. ; & Martin, F.L., **Growth kinetics in MCF-7 cells modulate benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 up-regulation.** *Mutagenesis* (2007), Vol. 22, Issue 2, p. 111–116.
- Jinno, S. ; Suto, K. ; Nagata, A. ; Igarashi, M. ; Kanaoka, Y. ; Nojima, H. ; & Okayama, H., **Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle.** *Embo J* (1994), Vol. 13, Issue 7, p. 1549–1556.
- Jullien, D. ; Bugler, B. ; Dozier, C. ; Cazales, M. ; & Ducommun, B., **Identification of N-terminally truncated stable nuclear isoforms of CDC25B that are specifically involved in G2/M checkpoint recovery.** *Cancer research* (2011), Vol. 71, Issue 5, p. 1968–77.
- Kapuscinski, J. & Darzynkiewicz, Z., **Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs Ametrantrone and mitoxantrone (Novatrone) and their ability to condense nucleic acids.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1986), Vol. 83, Issue 17, p. 6302–6.
- Kar, S. ; Wang, M. ; & Carr, B.I., **2-Methoxyestradiol inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by inhibiting Cdc25 and inducing cell cycle arrest and apoptosis.** *Cancer Chemother Pharmacol* (2008), Vol. 62, Issue 5, p. 831–840.
- Kar, S. ; Lefterov, I.M. ; Wang, M. ; Lazo, J.S. ; Scott, C.N. ; Wilcox, C.S. ; & Carr, B.I., **Binding and inhibition of Cdc25 phosphatases by vitamin K analogues.** *Biochemistry* (2003), Vol. 42, Issue 35, p. 10490–10497.
- Kar, S. ; Wang, M. ; Yao, W. ; Michejda, C.J. ; & Carr, B.I., **PM-20, a novel inhibitor of Cdc25A, induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo.** *Molecular cancer therapeutics* (2006), Vol. 5, Issue 6, p. 1511–9.
- Karlsson, C. ; Katich, S. ; Hagting, A. ; Hoffmann, I. ; & Pines, J., **Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis.** *The Journal of cell biology* (1999), Vol. 146, Issue 3, p. 573–84.
- Kayashima, T. ; Mori, M. ; Mizutani, R. ; Nishio, K. ; Kuramochi, K. ; Tsubaki, K. ; Yoshida, H. ; Mizushina, Y. ; & Matsubara, K., **Synthesis and biological evaluation of vitamin K derivatives as angiogenesis inhibitor.** *Bioorganic & medicinal chemistry* (2010), Vol. 18, Issue 17, p. 6305–9.
- Keyomarsi, K. ; Sandoval, L. ; Band, V. ; & Pardee, A.B., **Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin.** *Cancer research* (1991), Vol. 51, Issue 13, p. 3602–3609.
- Kim, J.B. ; O'Hare, M.J. ; & Stein, R., **Models of breast cancer: is merging human and animal models the future?** *Breast Cancer Res* (2004), Vol. 6, Issue 1, p. 22–30.

- Kim, K.S. ; Kawasaki, I. ; Chong, Y. ; & Shim, Y.-H., **Inhibition of overexpressed CDC-25.1 phosphatase activity by flavone in Caenorhabditis elegans.** *Molecules and cells* (2009), Vol. 27, Issue 3, p. 345–50.
- Knasmüller, S. ; Mersch-Sundermann, V. ; Kevekordes, S. ; Darroudi, F. ; Huber, W.W. ; Hoelzl, C. ; Bichler, J. ; & Majer, B.J., **Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge.** *Toxicology* (2004), Vol. 198, Issue 1-3, p. 315–28.
- Kojima, H. ; Nakatsubo, N. ; Kikuchi, K. ; Urano, Y. ; Higuchi, T. ; Tanaka, J. ; Kudo, Y. ; & Nagano, T., **Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA.** *Neuroreport* (1998), Vol. 9, Issue 15, p. 3345–8.
- Kolb, S. ; Mondésert, O. ; Goddard, M.-L. ; Jullien, D. ; Villoutreix, B.O. ; Ducommun, B. ; Garbay, C. ; & Braud, E., **Development of Novel Thiazolopyrimidines as CDC25B Phosphatase Inhibitors.** *ChemMedChem* (2009), Vol. 4, Issue 4, p. 633–648.
- Kristjansdottir, K. ; Rudolph, J. ; Kristja, K. ; & Carolina, N., **Cdc25 phosphatases and cancer.** *Chemistry & Biology* (2004), Vol. 11, Issue 8, p. 1043–1051.
- Lacroix, M. & Leclercq, G., **Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.** *Breast Cancer Res Treat* (2004), Vol. 83, Issue 3, p. 249–289.
- Lacy, A. & O’Kennedy, R., **Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer.** *Current pharmaceutical design* (2004), Vol. 10, Issue 30, p. 3797–811.
- Lake, B.G., **Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment.** *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* (1999), Vol. 37, Issue 4, p. 423–53.
- Lamson, D.W. & Plaza, S.M., **The anticancer effects of vitamin K.** *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* (2003), Vol. 8, Issue 3, p. 303–18.
- Lavecchia, A. ; Giovanni, C. Di ; & Novellino, E., **CDC25 phosphatase inhibitors: an update.** *Mini reviews in medicinal chemistry* (2012a), Vol. 12, Issue 1, p. 62–73.
- Lavecchia, A. ; Di Giovanni, C. ; & Novellino, E., **CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy.** *Current medicinal chemistry* (2009), Vol. 16, Issue 15, p. 1831–49.
- Lavecchia, A. ; Di Giovanni, C. ; & Novellino, E., **Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review.** *Expert opinion on therapeutic patents* (2010), Vol. 20, Issue 3, p. 405–25.
- Lavecchia, A. ; Di Giovanni, C. ; Pesapane, A. ; Montuori, N. ; Ragno, P. ; Martucci, N.M. ; Masullo, M. ; De Vendittis, E. ; & Novellino, E., **Discovery of New Inhibitors of Cdc25B Dual Specificity Phosphatases by Structure-Based Virtual Screening.** *Journal of medicinal chemistry* (2012b), Vol. 55, Issue 9, p. 4142–58.
- Lazo, J.S. ; Nemoto, K. ; Pestell, K.E. ; Cooley, K. ; Southwick, E.C. ; Mitchell, D.A. ; Furey, W. ; Gussio, R. ; Zaharevitz, D.W. ; Joo, B. ; & Wipf, P., **Identification of a potent and selective pharmacophore for Cdc25 dual specificity phosphatase inhibitors.** *Molecular Pharmacology* (2002), Vol. 61, Issue 4, p. 720–728.

- LeBel, C.P. ; Ischiropoulos, H. ; & Bondy, S.C., **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.** *Chemical Research in Toxicology* (1992), Vol. 5, Issue 2, p. 227–231.
- Liao, W.C. ; Wu, F.Y. ; & Wu, C.W., **Binary/ternary combined effects of vitamin K3 with other antitumor agents in nasopharyngeal carcinoma CG1 cells.** *International journal of oncology* (2000), Vol. 17, Issue 2, p. 323–8.
- Lincoln, A.J. ; Wickramasinghe, D. ; Stein, P. ; Schultz, R.M. ; Palko, M.E. ; De Miguel, M.P. ; Tessarollo, L. ; & Donovan, P.J., **Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation.** *Nature Genetics* (2002), Vol. 30, Issue 4, p. 446–449.
- Lindqvist, A. ; Källström, H. ; & Karlsson Rosenthal, C., **Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress.** *Journal of cell science* (2004), Vol. 117, Issue Pt 21, p. 4979–90.
- Lipshultz, S.E. ; Rifai, N. ; Dalton, V.M. ; Levy, D.E. ; Silverman, L.B. ; Lipsitz, S.R. ; Colan, S.D. ; Asselin, B.L. ; Barr, R.D. ; Clavell, L.A. ; Hurwitz, C.A. ; Moghrabi, A. ; Samson, Y. ; Schorin, M.A. ; Gelber, R.D. ; & Sallan, S.E., **The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia.** *The New England journal of medicine* (2004), Vol. 351, Issue 2, p. 145–53.
- Löffler, H. ; Syljuåsen, R.G. ; Bartkova, J. ; Worm, J. ; Lukas, J. ; & Bartek, J., **Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines.** *Oncogene* (2003), Vol. 22, Issue 50, p. 8063–71.
- Lopez-Gonzalez, J.S. ; Prado-Garcia, H. ; Aguilar-Cazares, D. ; Molina-Guarneros, J.A. ; Morales-Fuentes, J. ; & Mandoki, J.J., **Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines.** *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* (2004), Vol. 43, Issue 3, p. 275–83.
- Lown, J.W., **The mechanism of action of quinone antibiotics.** *Molecular and cellular biochemistry* (1983), Vol. 55, Issue 1, p. 17–40.
- Lown, J. ; Hanstock, C. ; Bradley, R. ; & Scraba, D., **Interactions of the antitumor agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy.** *Mol. Pharmacol.* (1984), Vol. 25, Issue 1, p. 178–184.
- MacKeigan, J.P. ; Murphy, L.O. ; & Blenis, J., **Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance.** *Nature cell biology* (2005), Vol. 7, Issue 6, p. 591–600.
- Mailand, N. ; Podtelejnikov, A. V ; Groth, A. ; Mann, M. ; Bartek, J. ; & Lukas, J., **Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability.** *The EMBO journal* (2002), Vol. 21, Issue 21, p. 5911–20.
- Manke, I.A. ; Nguyen, A. ; Lim, D. ; Stewart, M.Q. ; Elia, A.E.H. ; & Yaffe, M.B., **MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation.** *Molecular cell* (2005), Vol. 17, Issue 1, p. 37–48.

- Margolis, S.S. ; Perry, J.A. ; Weitzel, D.H. ; Freel, C.D. ; Yoshida, M. ; Haystead, T.A. ; & Kornbluth, S., **A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25**. *Molecular biology of the cell* (2006), Vol. 17, Issue 4, p. 1779–89.
- Matsuoka, S., **Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase**. *Science* (1998), Vol. 282, Issue 5395, p. 1893–1897.
- Medentsev, A.G. & Akimenko, V.K., **Naphthoquinone metabolites of the fungi**. *Phytochemistry* (1998), Vol. 47, Issue 6, p. 935–959.
- Meijer, L., **Le cycle de division cellulaire et sa régulation**. *Bulletin du cancer* (2006), Vol. Hors série, p. 41–53.
- Méjean & Leuret, **La cascade métastatique: angiogénèse et nouveaux concepts**. *Progrès en Urologie* (2008), Vol. Suppl 7, p. 156–166.
- Mersch-Sundermann, V. ; Knasmüller, S. ; Wu, X.-J. ; Darroudi, F. ; & Kassie, F., **Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents**. *Toxicology* (2004), Vol. 198, Issue 1-3, p. 329–40.
- Mitchell, J.S. ; Brinkley, D. ; & Haybittle, J.L., **Clinical trial of radiosensitizers, including synkavit and oxygen inhaled at atmospheric pressure**. *Acta radiologica: therapy, physics, biology* (1965), Vol. 3, Issue 5, p. 329–41.
- Mizoguchi, S. & Kim, K.H., **Expression of cdc25 phosphatases in the germ cells of the rat testis**. *Biology of Reproduction* (1997), Vol. 56, Issue 6, p. 1474–1481.
- Molinari, M. ; Mercurio, C. ; Dominguez, J. ; Goubin, F. ; & Draetta, G.F., **Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis**. *EMBO reports* (2000), Vol. 1, Issue 1, p. 71–9.
- Monks, T.J. ; Hanzlik, R.P. ; Cohen, G.M. ; Ross, D. ; & Graham, D.G., **Quinone chemistry and toxicity**. *Toxicology and Applied Pharmacology* (1992), Vol. 112, Issue 1, p. 2–16.
- Monks, T.J. & Jones, D.C., **The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers**. *Current drug metabolism* (2002), Vol. 3, Issue 4, p. 425–438.
- Montes, M. ; Braud, E. ; Miteva, M.A. ; Goddard, M.L. ; Mondesert, O. ; Kolb, S. ; Brun, M.P. ; Ducommun, B. ; Garbay, C. ; & Villoutreix, B.O., **Receptor-based virtual ligand screening for the identification of novel CDC25 phosphatase inhibitors**. *Journal of Chemical Information & Modeling* (2008), Vol. 48, Issue 1, p. 157–165.
- Mosmann, T., **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal of Immunological Methods* (1983), Vol. 65, Issue 1, p. 55–63.
- Münchberg, U. ; Anwar, A. ; Mecklenburg, S. ; & Jacob, C., **Polysulfides as biologically active ingredients of garlic**. *Organic & biomolecular chemistry* (2007), Vol. 5, Issue 10, p. 1505–18.
- Neidhart, J. ; Gochnour, D. ; Roach, R. ; Hoth, D. ; & Young, D., **A comparison of mitoxantrone and doxorubicin in breast cancer**. *J. Clin. Oncol.* (1986), Vol. 4, Issue 5, p. 672–677.

- Newman, D.J. & Cragg, G.M., **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010**. *Journal of natural products* (2012), Vol. 75, Issue 3, p. 311–335.
- Nishikawa, Y. ; Carr, B.I. ; Wang, M. ; Kar, S. ; Finn, F. ; Dowd, P. ; Zheng, Z.B. ; Kerns, J. ; & Naganathan, S., **Growth Inhibition of Hepatoma Cells Induced by Vitamin K and Its Analogs**. *Journal of Biological Chemistry* (1995), Vol. 270, Issue 47, p. 28304–28310.
- Nissen, E. ; Tanneberger, S. ; Weiss, H. ; & Bender, E., **[In vitro cultivation of vital tissue slices: a new variation of organ culture technics]**. *Biomed Biochim Acta* (1983), Vol. 42, Issue 7-8, p. 907–916.
- Noto, V. ; Taper, H.S. ; Jiang, Y.H. ; Janssens, J. ; Bonte, J. ; & De Loecker, W., **Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth in vitro. I. Synergism of combined vitamin C and K3 action**. *Cancer* (1989), Vol. 63, Issue 5, p. 901–6.
- Ollinger, K. & Brunmark, A., **Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes**. *J. Biol. Chem.* (1991), Vol. 266, Issue 32, p. 21496–21503.
- Osbuild, S. ; Brault, L. ; Battaglia, E. ; & Bagrel, D., **Resistance to cisplatin and adriamycin is associated with the inhibition of glutathione efflux in MCF-7-derived cells**. *Anticancer research* (2006), Vol. 26, Issue 5A, p. 35953–600.
- Papanikolaou, V. ; Iliopoulos, D. ; Dimou, I. ; Dubos, S. ; Tsougos, I. ; Theodorou, K. ; Kitsiou-Tzeli, S. ; & Tsezou, A., **The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells**. *International journal of oncology* (2009), Vol. 35, Issue 5, p. 1141–9.
- Peng, H. ; Zalkow, L.H. ; Abraham, R.T. ; & Powis, G., **Novel CDC25A phosphatase inhibitors from pyrolysis of 3-alpha-azido-B-homo-6-oxa-4-cholesten-7-one on silica gel**. *Journal of medicinal chemistry* (1998), Vol. 41, Issue 24, p. 4677–80.
- Pereg, Y. ; Liu, B.Y. ; O'Rourke, K.M. ; Sagolla, M. ; Dey, A. ; Komuves, L. ; French, D.M. ; & Dixit, V.M., **Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A**. *Nature Cell Biology* (2010), Vol. 12, Issue 4, p. 400–406.
- Pu, L. ; Amoscato, A.A. ; Bier, M.E. ; & Lazo, J.S., **Dual G1 and G2 phase inhibition by a novel, selective Cdc25 inhibitor 6-chloro-7-[corrected](2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione**. *Journal of Biological Chemistry* (2002), Vol. 277, Issue 49, p. 46877–46885.
- Rae, J.M. ; Creighton, C.J. ; Meck, J.M. ; Haddad, B.R. ; & Johnson, M.D., **MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research**. *Breast Cancer Res Treat* (2007), Vol. 104, Issue 1, p. 13–19.
- Rapport de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et du Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDC), **Principales causes de décès en 2009**. *Statistiques INSEE* (2009)
- Ray, D. ; Terao, Y. ; Fuhrken, P.G. ; Ma, Z.-Q. ; DeMayo, F.J. ; Christov, K. ; Heerema, N.A. ; Franks, R. ; Tsai, S.Y. ; Papoutsakis, E.T. ; & Kiyokawa, H., **Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability**. *Cancer research* (2007), Vol. 67, Issue 3, p. 984–91.

- Raymond, É., **Le concept de cible en cancérologie.** (2008)
- Reynolds, R.A. ; Yem, A.W. ; Wolfe, C.L. ; Deibel, M.R. ; Chidester, C.G. ; & Watenpaugh, K.D., **Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle.** *Journal of molecular biology* (1999), Vol. 293, Issue 3, p. 559–68.
- Romanova, A.S. ; Patudin, A. V. ; & Ban'kovskii, A.I., **Quinones of higher plants as possible therapeutic agents.** *Pharmaceutical Chemistry Journal* (1977), Vol. 11, Issue 7, p. 927–937.
- Rudolph, J., **Catalytic mechanism of Cdc25.** *Biochemistry* (2002), Vol. 41, Issue 49, p. 14613–14623.
- Rudolph, J., **Redox regulation of the Cdc25 phosphatases.** *Antioxidants & Redox Signaling* (2005), Vol. 7, Issue 5, p. 761–767.
- Rudolph, J., **Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism.** *Biochemistry* (2007), Vol. 46, Issue 12, p. 3595–3604.
- Russell, P. & Nurse, P., **cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast.** *Cell* (1986), Vol. 45, Issue 1, p. 145–153.
- Russell, W.M.S. & Bursch, R.L., **The Principles of Humane Experimental Technique.** (1959), p. 238 p.
- Russo, I.H. & Russo, J., **Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies.** *Environ Health Perspect* (1996), Vol. 104, Issue 9, p. 938–967.
- Saidu, N.E.B. ; Valente, S. ; Bana, E. ; Kirsch, G. ; Bagrel, D. ; & Montenarh, M., **Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells.** *Bioorganic & medicinal chemistry* (2012), Vol. 20, Issue 4, p. 1584–93.
- Sarkis, M. ; Tran, D.N. ; Kolb, S. ; Miteva, M.A. ; Villoutreix, B.O. ; Garbay, C. ; & Braud, E., **Design and synthesis of novel bis-thiazolone derivatives as micromolar CDC25 phosphatase inhibitors: effect of dimerisation on phosphatase inhibition.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters* (2012), Vol. 22, Issue 24, p. 7345–50.
- Sasaki, H. ; Yukiue, H. ; Kobayashi, Y. ; Tanahashi, M. ; Moriyama, S. ; Nakashima, Y. ; Fukai, I. ; Kiriya, M. ; Yamakawa, Y. ; & Fujii, Y., **Expression of the cdc25B gene as a prognosis marker in non-small cell lung cancer.** *Cancer letters* (2001), Vol. 173, Issue 2, p. 187–92.
- Sato, Y. ; Sasaki, H. ; Kondo, S. ; Fukai, I. ; Kiriya, M. ; Yamakawa, Y. ; & Fujii, Y., **Expression of the cdc25B mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma.** *Japanese journal of clinical oncology* (2001), Vol. 31, Issue 9, p. 428–31.
- Savitsky, P.A. & Finkel, T., **Redox regulation of Cdc25C.** *The Journal of biological chemistry* (2002), Vol. 277, Issue 23, p. 20535–40.
- Schorl, C. & Sedivy, J.M., **Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells.** *Methods (Duluth)* (2007), Vol. 41, Issue 2, p. 143–150.
- Schwartz, G.K. & Shah, M.A., **Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy.** *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* (2005), Vol. 23, Issue 36, p. 9408–21.

- Sexl, V. ; Diehl, J.A. ; Sherr, C.J. ; Ashmun, R. ; Beach, D. ; & Roussel, M.F., **A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2**. *Oncogene* (1999), Vol. 18, Issue 3, p. 573–82.
- Shen, C. ; Gu, M. ; Liang, D. ; Miao, L. ; Hu, L. ; Zheng, C. ; & Chen, J., **Establishment and characterization of three new human breast cancer cell lines derived from Chinese breast cancer tissues**. *Cancer Cell Int* (2009), Vol. 9, p. 2.
- Shi, Y. ; Moon, M. ; Dawood, S. ; McManus, B. ; & Liu, P.P., **Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity**. *Herz* (2011), Vol. 36, Issue 4, p. 296–305.
- Shimazawa, R. ; Gochomori, M. ; & Shirai, R., **Design and synthesis of novel Cdc25A-inhibitors having phosphate group as a hydrophilic residue**. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* (2004a), Vol. 14, Issue 16, p. 4339–42.
- Shimazawa, R. ; Suzuki, T. ; Dodo, K. ; & Shirai, R., **Design and synthesis of dysidiolide analogs from vitamin D3: novel class of Cdc25A inhibitors**. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* (2004b), Vol. 14, Issue 12, p. 3291–4.
- Sibille, E. ; Bana, E. ; Chaouni, W. ; Diederich, M. ; Bagrel, D. ; & Chaimbault, P., **Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases**. *Analytical Biochemistry* (2012), Vol. 430, Issue 1, p. 83–91.
- Sohn, J. ; Buhrman, G. ; & Rudolph, J., **Kinetic and structural studies of specific protein-protein interactions in substrate catalysis by Cdc25B phosphatase**. *Biochemistry* (2007), Vol. 46, Issue 3, p. 807–818.
- Sohn, J. ; Kiburz, B. ; Li, Z. ; Deng, L. ; Safi, A. ; Pirrung, M.C. ; & Rudolph, J., **Inhibition of Cdc25 phosphatases by indolyldihydroxyquinones**. *Journal of Medicinal Chemistry* (2003), Vol. 46, Issue 13, p. 2580–2588.
- Sohn, J. & Rudolph, J., **Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction**. *Biochemistry* (2003), Vol. 42, Issue 34, p. 10060–10070.
- Soule, H.D. ; Vazquez, J. ; Long, A. ; Albert, S. ; & Brennan, M., **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma**. *Journal of the National Cancer Institute* (1973), Vol. 51, Issue 5, p. 1409–1416.
- Spitkovsky, D. ; Jansen-Dürr, P. ; Karsenti, E. ; & Hoffman, I., **S-phase induction by adenovirus E1A requires activation of cdc25a tyrosine phosphatase**. *Oncogene* (1996), Vol. 12, Issue 12, p. 2549–54.
- Subik, K. ; Baxter, L. ; Strzepek, T. ; Costello, D. ; Crowley, P. ; Xing, L. ; Hung, M. ; Bonfiglio, T. ; Hicks, D. ; & Tang, P., **The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines**. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* (2010), Vol. 4, p. 35–41.
- Sui, M. ; Huang, Y. ; Park, B.H. ; Davidson, N.E. ; & Fan, W., **Estrogen receptor alpha mediates breast cancer cell resistance to paclitaxel through inhibition of apoptotic cell death**. *Cancer research* (2007), Vol. 67, Issue 11, p. 5337–44.
- Takahashi, M. ; Dodo, K. ; Sugimoto, Y. ; Aoyagi, Y. ; Yamada, Y. ; Hashimoto, Y. ; & Shirai, R., **Synthesis of the novel analogues of dysidiolide and their structure-**

- activity relationship.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2000), Vol. 10, Issue 22, p. 2571–2574.
- Talvinen, K. ; Tuikkala, J. ; Grönroos, J. ; Huhtinen, H. ; Kronqvist, P. ; Aittokallio, T. ; Nevalainen, O. ; Hiekkänen, H. ; Nevalainen, T. ; & Sundström, J., **Biochemical and clinical approaches in evaluating the prognosis of colon cancer.** *Anticancer research* , Vol. 26, Issue 6C, p. 4745–51.
- Tareen, B. ; Summers, J.L. ; Jamison, J.M. ; Neal, D.R. ; McGuire, K. ; Gerson, L. ; & Diokno, A., **A 12 Week, Open Label, Phase I/IIa Study Using Apatone® for the Treatment of Prostate Cancer Patients Who Have Failed Standard Therapy.** *International Journal of Medical Sciences* (2008), Vol. 5, Issue 2, p. 62–67.
- Tate, S., **Cell Cycle: Synchronization at various stages.** *Encyclopedia of life sciences* (2005)
- Taylor, I.W. ; Hodson, P.J. ; Green, M.D. ; & Sutherland, R.L., **Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells.** *Cancer research* (1983), Vol. 43, Issue 9, p. 4007–4010.
- Terasima, T. & Tolmach, L.J., **Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells.** *Experimental cell research* (1963), Vol. 30, p. 344–362.
- Thackery, E., **The Gale Encyclopedia of cancer.** Thomson Le (2002)
- Uchida, S. ; Ohtsubo, M. ; Shimura, M. ; Hirata, M. ; Nakagama, H. ; Matsunaga, T. ; Yoshida, M. ; Ishizaka, Y. ; & Yamashita, K., **Nuclear export signal in CDC25B.** *Biochemical and biophysical research communications* (2004), Vol. 316, Issue 1, p. 226–32.
- Vaira, V. ; Fedele, G. ; Pyne, S. ; Fasoli, E. ; Zadra, G. ; Bailey, D. ; Snyder, E. ; Favarsani, A. ; Coggi, G. ; Flavin, R. ; Bosari, S. ; & Loda, M., **Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2010), Vol. 107, Issue 18, p. 8352–6.
- Valente, S. ; Bana, E. ; Viry, E. ; Bagrel, D. ; & Kirsch, G., **Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (2010), Vol. 20, Issue 19, p. 5827–5830.
- Vigo, E. ; Müller, H. ; Prosperini, E. ; Hateboer, G. ; Cartwright, P. ; Moroni, M.C. ; & Helin, K., **CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase.** *Molecular and cellular biology* (1999), Vol. 19, Issue 9, p. 6379–95.
- Vintonyak, V. V ; Waldmann, H. ; & Rauh, D., **Using small molecules to target protein phosphatases.** *Bioorganic & medicinal chemistry* (2011), Vol. 19, Issue 7, p. 2145–55.
- Viry, E. ; Anwar, A. ; Kirsch, G. ; Jacob, C. ; Diederich, M. ; & Bagrel, D., **Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases.** *International Journal of Oncology* (2011), Vol. 38, Issue 4, p. 1103–1111.

- Van Vugt, M.A.T.M. ; Brás, A. ; & Medema, R.H., **Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells.** *Molecular cell* (2004), Vol. 15, Issue 5, p. 799–811.
- Wang, R. ; He, G. ; Nelman-Gonzalez, M. ; Ashorn, C.L. ; Gallick, G.E. ; Stukenberg, P.T. ; Kirschner, M.W. ; & Kuang, J., **Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition.** *Cell* (2007), Vol. 128, Issue 6, p. 1119–32.
- Wang, S.C. ; Lin, S.H. ; Su, L.K. ; & Hung, M.C., **Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle.** *Biochemical and biophysical research communications* (1997), Vol. 234, Issue 1, p. 247–251.
- Wang, Z. ; Trope, C.G. ; Flørenes, V.A. ; Suo, Z. ; Nesland, J.M. ; & Holm, R., **Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes.** *BMC cancer* (2010), Vol. 10, p. 233.
- Waxman, S. & Bruckner, H., **The enhancement of 5-fluorouracil antimetabolic activity by leucovorin, menadione and α -tocopherol.** *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* (1982), Vol. 18, Issue 7, p. 685–692.
- Weber, G. ; Wagener, Y. ; & Hansen-Koenig, D., **La mortalité au Luxembourg: évolution historique, situation actuelle et perspectives futures du système national de surveillance de la mortalité.** *Statistiques du Ministère de la santé du Grand-Duché de Luxembourg* (2010)
- Wegener, S., **Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C.** *European Journal of Cell Biology* (2000), Vol. 79, Issue 11, p. 810–815.
- Wegener, S. ; Hampe, W. ; Herrmann, D. ; & Schaller, H.C., **Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C.** *European Journal of Cell Biology* (2000), Vol. 79, Issue 11, p. 810–815.
- Wei Gang, H. ; Ying Yan, J. ; Jia, L. ; Jing Ya, L. ; Wei, L. ; & Jun Chao, C., **Synthesis and biological evaluation of (-)-cryptotanshinone and its simplified analogues as potent CDC25 inhibitors.** *Tetrahedron* , Vol. 61, Issue 7
- Weigel, M.T. & Dowsett, M., **Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction.** *Endocrine-related cancer* (2010), Vol. 17, Issue 4, p. R245–62.
- Westerink, W.M.A. & Schoonen, W.G.E.J., **Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* (2007), Vol. 21, Issue 8, p. 1592–602.
- Whelan, R.D. ; Waring, C.J. ; Wolf, C.R. ; Hayes, J.D. ; Hosking, L.K. ; & Hill, B.T., **Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro.** *International Journal of Cancer* (1992), Vol. 52, Issue 2, p. 241–246.
- Woeller, C.F. ; Anderson, D.D. ; Szebenyi, D.M.E. ; & Stover, P.J., **Evidence for small ubiquitin-like modifier-dependent nuclear import of the thymidylate biosynthesis pathway.** *The Journal of biological chemistry* (2007), Vol. 282, Issue 24, p. 17623–17631.

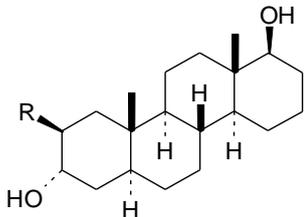
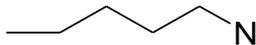
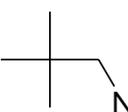
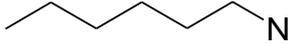
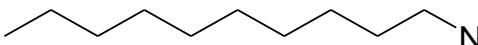
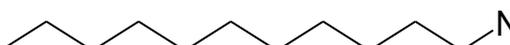
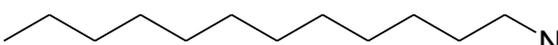
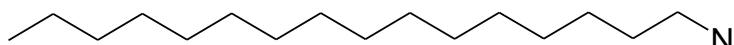
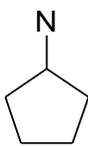
- Woo, E.S. ; Rice, R.L. ; & Lazo, J.S., **Cell cycle dependent subcellular distribution of Cdc25B subtypes.** *Oncogene* (1999), Vol. 18, Issue 17, p. 2770–6.
- Wu, F.Y. ; Liao, W.C. ; & Chang, H.M., **Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays.** *Life sciences* (1993), Vol. 52, Issue 22, p. 1797–804.
- Wu, F.Y.-H. & Sun, T.-P., **Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase.** *European Journal of Cancer* (1999), Vol. 35, Issue 9, p. 1388–1393.
- Ye, D. ; Zhang, Y. ; Wang, F. ; Zheng, M. ; Zhang, X. ; Luo, X. ; Shen, X. ; Jiang, H. ; & Liu, H., **Novel thiophene derivatives as PTP1B inhibitors with selectivity and cellular activity.** *Bioorganic & medicinal chemistry* (2010), Vol. 18, Issue 5, p. 1773–82.
- Young, L.M. & Pagano, M., **Cdc25 phosphatases: differential regulation by ubiquitin-mediated proteolysis.** *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* (2010), Vol. 9, Issue 23, p. 4613–4.
- Zhao, Y. ; Haccard, O. ; Wang, R. ; Yu, J. ; Kuang, J. ; Jesus, C. ; & Goldberg, M.L., **Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase.** *Molecular biology of the cell* (2008), Vol. 19, Issue 4, p. 1317–27.
- Zwicker, J. ; Lucibello, F.C. ; Wolfrain, L. a ; Gross, C. ; Truss, M. ; Engeland, K. ; Muller, R. ; & Müller, R., **Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression.** *Embo J* (1995), Vol. 14, Issue 18, p. 4514–4522.

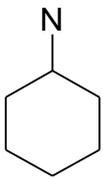
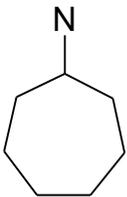
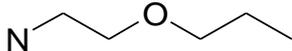
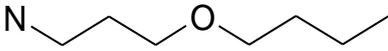
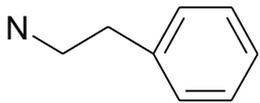
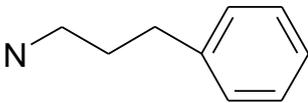
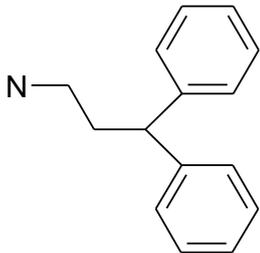
ANNEXES

Annexe I

Dérivés stéroïdiens (Equipe du P^F Poirier, Canada)

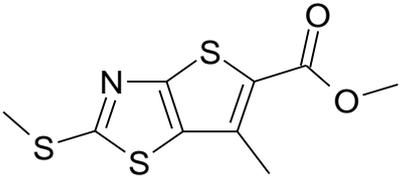
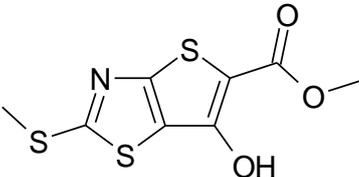
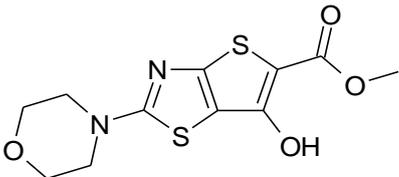
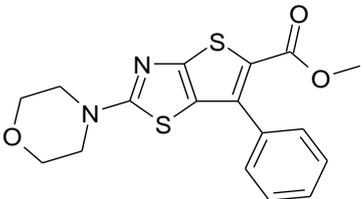
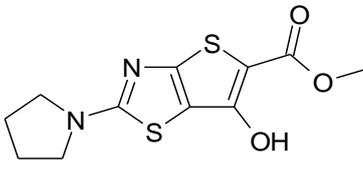
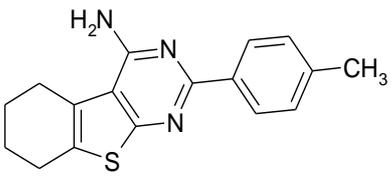
Composé	Structure	Activité résiduelle de CDC25 à la concentration de 100 µM (en % par rapport au contrôle DMSO)		
		CDC25 A	CDC25 B	CDC25 C
ADT	Confidentielle	98 ±4	89 ±9	97 ±2
HY	Confidentielle	103 ±5	94 ±4	93 ±9
3a-diol	Confidentielle	99 ±2	93 ±9	90 ±8
EM-2048	Confidentielle	111 ±4	94 ±1	97 ±6
RM	Confidentielle	96 ±5	68 ±6	71 ±12
A3	Confidentielle	104 ±4	85 ±8	83 ±7
A8	Confidentielle	100 ±3	89 ±1	101 ±2
A18	Confidentielle	97 ±5	102 ±1	84 ±0
B8	Confidentielle	91 ±5	96 ±6	81 ±0
B18	Confidentielle	93 ±9	89 ±6	74 ±1
C8	Confidentielle	98 ±4	94 ±1	95 ±5
C33	Confidentielle	99 ±7	93 ±3	98 ±2
C48	Confidentielle	94 ±3	84 ±8	73 ±3
C77	Confidentielle	86 ±7	85 ±4	72 ±8
QC21	Confidentielle	89 ±11	98 ±0	83 ±13

	 <p>Avec R=</p>			
QC28		85 ±2	79 ±2	110 ±2
QC29		80 ±10	79 ±2	97 ±1
QC30		95 ±3	100 ±2	97 ±2
QC32		102 ±2	99 ±5	97 ±8
QC36		109 ±1	103 ±0	64 ±9
QC37		115 ±14	98 ±1	84 ±3
QC38		98 ±2	90 ±1	92 ±2
QC39		89 ±2	97 ±0	103 ±1
QC40		73 ±1	100 ±1	96 ±0

QC41		98 ±2	91 ±0	98 ±0
QC42		78 ±2	100 ±2	98 ±2
QC43		86 ±10	100 ±2	109 ±1
QC44		98 ±3	100 ±2	105 ±2
QC45		113 ±14	100 ±1	106 ±3
QC46		100 ±2	100 ±1	109 ±2
QC47		80 ±6	85 ±4	39 ±6
QC78	N-(C ₉ H ₁₉) ₂	101 ±3	97 ±8	97 ±5

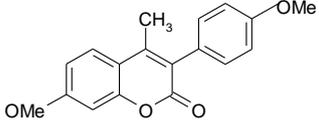
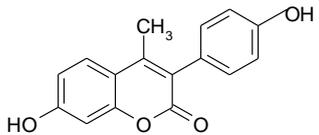
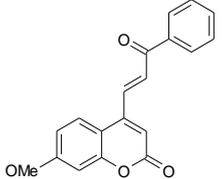
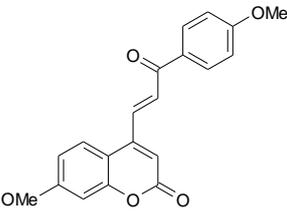
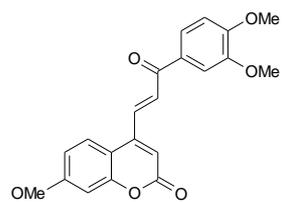
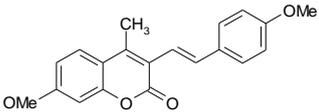
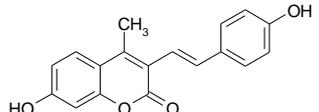
Annexe II

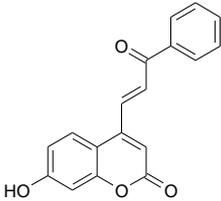
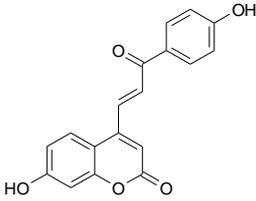
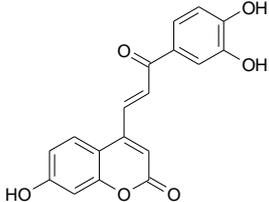
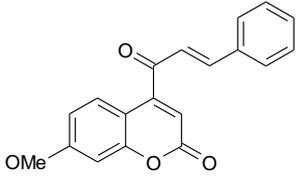
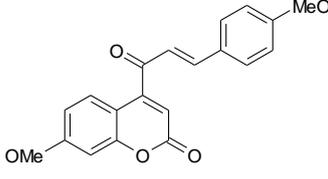
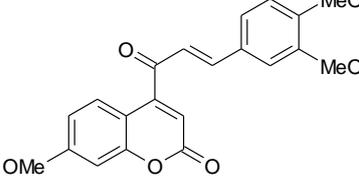
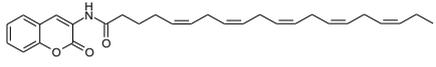
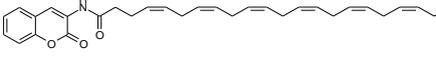
Dérivés thiophéniques (Equipe du P^r Kirsch – Z. Xu)

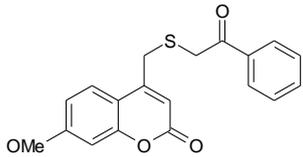
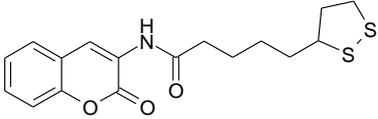
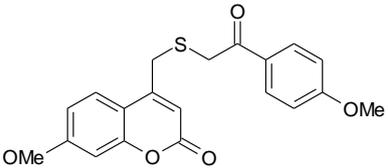
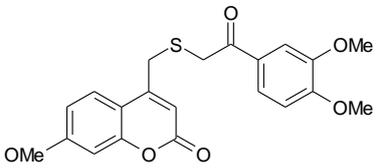
Composé	Structure	Activité résiduelle de CDC25 à la concentration de 100 µM (en % par rapport au contrôle DMSO)			CI ₅₀ (µM)	
		CDC25 A	CDC25 B	CDC25 C	CDC25 A	CDC25 C
ZX-280		16,8±0,3	67,9±2,2	54,5±2,1	78±5	ND
ZX-277		41,5±1,1	63,5±1,6	19,6±4,4	ND	29±4
ZX-246		71,0±1,1	95,2±2,1	87,8±8,6	ND	ND
ZX-247		62,7±0,5	83,4±7,5	26,2±1,6	ND	37±5
ZX-252		82,6±0,5	95,0±2,9	103,2±8,7	ND	ND
BC33		22,5±9,5	74,3±1,6	48,5±13,2	ND	ND

Annexe III

Dérivés coumariniques (Equipe du P^r Kirsch – S. Valente)

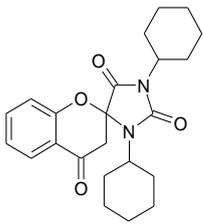
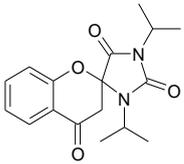
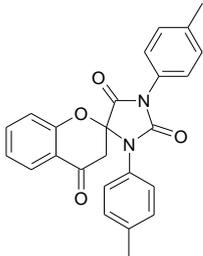
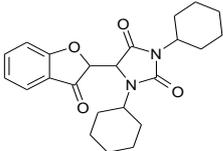
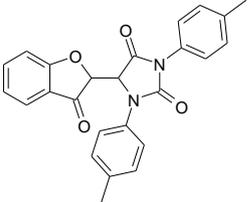
Composé	Structure	Activité résiduelle de CDC25 à la concentration de 100 μ M (en % par rapport au contrôle DMSO)			CI ₅₀ de CDC25 (μ M)		
		CDC25 A	CDC25 B	CDC25 C	CDC25 A	CDC25 B	CDC25 C
SV1		79,5 \pm 11,0	101 \pm 4,4	82,1 \pm 0,8	ND	ND	ND
SV2		78 \pm 10,4	105,7 \pm 3,8	111,9 \pm 2,3	ND	ND	ND
SV3		5,8 \pm 7,3	65 \pm 5,5	20,7 \pm 2,8	27 \pm 3	>100	49 \pm 7
SV4		33,6 \pm 3,8	78,7 \pm 4,2	35,2 \pm 4,1	70 \pm 8	>100	47 \pm 7
SV5		38,5 \pm 3,0	93,5 \pm 6,5	31 \pm 2,0	78 \pm 9	>100	67 \pm 9
SV6		54,7 \pm 7,6	98,1 \pm 6,4	51,6 \pm 1,3	ND	ND	ND
SV7		72,5 \pm 1,6	91,5 \pm 3,1	84,4 \pm 6,9	ND	ND	ND

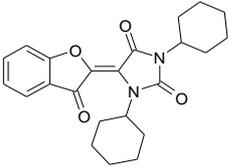
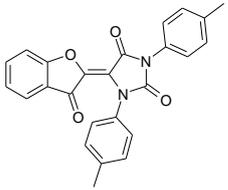
SV8		5,7 ±7,9	76,8 ±10,5	5,8 ±7,6	28 ±4	>100	26 ±4
SV9		45 ±10,1	90,8 ±7,0	76,1 ±10,3	96 ±8	>100	>100
SV10		31,3 ±4,9	99,9 ±5,4	56,3 ±10,5	62 ±9	>100	72 ±9
SV12		55 ±8,0	100,1 ±12,8	68,7 ±3,5	ND	ND	ND
SV13		99,8 ±8,3	98,6 ±7,2	95,2 ±2,3	ND	ND	ND
SV14		92,6 ±9,9	90,9 ±2,5	101,9 ±6,6	ND	ND	ND
SV15		41,6 ±6,8	72,7 ±3,3	41 ±7,2	65 ±4	>100	70 ±5
SV16		6,2 ±3,8	14,5 ±2,6	13,3 ±4,6	39 ±5	>100	20 ±3

SV17		98,5 ±9,7	83,9 ±10,2	78,8 ±6,8	ND	ND	ND
SV18		44,8 ±1,7	120,5 ±8,0	71,2 ±8,9	ND	ND	ND
SV19		73,3 ±8,6	118,4 ±2,8	72,1 ±3,0	ND	ND	ND
SV20		60,2 ±4,9	108,8 ±3,9	73,8 ±4,4	ND	ND	ND

Annexe IV

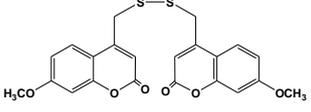
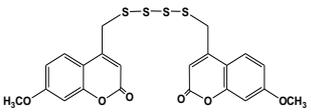
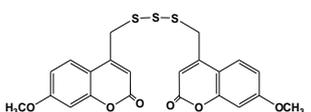
Dérivés imidazoles (Equipe du P^r Silva – O. Talhi)

Compound	Structure	Inhibition de CDC25 A à la concentration de 100 μ M (% du contrôle)	
		CDC25 A	CDC25 C
OT1		88,2 \pm 7	98,4 \pm 3
OT2		90,1 \pm 2	96,8 \pm 1
OT3		83,9 \pm 4	90,6 \pm 11
OT17		59,7 \pm 1	59,7 \pm 13
OT22		85,2 \pm 7	82,2 \pm 8

OT25		79,5 ±6	24 ±7
OT27		58,4 ±5	23,9 ±1

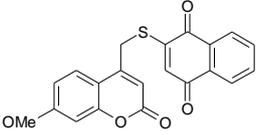
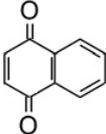
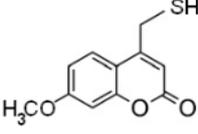
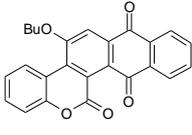
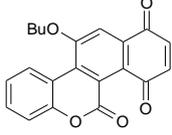
Annexe V

Dérivés coumariniques polysoufrés (Equipe du P^r Kirsch – S. Valente)

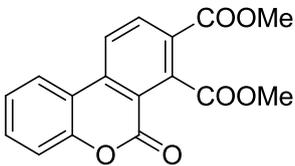
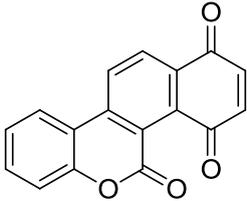
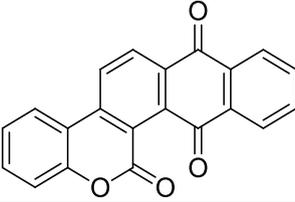
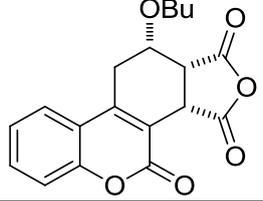
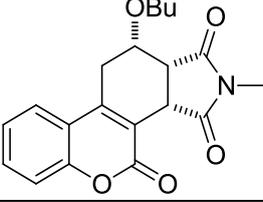
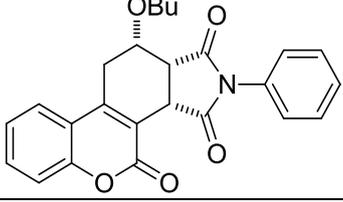
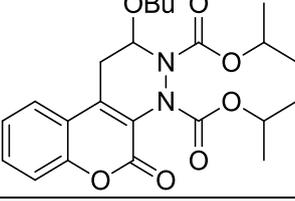
Composé	Structure	Activité résiduelle de CDC25 à la concentration de 100 μ M (en % par rapport au contrôle DMSO)			CI ₅₀ (μ M)		
		CDC25A	CDC25B	CDC25C	CDC25A	CDC25B	CDC25C
SV25		58 \pm 5	95 \pm 5	54 \pm 3	>100	>100	>100
SV28		25 \pm 3	72 \pm 7	19 \pm 1,8	28 \pm 3	>100	18 \pm 3
SV29		42 \pm 4	94 \pm 8	37 \pm 6,1	76 \pm 6	>100	100 \pm 12

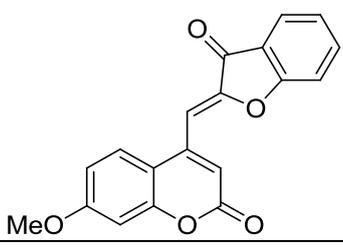
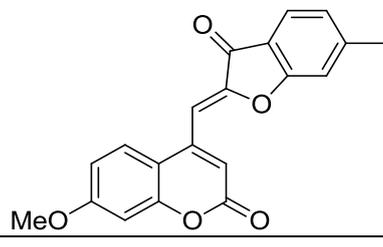
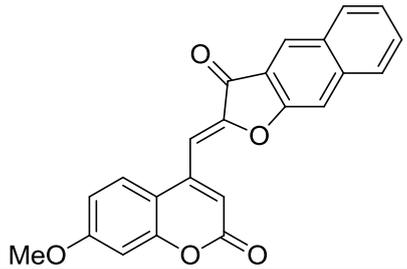
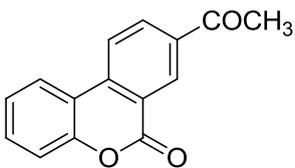
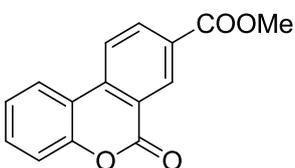
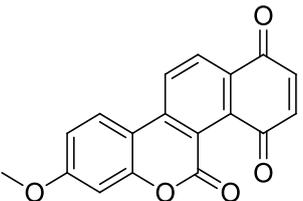
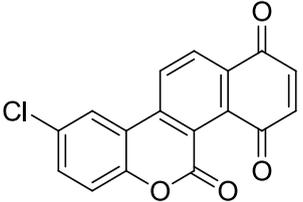
Annexe VI

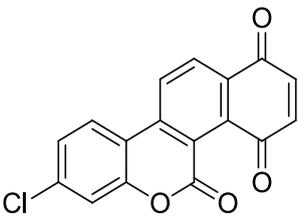
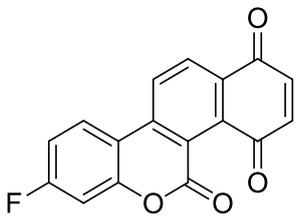
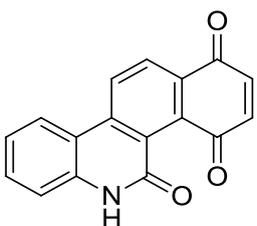
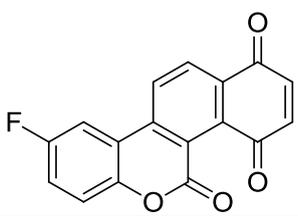
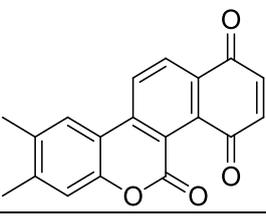
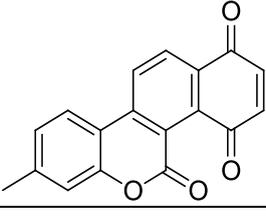
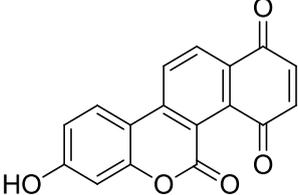
Dérivés coumariniques-quinonoïques (Equipe du P^f Kirsch – S. Valente, Z. Xu) Première série : SV

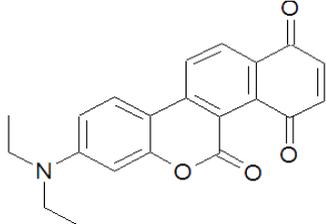
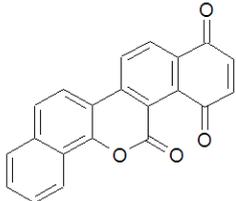
Composé	Structure	Activité résiduelle de CDC25 à la concentration de 100 μ M (en % par rapport au contrôle DMSO)			CI ₅₀ (μ M)		
		CDC25A	CDC25B	CDC25C	CDC25A	CDC25B	CDC25C
SV37		3,6 \pm 1,8	15,7 \pm 1,8	0 \pm 5,3	4.3 \pm 0.1	9.1 \pm 0.6	0.9 \pm 0.1
SV37 Sous-partie : naphthoquinone		0 \pm 2,5	0,4 \pm 4,7	0 \pm 5,5	ND	ND	ND
SV37 Sous-partie : 7- methoxycoumarine- 4-thiol		98,54 \pm 6,6	91,1 \pm 5,2	99,8 \pm 8,3	ND	ND	ND
SV58		66 \pm 12	83 \pm 4	63 \pm 4	ND	ND	ND
SV59		13 \pm 2	24 \pm 7	4 \pm 2	13 \pm 0.8	50 \pm 3.7	2,2 \pm 0.8

Seconde série : XU

Composé	Structure	Activité résiduelle de CDC25 à la concentration de 25 μM (en % par rapport au contrôle DMSO)		CI_{50} (μM)	
		CDC25A	CDC25C	CDC25A	CDC25C
XU01		94,77 \pm 1,2	97,83 \pm 3,5	>100	>100
XU02		0 \pm 0,7	0,40 \pm 1,4	2,1 \pm 0,2	0,86 \pm 0,1
XU03		46,85 \pm 4,1	57,99 \pm 6,4	24 \pm 0,3	>25
XU04		60,27 \pm 4,7	92,74 \pm 2,1	>25	>25
XU05		85,99 \pm 1,8	101,78 \pm 1,1	>25	>25
XU06		72,17 \pm 3,3	86,88 \pm 1,5	>100	>100
XU07		100,77 \pm 4,5	92,59 \pm 3,6	>100	>100

XU08		78,18 ±2,1	70,25 ±1,4	>50	>50
XU09		76,57 ±0,5	73,98 ±1,0	>25	>25
XU10		72,66 ±4,2	62,31 ±0,5	>25	>25
XU11		81,56 ±3,3	90,95 ±0,5	>100	>100
XU12		76,52 ±6,8	83,14 ±0,9	>100	>100
XU20		2,29 ±4,3	0 ±1,1	2,88 ±0,1	0,98 ±0,2
XU21		0,18 ±2,1	0 ±0,9	2,57 ±0,2	1,44 ±0,2

XU22		6,61 ±0,9	0 ±0,7	1,61±0,4	0,77 ±0,1
XU23		0,66 ±0,8	0 ±0,9	2,19 ±0,2	0,69 ±0,02
XU24		14,31 ±1,2	11,57 ±0,2	7,73 ±0,9	3,64 ±0,1
XU25		2,76 ±0,6	0 ±1,0	3,5 ±0,2	0,4 ±0,1
XU26		9,03 ±0,8	2,87 ±0,5	4,3 ±1,0	0,7 ±0,1
XU27		0,92 ±0,3	0 ±1,4	2,9 ±1,2	1,0 ±0,2
XU28		0,78 ±1,8	0 ±1,7	6,6 ±1,4	0,8 ±0,1

XU29		$0 \pm 1,4$	$4 \pm 3,1$	$1,2 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
XU30		$0 \pm 2,8$	$0 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,01$

PUBLICATIONS



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases

Sergio Valente, Emilie Bana, Elodie Viry, Denyse Bagrel, Gilbert Kirsch*

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, Institut Jean Barriol, Université Paul Verlaine, FR CNRS 2843, 1 Boulevard Arago, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2010

Revised 28 July 2010

Available online 3 August 2010

Keywords:

Cdc25 phosphatases

Coumarins

Chalcones

Heck coupling

ABSTRACT

The cell division cycle 25 (Cdc25) family of proteins are dual specificity phosphatases that activate cyclin-dependent kinase (CDK) complexes, which in turn regulate progression through the cell division cycle. Overexpression of Cdc25 proteins has been reported in a wide variety of cancers; their inhibition may thus represent a novel approach for the development of anticancer therapeutics. Herein we report new coumarin-based scaffolds endowed with a selective inhibition against Cdc25A and Cdc25C, being **6a** and **6d** the most efficient inhibitors and worthy of further investigation as anticancer agents.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cell division cycle 25 (Cdc25) phosphatases are key actors in eukaryotic cell cycle control. The three human Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, and Cdc25C) are dual specificity phosphatases responsible for dephosphorylating Cdk/cyclins on pThr14 and/or pTyr15 residues, so activating Cdk/cyclin during normal cell cycle progression.¹ So far, Cdk–cyclin complexes are the only known substrates for Cdc25 phosphatases.²

Cdc25A seems to be implicated in the control of G1/S and G2/M transitions, whereas Cdc25B and Cdc25C seems to be more implicated in regulation of G2/M transition.³ The transitions between each cell cycle phase must be strictly regulated in order to maintain genomic stability. Over activity of these phosphatases is associated with checkpoint bypass and upset this genomic equilibrium.¹ Thus, experimental data show that overexpression of Cdc25B (but not Cdc25C) rapidly pushes S or G2 phase cells into mitosis with incompletely replicated DNA⁴ and overexpression of Cdc25A can induce mitotic events.^{3,5,6} Cdc25 phosphatases are also central targets and regulators of the G2/M checkpoint mechanisms activated in response to DNA injury including ATM/ATR pathways.⁷

Cdc25 phosphatases can thus serve as central regulators of the cell cycle with the role of driving each state of cell division. The expression and activity of these enzymes are finely regulated by multiple mechanisms including post-translational modifications, interactions with regulatory partners, control of their intracellular localization (all Cdc25s shuttle between the nucleus and the cytoplasm during the cell cycle⁶), and cell cycle-regulated degradation. Accordingly, increased expression of Cdc25A and Cdc25B is found

in many high-grade tumors and is correlated with poor prognosis in human cancers.⁸ Cell division cycle 25 proteins are reported to be overexpressed in primary tumor samples from patients with breast, prostate, ovarian, endometrial, colorectal, oesophageal, thyroid, gastric and hepatocellular cancers, glioma, neuroblastoma or non-Hodgkin lymphoma.¹ Until now, a lot of inhibitors have been tested for Cdc25 inhibition.^{9–11} Three non-quinone and quinone based compounds (BN 82002, BN82685 and IRC083864) are reported as active on, respectively HeLa, miaPaCa2 and LNCap cell lines with an *in vivo* activity in xenografted mice^{12–14} (Fig. 1).

Nevertheless, in 2009 a new class of thiazolopyrimidines (Fig. 1), like Cdc25B inhibitors were disclosed by parallel click

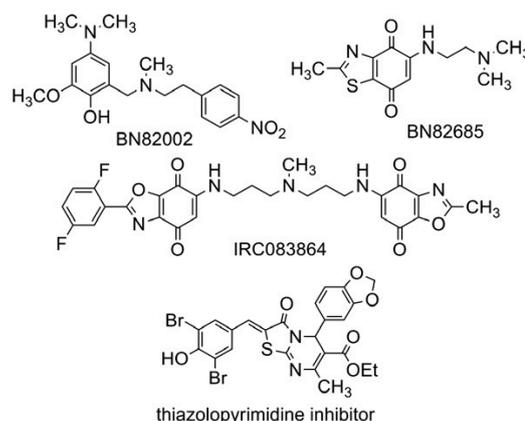


Figure 1. Cdc25 phosphatases inhibitors active in cultured cells.

* Corresponding author. Tel.: +33 (3) 87315295; fax: +33 (3) 87325801.
E-mail address: kirsch@univ-metz.fr (G. Kirsch).

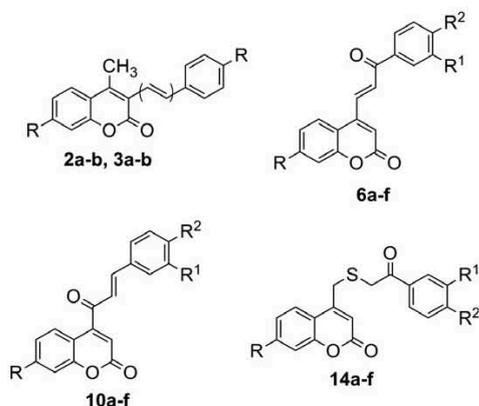
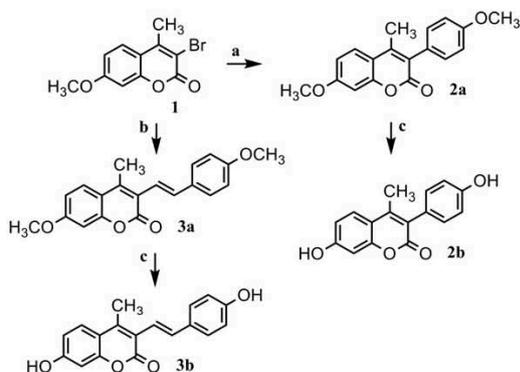


Figure 2. Novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases.

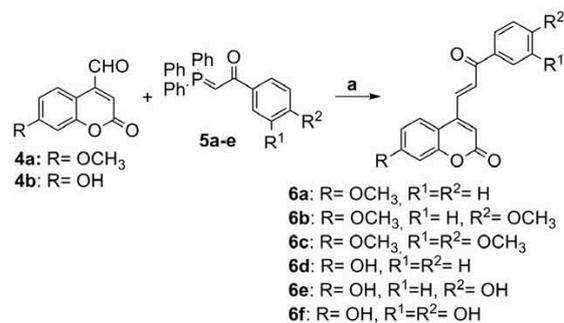
chemistry and in situ screening and shown to display cytotoxic properties against HeLa cells¹⁵ and against prostatic LNCaP cells.¹⁶ Furthermore, recently several flavonolignan compounds isolated from silymarin showed a strong cell cycle arrest in PC3 cells and differential effect of these compounds on the levels of some cell cycle regulators-cyclins among these Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C.¹⁷ Finally it has been reported in *Caenorhabditis elegans* CDC-25.1 was inhibited by flavones.¹⁸ So, prompted by these findings and by the structural basis of the flavone nucleus, and with the attempt to identify new scaffolds able to inhibit Cdc25 phosphatases, we developed the synthesis of novel coumarin-based small molecules (Fig. 2) and we tested such derivatives against all of three Cdc25 isoenzymes (Fig. 2).

Our approach started with the introduction of 4-methoxy(hydroxy)phenyl and 4-methoxy(hydroxy)styryl groups at C3 position of the 4-methylcoumarin (compounds 2a–b, 3a–b). Compound 1¹⁹ underwent a Suzuki coupling reacting with 4-methoxyphenylboronic acid, palladium acetate, potassium hydrogen phosphate to afford compound 2a,²⁰ whereas, through Heck coupling reacting with 4-methoxy styrene and palladium chloride, gave compound 3a. Finally, carrying out onto the methoxy derivatives 2a and 3a a cleavage with boron tribromide 2b²⁰ and 3b, respectively, were obtained (Scheme 1).

The synthesis of the chalcone-coumarin (benzoylvinyl coumarin) derivatives 6a–f was performed through Wittig condensation between aldehydes 4a²¹ or 4b²² and phosphoranes 5a–e, previously prepared according to methods described in literature.²³



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) *p*-MeO-Ph-boronic acid, K₂HPO₄, Pd(OAc)₂, MeOH, 60 °C, 2 h, 85%; (b) *p*-MeO-styrene, PdCl₂, Et₃N, reflux, 12 h, 78%; (c) BBr₃, CH₂Cl₂, –20 °C, overnight, 70%.

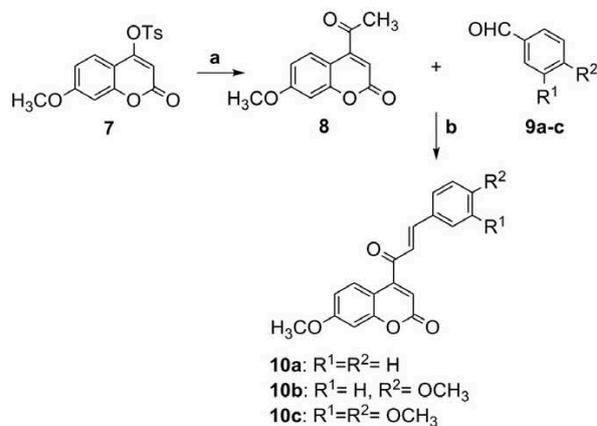


Scheme 2. Reagents and conditions: (a) dry DMF, 0 °C, 1 h, 85–90%.

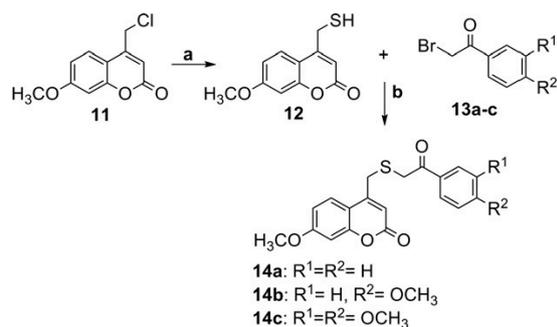
(Scheme 2) The reverse chalcone-coumarin (cinnamoyl coumarin) 10a–c were prepared with a different synthetic approach: indeed, through α -carbon regioselective Heck coupling onto the 4-tosylate intermediate 7²⁴ as reported,²⁵ followed by acidic hydrolysis, 4-acetylcoumarin 8²⁶ was provided. The final compounds 10a–c were furnished by aldolic condensation of 8 with the opportune aldehydes 9a–c (Scheme 3).

At last we investigated the introduction of a sulfur atom between coumarin and benzoyl moieties, as shown by derivatives 14a–c, which were synthesized reacting 4-chloromethylcoumarin 11, prepared according to the method previously by us reported,²⁷ with thiourea and, after hydrolysis, yielded 4-mercaptomethylcoumarin 12. Finally 12 was converted to 14a–c through alkylation with the opportune ω -bromoacetophenones 13a–c (Scheme 4).

Human glutathione-S-transferase (GST)-Cdc25 recombinant enzymes were used to evaluate the inhibitory potential of compounds. Each isoenzyme was prepared as previously described.^{10,28} Briefly, the GST-tagged Cdc25s were expressed in a bacterial expression system via an IPTG induction. After lysis of bacteria, purification on GSH-Agarose column allowed to obtain pure GST-Cdc25 recombinant proteins. Recombinant Cdc25A and Cdc25 C are full length enzymes whereas Cdc25 B is truncated one (active site only). The enzymatic activity was measured by a dephosphorylation assay with 3-O-methyl fluorescein phosphate as described.²⁹ The results are expressed as percentage of inhibition of Cdc25 phosphatase activity in presence of the tested compounds. All compounds were tested at 100 μ M final concentration, except for BN82002 (Sigma-Aldrich), used as reference drug,



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) 1) *n*-butyl vinyl ether, DIPEA, DPPF, Pd₂(dba)₃, dioxane, 85 °C, 22 h, 75% (2) 2 N HCl, EtOH, rt, 3 h, 80%; (b) piperidine, glacial acetic acid, EtOH, 70 °C, 3 h, 80–85%.



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) (1) NH₂CSNH₂, EtOH/Et₂O, reflux, overnight, (2) 2 N NaOH, rt, 10 min, (3) 2 N HCl, rt, 75%; (b) KOH, EtOH, rt, 15 min, 85–90%.

which was tested at 10 μM (Table 1). Inhibition values percentage of all tested derivatives are reported in Table 1.

With the exception of compounds **6a**, **6b**, **6d** and **14a** displaying a weak inhibition of Cdc25B (35.0%, 21.3%, 23.2% and 16.1%, respectively), these derivatives did not show affinity for recombinant Cdc25 B. This result can be explained by the fact that this recombinant protein is truncated and limited to its active site. Considering first series of compounds (**2a–b**, **3a–b**), 3-phenyl derivatives (**2a**) inhibited feebly Cdc25 A and Cdc25 C or showed selectivity of inhibition regarding Cdc25A (**2b**); when we introduced a vinyl group between phenyl ring and coumarin ring the capability of inhibition increased twofold against Cdc25A (from 20.5% (**2a**) to 45.3% (**3a**)) and almost threefold against Cdc25 C (from 17.9% (**2a**) to 48.4% (**3a**)).

In series of compounds **6**, the introduction of benzoylvinyl moiety at C4 position of coumarin nucleus (chalcone–coumarin **6a–f**) gave us an interesting increase of inhibition against both Cdc25A and Cdc25 C up to 94.2% or 79.3% (**6a**) and 94.3% or 94.2% (**6d**), respectively, being compounds **6a** and **6d** the most potent inhibitors in this assay. The substitution of the methoxy group with hydroxy group onto the coumarin moiety didn't improve the potency, nevertheless it provided an higher inhibition for Cdc25 C (from 79.3% (**6a**) to 94.2% (**6d**)). The addition of just one or two methoxy

Table 1
Inhibitory activity (expressed as percentage of inhibition) of compounds **2a–b**, **3a–b**, **6a–f**, **10a–c** and **14a–c** tested at 100 μM against Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C phosphatases^a

Compds ³⁰	Cdc25A	Phosphatases Cdc25B	Cdc25C
2a	20.5 (±11.0)	ND	17.9 (±0.8)
2b	22.0 (±10.4)	ND	ND
3a	45.3 (±7.6)	ND	48.4 (±1.3)
3b	27.5 (±1.6)	8.5 (±3.1)	15.6 (±6.9)
6a	94.2 (±7.3)	35.0 (±5.5)	79.3 (±2.8)
6b	66.4 (±3.8)	21.3 (±4.2)	64.8 (±4.1)
6c	61.5 (±3.0)	6.5 (±4.5)	69 (±2)
6d	94.3 (±7.9)	23.2 (±10.5)	94.2 (±7.6)
6e	55.0 (±10.1)	9.2 (±7.0)	23.9 (±10.3)
6f	68.7 (±4.9)	ND	43.7 (±10.5)
10a	45.0 (±8.0)	ND	31.3 (±3.5)
10b	ND	ND	4.8 (±2.3)
10c	7.4 (±9.9)	9.1 (±2.5)	ND
14a	ND	16.1 (±3.3)	21.2 (±7.2)
14b	26.7 (±3.8)	ND	27.9 (±4.5)
14c	39.8 (±9.7)	ND	26.2 (±6.8)
BN82002	87.9 (±4.6)	86.3 (±2.1)	92.9 (±9.6)

ND: not detectable

^a Values are means of three independent experiments, standard deviation is given in round brackets.

Table 2
Inhibitory activity (IC₅₀ values) against Cdc25A and against Cdc25C phosphatases of compounds **6a–f**^a

Compds	Phosphatases (IC ₅₀ , μM)	
	Cdc25A	Cdc25C
6a	27	49
6b	70	47
6c	78	67
6d	28	26
6e	96	>150
6f	62	72

^a The IC₅₀ values were determined by testing seven different concentrations of compounds (from 0 to 150 μM). For each compound, each concentration was separately tested in three independent microplates, at the rate of three wells per microplate. The statistical evaluation of IC₅₀ was made with a software specially designed for calculating the median inhibitory concentration for toxicity tests.³¹

or hydroxy groups onto the benzoyl moiety decreased the inhibitory activity for Cdc25A and Cdc25 C.

When we shifted the carbonyl group from phenyl ring to the coumarin moiety, obtaining reverse chalcone–coumarin compounds (**10a–c**), the inhibitory activity reduced up to half (**10a**) or it was almost completely lost (**10b–c**) against all enzymes. The insertion of a sulfur atom between coumarin moiety and benzoyl group, as described for compounds **14a–c**, did not ameliorate the activity, but, interestingly, the trend was upset: indeed the addition of one or two methoxy groups onto the phenyl ring increased the inhibition and, in particular, against Cdc25A until almost 40% (**14c**).

These results were confirmed by establishing IC₅₀ values (concentrations inhibiting 50% of enzyme activity) for the most potent compounds (**6a–f**). Statistical calculations were performed using generalized Poisson regression model, as described by Maul.³¹ (Table 2)

Furthermore we examined the reversible fixation of these small coumarin-based molecules. Cdc25A phosphatase was pre-incubated for several times with compound **6a** at active concentration of 100 μM. Then, the reaction mixture was diluted 100-fold to obtain a final non inhibitory concentration of 1 μM (data not shown). It is assumed that the mechanism of action should be considered as irreversible if the inhibitory effects persist after dilution¹³ (Fig. 3).

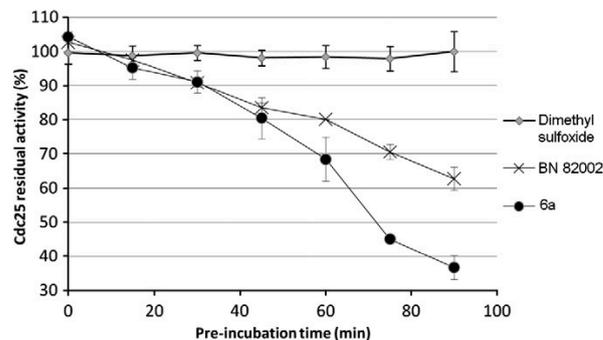


Figure 3. Reversibility assay of Cdc25A inhibition by **6a**. DMSO was used as control and BN82002 as reference for irreversible inhibition. Cdc25A was pre-incubated with inhibitory concentrations of **6a** (100 μM), and BN82002 (10 μM) for various time intervals (0–90 min). After incubation, the reaction mixture was diluted 100-fold to reach inactive concentrations of **6a** (1 μM) and BN82002 (0.1 μM). The phosphatase activity was determined by adding the substrate OMFP in each well containing 900 ng of Cdc25A after dilution. Data are representative of three independent experiments (M ± SD).

Compound **6a** displayed a time-dependent inhibition of Cdc25A, and the maximal inhibitory effect is observed for a 90 min pre-incubation (35% of residual activity) as indicated in Figure 3. As the inhibitory activity persisted after the dilution procedure, compound **6a** could be considered as acting as irreversible inhibitor of the Cdc25 phosphatases *in vitro*.

In summary, we have identified new coumarin-based derivatives as Cdc25 phosphatases inhibitors, among these the chalcone-coumarin series **6a–f** showed the most interesting results, being **6a** and **6d** endowed with lowest IC₅₀ as reported in Table 2: 27 and 28 μM against Cdc25A, respectively. Compounds **6a** and **6b** can be considered two new lead compounds for further work leading to optimization, but also for *in cell* evaluation that will be reported in due course.

Acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the [European Community's] Seventh Framework Programme ([FP7/2007-2013] under Grant Agreement No. 215009.

Région de Lorraine, Conseil Général de la Moselle, and Ligue contre le Cancer (54, 55, 57 Départemental comitees) are acknowledged for financial support.

E.B. is recipient of an AFR grant from the “Fonds national de la Recherche (Luxembourg)”.

References and notes

- Boutros, R.; Lobjois, V.; Ducommun, B. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 495.
- Kristjansdottir, K.; Rudolph, J. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1043.
- Rudolph, J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3595.
- Karlsson, C.; Katich, S.; Hagting, A.; Hoffmann, I.; Pines, J. *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 573.
- Molinari, M.; Mercurio, C.; Dominguez, J.; Goubin, F.; Draetta, G. F. *EMBO Rep.* **2000**, *1*, 71.
- Boutros, R.; Dozier, C.; Ducommun, B. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 185.
- Niida, H.; Nakanishi, M. *Mutagenesis* **2006**, *21*, 3.
- Aressy, B.; Ducommun, B. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 818.
- Lavecchia, A.; Di Giovanni, C.; Novellino, E. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1831.
- Brault, L.; Bagrel, D. *Life Sci.* **2008**, *82*, 315.
- Lazo, J. S.; Aslan, D. C.; Southwick, E. C.; Cooley, K. A.; Ducruet, A. P.; Joo, B.; Vogt, A.; Wipf, P. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4042.
- Brezak, M. C.; Quaranta, M.; Mondesert, O.; Galcera, M. O.; Lavergne, O.; Alby, F.; Cazales, M.; Baldin, V.; Thuriereau, C.; Harnett, J.; Lanco, C.; Kasprzyk, P. G.; Prevost, G. P.; Ducommun, B. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3320.
- Brezak, M. C.; Quaranta, M.; Contour-Galcera, M. O.; Lavergne, O.; Mondesert, O.; Auvray, P.; Kasprzyk, P. G.; Prevost, G. P.; Ducommun, B. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1378.
- Brezak, M. C.; Valette, A.; Quaranta, M.; Contour-Galcera, M. O.; Jullien, D.; Lavergne, O.; Frongia, C.; Bigg, D.; Kasprzyk, P. G.; Prevost, G. P.; Ducommun, B. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 1449.
- Duval, R.; Kolb, S.; Braud, E.; Genest, D.; Garbay, C. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 947.
- Kolb, S.; Mondesert, O.; Goddard, M. L.; Jullien, D.; Villoutreix, B. O.; Ducommun, B.; Garbay, C.; Braud, E. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 633.
- Deep, G.; Oberlies, N. H.; Kroll, D. J.; Agarwal, R. *Int. J. Cancer* **2008**, *3*, 41.
- Kim, K. S.; Kawasaki, I.; Chong, Y.; Shim, Y. H. *Mol. Cell* **2009**, *27*, 345.
- Kelkar, R. M.; Joshi, U. K.; Paradkar, M. V. *Synthesis* **1986**, *3*, 214.
- Cook, C. E.; Corley, R. C.; Wall, M. E. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 4120.
- Ito, K.; Sawanobori, J. *Synth. Commun.* **1982**, *12*, 665.
- Binda, C.; Wang, J.; Pisani, L.; Caccia, C.; Carotti, A.; Salvati, P.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5848.
- Marqués-López, E.; Herrera, R. P.; Marks, T.; Jacobs, W. C.; Könnig, D.; de Figueiredo, R. M.; Christmann, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4116.
- Kuroda, J.; Inamoto, K.; Hiroya, K.; Doi, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *14*, 2251.
- Lindhardt, H. A.; Troels, S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5997.
- Ito, K.; Nakajima, K. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, *25*, 511.
- Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, *11*, 1895.
- Brault, L.; Denance, M.; Banaszak, E.; El Maadidi, S.; Battaglia, E.; Bagrel, D.; Samadi, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 243.
- The enzymatic activity of the GST-Cdc25 recombinant enzyme was performed in 96-well plates in [50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.1% SAB, pH 8.1] buffer containing 3-O-methylfluorescein phosphate 500 μM as substrate. The Gst-Cdc25 proteins, diluted in assay buffer, were used at a final concentration of 1 μg/well. After 2 h at 30 °C, 3-O-methylfluorescein fluorescent emission was measured with a CytoFluor system Perspective Applied Biosystems; excitation filter: 475 nm and emission filter: 510 nm.
- (a) All compounds were characterized by HRMS (ESI) and NMR analysis. (b) Analytical data for compounds **6a** and **6d**: for **6a** ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.90 (s, 3H, OCH₃), 6.94–7.05 (m, 3H, coumarin protons), 7.55–7.70 (m, 3H, benzene protons), 7.88–8.20 (m, 5H, coumarin proton, benzene protons, –CH=CHCOPh and –CH=CHCOPh); ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.85, 98.20, 101.35, 109.85, 111.55, 112.70, 125.66, 128.70 (2C), 129.04 (2C), 129.62, 133.77, 136.45, 136.96, 148.78, 155.69, 160.96, 163.18, 179.61, 188.82; HRMS (ESI) *m/z* 329.09 [M+Na]⁺; for **6d** ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6.76–6.85 (m, 3H, coumarin protons), 7.55–7.79 (m, 4H, benzene protons and coumarin proton), 7.90–7.96 (d, 1H, –CH=CHCOPh), 8.07–8.20 (m, 3H, benzene protons and –CH=CHCOPh), 10.70 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 102.67, 108.03, 110.05, 113.26, 126.30, 128.85 (2C), 128.88 (2C), 130.31, 133.75, 135.28, 136.65, 147.93, 155.22, 160.36, 161.52, 188.78; HRMS (ESI) *m/z* 315.06 [M+Na]⁺.
- Maul, A. *Environ. Monit. Assess.* **1992**, *23*, 153.

**BREAST CANCER –
FOCUSING TUMOR
MICROENVIRONMENT,
STEM CELLS AND
METASTASIS**

Edited by **Mehmet Gunduz** and **Esra Gunduz**

Contents

Preface IX

Part 1 Breast Cancer Cell Lines, Tumor Classification, In Vitro Cancer Models 1

Chapter 1 **Breast Cancer Cell Line Development and Authentication 3**
Judith C. Keen

Chapter 2 ***In Vitro* Breast Cancer Models as
Useful Tools in Therapeutics? 21**
Emilie Bana and Denyse Bagrel

Chapter 3 **Insulin-Like-Growth Factor-Binding-Protein 7:
An Antagonist to Breast Cancer 39**
Tania Benatar, Yutaka Amemiya, Wenyi Yang and Arun Seth

Chapter 4 **Breast Cancer: Classification Based on Molecular
Etiology Influencing Prognosis and Prediction 69**
Siddik Sarkar and Mahitosh Mandal

Chapter 5 **Remarks in Successful Cellular Investigations
for Fighting Breast Cancer Using Novel
Synthetic Compounds 85**
Farshad H. Shirazi, Afshin Zarghi, Farzad Kobarfard,
Rezvan Zendehtdel, Maryam Nakhjavani, Sara Arfaiee,
Tannaz Zebardast, Shohreh Mohebi, Nassim Anjidani,
Azadeh Ashtarinezhad and Shahram Shoeibi

Chapter 6 **Breast Cancer from Molecular Point of View:
Pathogenesis and Biomarkers 103**
Seyed Nasser Ostad and Maliheh Parsa

Part 2 Breast Cancer and Microenvironment 127

Chapter 7 **Novel Insights Into the Role of Inflammation
in Promoting Breast Cancer Development 129**
J. Valdivia-Silva, J. Franco-Barraza,
E. Cukierman and E.A. García-Zepeda

VI Contents

- Chapter 8 **Interleukin-6 in the Breast Tumor Microenvironment** 165
Nicholas J. Sullivan
- Chapter 9 **The Role of Fibrin(ogen) in Transendothelial Cell Migration During Breast Cancer Metastasis** 183
Patricia J. Simpson-Haidaris, Brian J. Rybarczyk and Abha Sahni
- Chapter 10 **Hyaluronan Associated Inflammation and Microenvironment Remodelling Influences Breast Cancer Progression** 209
Caitlin Ward, Catalina Vasquez, Cornelia Tolg, Patrick G. Telmer and Eva Turley
- Part 3 Breast Cancer Stem Cells** 235
- Chapter 11 **The Microenvironment of Breast Cancer Stem Cells** 237
Deepak Kanojia and Hexin Chen
- Chapter 12 **Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression** 247
Jürgen Dittmer, Ilka Oerlecke and Benjamin Leyh
- Chapter 13 **Breast Cancer Stem Cells** 273
Fengyan Yu, Qiang Liu, Yujie Liu, Jieqiong Liu and Erwei Song
- Part 4 Breast Cancer Gene Regulation** 289
- Chapter 14 **Epigenetics and Breast Cancer** 291
Majed Saleh Alokail
- Chapter 15 **Histone Modification and Breast Cancer** 321
Xue-Gang Luo, Shu Guo, Yu Guo and Chun-Ling Zhang
- Chapter 16 **MCF-7 Breast Cancer Cell Line, a Model for the Study of the Association Between Inflammation and ABCG2-Mediated Multi Drug Resistance** 343
Fatemeh Kalalinia, Fatemeh Mosaffa and Javad Behravan
- Part 5 Breast Cancer Cell Interaction, Invasion and Metastasis** 359
- Chapter 17 **Interaction of Alkylphospholipid Formulations with Breast Cancer Cells in the Context of Anticancer Drug Development** 361
Tilen Koklic, Rok Podlipec, Janez Mravljak, Marjeta Šentjarc and Reiner Zeisig
- Chapter 18 **The Mesenchymal-Like Phenotype of the MDA-MB-231 Cell Line** 385
Khoo Boon Yin

- Chapter 19 **p130Cas and p140Cap as the Bad and Good Guys in Breast Cancer Cell Progression to an Invasive Phenotype 403**
P. Di Stefano, M. del P. Camacho Leal, B. Bisaro,
G. Tornillo, D. Repetto, A. Pincini, N. Sharma, S. Grasso,
E. Turco, S. Cabodi and P. Defilippi
- Chapter 20 **Fibrillar Human Serum Albumin Suppresses Breast Cancer Cell Growth and Metastasis 423**
Shao-Wen Hung, Chiao-Li Chu,
Yu-Ching Chang and Shu-Mei Liang
- Chapter 21 **On the Role of Cell Surface Chondroitin Sulfates and Their Core Proteins in Breast Cancer Metastasis 435**
Ann Marie Kieber-Emmons, Fariba Jousheghany
and Behjatolah Monzavi-Karbassi
- Chapter 22 **Endocrine Resistance and Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer 451**
Sanaa Al Saleh and Yunus A. Luqmani
- Chapter 23 **Junctional Adhesion Molecules (JAMs) - New Players in Breast Cancer? 487**
Gozie Offiah, Kieran Brennan and Ann M. Hopkins
- Chapter 24 **Breast Cancer Metastasis: Advances Through the Use of In Vitro Co-Culture Model Systems 511**
Anthony Magliocco and Cay Egan
- Chapter 25 **Breast Cancer Metastases to Bone: Role of the Microenvironment 531**
Jenna E. Fong and Svetlana V. Komarova
- Chapter 26 **Rho GTPases and Breast Cancer 559**
Xuejing Zhang and Daotai Nie

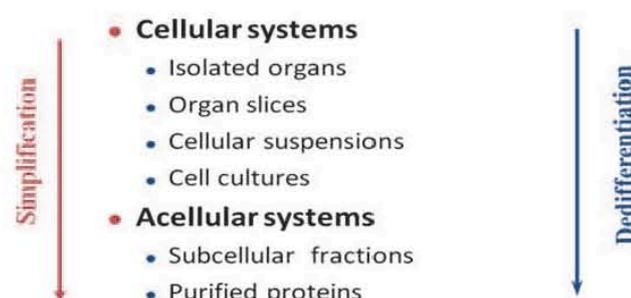
***In Vitro* Breast Cancer Models as Useful Tools in Therapeutics?**

Emilie Bana and Denyse Bagrel
Université Paul Verlaine – Metz
Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique
 France

1. Introduction

The increased use of animals in fundamental and applied research due to the remarkable drug development in the 20th century has been an important matter of concern for people at large, but also for the scientific community. This led Russel and Burch to examine the decisions which could meliorate this situation, and they proposed, in 1959, the principle of the 3Rs (Reduce, Refine, and Replace) nowadays largely admitted as an ethical and incontrovertible principle (Russell & Bursch 1959). Alternatives to animal experiments (Scheme 1) then knew a fantastic boom with the permanent objective of a high scientific quality in order to prevent, treat and cure human illness.

Reaching the equilibrium between *in vitro* and *in vivo* models, observing the 3Rs rules, is very difficult. Effectively, *in vitro* systems allow an excellent control of all parameters of the experiments, and then, good quantifications. More the models are simple, more they are easy to handle, but more they also are dedifferentiated and keep away from the *in vivo* situation.



Scheme 1. *In vitro* systems as alternatives to the use of animals.

Within the framework of this book, the question becomes now: how the 3Rs could be the best way to phase out animal experiments when considering breast cancer? We try to bring some response elements in this chapter, emphasising the *in vitro* models the most useful and the most frequently used. But we also show that no model is perfect and sufficient by itself, and that pure *in vitro* models also need assistance of *in vivo* ones.

2. Models for investigation on breast cancer

2.1 Established breast cancer cell lines

2.1.1 The different cell lines and their main properties

Significant amounts of data on breast cancer have been collected over the past 40 years, thanks to the use of established cell lines. The first breast cancer cell lines (BCCL) have been established in the sixties-seventies and very few new cell lines have been developed since. Only a hundred of BCCL are currently available and three of them have been extensively studied and represent now nearly 80% of the 35 000 publications mentioning breast cancer cell lines (Lacroix & Leclercq 2004).

Most of the cell lines were created from cells derived from metastasis or from pleural effusion. Pleural effusions contain large amounts of well isolated tumour cells and few contaminating cells such as fibroblasts, thus making their recovery and growing easier than those of cells directly derived from primary tumours or metastasis. Moreover, metastatic cells are highly dedifferentiated cells, which allow their cultivation more successfully than the primary tumour cells.

The three more used BCCL (MCF-7, MDA-MB-231 and T47D) are issued from pleural effusion of an invasive ductal carcinoma (Soule *et al.* 1973; Cailleau *et al.* 1974; Keydar *et al.* 1979), and they mainly differ by their oestrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) status: MCF-7 and T47D are ER+ PgR+ while MDA-MB-231 is ER- PgR-. Among these three cell lines, MCF-7 was the most often used during the last ten years: it has been cited in 53% of all the scientific papers mentioning BCCL, while MDA-MB-231 and T47D were respectively cited in about 18% and 7% of these articles (calculation made on the basis of a Medline-based survey in March 2011).

The use of these lines has many technical advantages.

- The complete control of environmental conditions and standardised culture conditions ensures the reproducibility of results between experiments and laboratories.
- Maintaining cells in culture is much less costly than working on animal models. Besides the fact that some animal models are expensive by themselves, the care of animals and the staff necessary to a good work in an animal house are the main drain of resources. Conversely, the medium and the staff time required to growth cells are cheaper, thus allowing the widespread use of BCCL.
- Cryopreservation enables long-term conservation of the same strain and can theoretically permit the use of these cell lines indefinitely.

These advantages have allowed to gather essential data for the study of breast cancer in the last 40 years, making these cell lines reference models in the field with the establishment of a complete genetic and proteomic profile.

2.1.2 The main drawbacks of these models

- Stability/instability

In practice, these strains, although cryopreserved, undergo dedifferentiation resulting from multiple subcultures, and leading to the lost of special characteristics. Moreover, differences in the culturing practices (medium composition, time between subcultures, subculturing technique, etc.), can explain some divergences observed for a same strain in different laboratories.

- Simplicity

The relevance of cellular models is controversial since their over-simplicity implies difficulties in extrapolating results from the cell line to the tumour in humans and thus raises the question of their representativeness.

Indeed, cell lines are homogeneous, theoretically consisting only of a single cell type (pure and clonal) due to the way they are established:

- The dislocation of tumours is followed by isolation of cells, in order to obtain the most stable culture during subcultures.
- The culture conditions eliminate some types of cells present in the original tumour, unable to grow on a synthetic surface, or whose rate of development is much lower than the one of the surviving cells.
- Cells in culture do not undergo the influence of nervous and hormonal regulatory systems active *in vivo*.

These particularities reduce the similarity with the primary tumour.

- Limited representativeness

The hundred of available cell lines do not cover all of the tumour features found in patients. Furthermore, the proportions of some characteristics are sometimes reversed, such as the ER and PgR status which is very different in cell lines, compared to that found in the patient population (Lacroix & Leclercq 2004). These dissimilarities can be explained by the fact that most lines are derived from pleural effusion and metastases containing cells which are already different from the original tumour and thus, more or less representative of this tumour. Indeed, the ER/PgR status sometimes differs between the metastasis and the original tumour from the same patient. Based on these observations, several teams have worked on the development of cell lines derived from a primary tumour (Amadori *et al.* 1993; Gazdar *et al.* 1998; Shen *et al.* 2009), which are much more representative of the *in vivo* cancerous tissues than lines derived from metastases, but which suffer from the same problems related to their relative homogeneity and instability in a long term use. Moreover, the establishment of cell lines from primary tumours remains a difficult achievement, failures mainly being the result of contamination by the stroma surrounding the tumour.

- Confusion with some cell lines

Besides these previous drawbacks, many criticisms have been made against BCCL because some of them have been proven not being from breast cancer origin. Indeed, some lines were contaminated by other cell types during their first years of use, then spread to other laboratories, and used on a large scale without further verifications of their true origin. Several cell lines were denounced as false, whereas it was not the case (Fogh *et al.* 1977; Nelson-Rees & Flandermeyer 1977). These contaminations have been subjects of controversial for a long time. However, studies have shown with certitude that two cell lines were not from their supposed origin.

The MCF-7-ADRr cell line was developed in 1986 by Batist. It is derived from the lineage of human mammary adenocarcinoma MCF-7 and was rendered resistant to adriamycin treatment after exposition to increased concentrations of this drug. The obtained resistant cell line was also resistant to other agents such as actinomycin D, vinblastine and vincristine. However in 1998, the lineage between MCF-7 and MCF-7-ADRr became controversial, as shown by DNA fingerprinting studies and genetic comparison, so that the true origin of the cell line was undetermined and the cell line was renamed NCI/ADR-RES. Liscovitch and Ravid, in 2007, have collected data showing that NCI/ADR-RES were carcinoma ovarian

cells (Liscovitch & Ravid 2007), and experiments of Affymetrix SNP array analysis at the Sanger Institute (Cancer Genome Project) and of karyotyping, helped to put in evidence an indisputable resemblance of NCI/ADR-RES with the OVCAR-8 human ovarian carcinoma cell line. The most likely scenario is that the stock of MCF-7 cells from the National Cancer Institute used in 1986 for the development of the lineage, was contaminated with OVCAR-8 cells before the first generation of MCF-7-ADR-r. OVCAR-8 cells are naturally resistant to adriamycin, and the *in vitro* selection probably eliminated the MCF-7 cells and allowed the survival of OVCAR-8 cells (Liscovitch & Ravid 2007). It can be noted that MCF-7-ADRr are no longer distributed by the international cell bank ATCC.

The second misidentification concerns the MDA-MB-435 cell line established by Cailleau and colleagues in 1978. This cell line has been controversial in 2000, further to the results of DNA microarray analysis which suggested that these cells might be of melanocyte origin (Ross & Perou 2001). Some other results, obtained by microsatellite comparison analysis, karyotyping and comparative genomic hybridisation experiments (Rae *et al.* 2007), confirmed that MDA-MB-435 cells are in fact M14 melanoma cells.

However, these two cell lines, MCF-7-ADRr and MDA-MB-235, are still used as breast cancer cell lines for some studies and are used for publications in international journals, while it has been proven that they are not from breast cancer origin (Lacroix 2008). The verification of the origin of a cell line is essential, and a way of ensuring that the cell lines are really from a well-defined origin is to make a short tandem repeat (STR) profiling. This method is used to confirm the identity of a cell line by comparison to a known profile and a periodic re-authentication of cell lines is advisable. Moreover, banks of cell lines such as ATCC guarantee the exact origin of their cells. Several authors suggested to prove the authenticity of the cell lines used for each publications (Burdall *et al.* 2003; Lacroix 2008).

2.1.3 Non cancerous immortalised cells as controls

It should be noticed that the study of mammary tumours also involves the use of non cancerous cells which were immortalised. These cell lines were derived from healthy breast tissue, but only few models, obtained by different methods, are available.

- The immortalisation could be the consequence of a particular composition of the growth medium. This is the case for the non-tumourigenic epithelial cell lines MCF-10A (adherent cells) and MCF-10F (floating cells) which were established from the same sample in the nineties (Soule *et al.* 1990). These cell lines were produced by a long-term culture in a special medium containing a low concentration of Ca^{2+} and no serum addition, which resulted in the apparition of immortalised cells with normal features of mammalian epithelial cells.
- Two other cell lines were derived from a mammoplasty surgery. These cells named MCF-12A and MCF-12F became spontaneously immortal after unexpected exposition to high temperatures (45°C during 72 hours, Pauley *et al.* 1991).
- Another cell line, hTERT-HME1 was obtained from the HME1 cells (Human Mammary Epithelial) which were immortalised by infection with the retrovirus pBabepuro+hTER. The immortality feature results from the exogenous expression of the telomerase gene coming from the viral infection (Van der Haegen & Shay 1993; Gollahon & Shay 1996).

- Under chemical pressure, normal cells in culture can also be immortalised. This is the case for some cell lines as 184A1 and 184B5 which were obtained by exposition to benzo[a]pyrène, a chemical carcinogen, leading to clonal events which are the origin of these immortal cell lines (Stampfer 1989).

The use of these “non cancerous” cell lines is important to give a comparison point to results obtained with cancerous cell lines. However, there are drawbacks and controversy to their use, the major one concerning the way they were obtained. Indeed, if they are still non-tumourigenic, they suffer of genetic modifications which lead them to become immortal. They are looking like normal cells, but they are not.

2.1.4 Breast cell lines and metabolism of therapeutic drugs

- Drug metabolism

The metabolic equipment of a cell can explain its sensitivity/resistance to drugs. Indeed, any xenobiotic molecule (therapeutic drugs included) undergoes the same metabolic fate in the cells. Briefly, enzymes of Phase I (essentially cytochromes P450 (CYP) dependent enzymes) ensure a bioactivation of the molecules while enzymes of Phase II conjugate the metabolites issued from Phase I to endogenous molecules (glucuronic acid, glutathione, sulfates...) in order to make them more water-soluble and to facilitate their elimination. Finally, transporters of Phase III are responsible for exporting these last products out of the cells. Each human organ is equipped with these enzymes, but their expression pattern differs quantitatively and qualitatively. The liver is the most efficient organ in metabolising processes, even if we know that some enzymes are more specifically expressed in non hepatic tissues.

When considering the usefulness of breast cell lines as *in vitro* tools to predict sensitivity or resistance to a molecule, it is easy to perform, in first line, simple cytotoxicity tests. However, in order to explain the reasons of these cells behavior, or to predict the metabolism of a new compound, the knowledge of the metabolic equipment of the cells is necessary. As it is impossible, and not very interesting, to decline the results of the literature concerning breast cell lines and assays with the numerous chemical molecules which have been, precisely or not precisely, tested, we chose two examples of therapeutic drugs, used in breast cancer, that need to be bioactivated by CYP before exerting their deleterious effects in the cells: oxazaphosphorines and ellipticine.

- Metabolism of oxazaphosphorines

The oxazaphosphorines generally used in pharmacology (*i.e.* cyclophosphamide (CPA), ifosfamide (IFO), and trofosfamide) represent an important group of chemotherapeutic agents. However, their use is limited by severe toxic side effects. New oxazaphosphorines derivatives have been developed in order to improve selectivity and to reduce toxicity but they won't be studied here, due to their bioactivation process which is different from that of previous molecules (Zhang *et al.* 2005).

Both CPA and IFO, the most widely used as alkylating agents, are prodrugs whose metabolism involves different cytochromes P450 (CYPs) catalysing 4-hydroxylations leading to acrolein and nitrogen mustards capable of reacting with DNA molecules leading to cell apoptosis and/or necrosis. Another pathway consists in an N-dealkylation whose last product is the toxic chloroacetaldehyde (Figure 1) (Rooseboom *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005). All these metabolites are highly reactive metabolites responsible for urotoxicity, neurotoxicity and nephrotoxicity. As all the mechanisms underlying these toxicities are not

elucidated, Mesna (Sodium 2-mercaptoethanesulfonate) is often used to limit these side effects (Giraud *et al.* 2010).

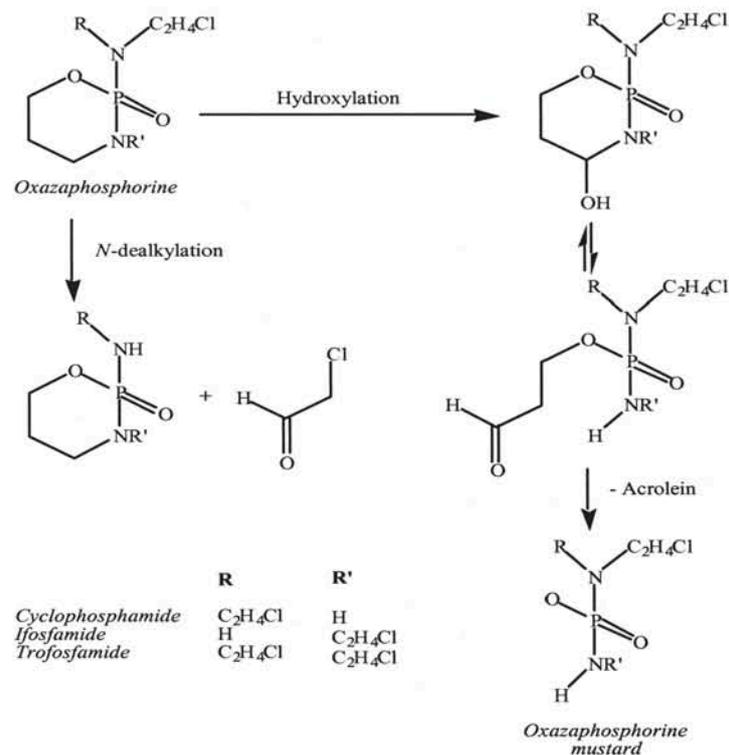


Fig. 1. First phase of metabolism of the oxazaphosphorines by CYPs: hydroxylation leads to oxazaphosphorine mustards, and N-dealkylation results in chloroacetaldehyde formation. From Rooseboom *et al.* 2004 with permission from ASPET.

As already mentioned, several CYPs are involved in these drug metabolism: CYP2B6 (Wang & Tompkins 2008; Mo *et al.* 2009; Bray *et al.* 2010), CYP3A4 (Kivisto *et al.* 1995), but also CYP2A6 (Di *et al.* 2009), CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5 (Bray *et al.* 2010) and probably others. Figure 2 below, extracted from Wang & Tompkins 2008, shows the expression of the different human hepatic CYP and their contribution to metabolize clinically-used drugs. No analog study was performed in breast tissue, and *a fortiori* in breast cancer cell lines. However, the literature reports the presence of CYP3A4 (the CYP enzyme the most involved in drug metabolism) in MCF-7, T47D and MDA-MB-231 (Nagaoka *et al.* 2006; Chen *et al.* 2009; Mitra *et al.* 2011), of CYP2B6 in MCF-7 and T47D (Lo *et al.* 2010) whereas this information is not available for MDA-MB-231. While CYP2D6 and splicing variants similar to those found in breast cancer tissues were shown expressed in MCF-7 (Huang *et al.* 1997), no information about this CYP, to our knowledge, was related for T47D and MDA-MB-231.

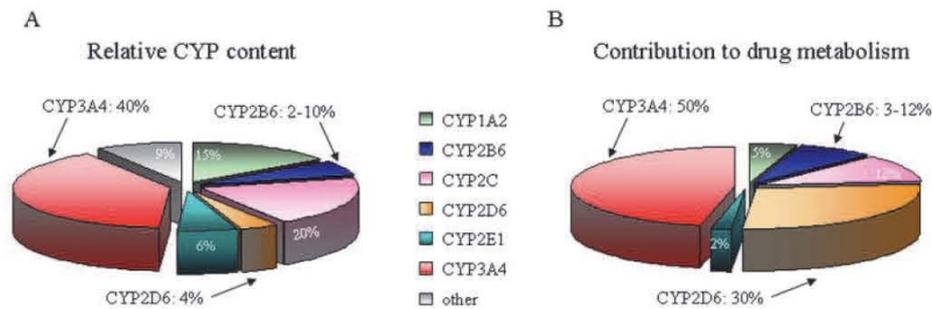


Fig. 2. Hepatic CYP expression (A) and their contribution to metabolism of clinically-used drugs (B). From Wang & Tompkins 2008, permission granted by Bentham Science Publishers Ltd.

- Metabolism of ellipticine

Another example is given by ellipticine. This alkaloid compound found in several plants (*Ochrosia*, *Aspidosperma subincanum*, *Bleekeria vitiensis*) is a topoisomerase poison often used in ovarian and breast cancer treatment. It is also a prodrug whose efficiency depends on CYP activation. 13-hydroxy- and 12-hydroxy-ellipticine, responsible for the formation of DNA adducts, are generated by CYP1A1/2, CYP3A4 and CYP2C9.

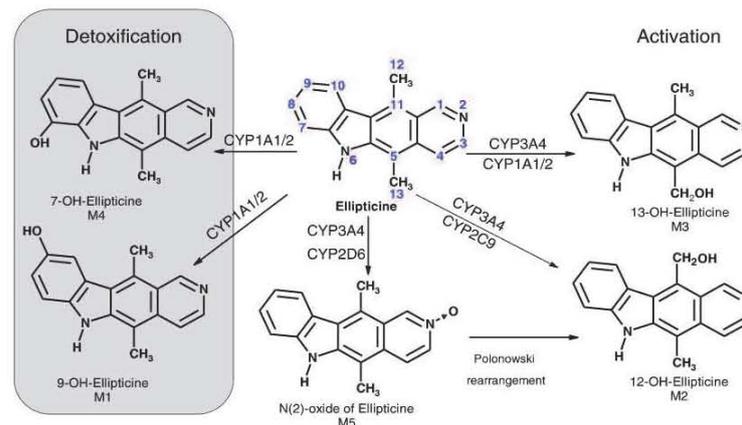


Fig. 3. Main pathways of ellipticine metabolism. Reprinted from Stiborova *et al.* 2011, ©2011, with permission from Elsevier.

Members of the CYP1 family are usually expressed in extrahepatic tissues and it is not strange to find CYP1A1 in MCF-7 (Androutopoulos *et al.* 2009; Stiborova *et al.* 2011), in MDA-MB-231 and T47D (Macpherson & Matthews 2010). We already mentioned the presence of CYP3A4 in the three cell lines, but no precise information is available for CYP2C9.

This slight overview shows that the three main breast cancer cell lines are able to give interesting information about drugs that have to be bioactivated before exerting their deleterious effects in cancer cells. However, we must keep in mind that polymorphic variants of the genes coding these enzymes, or splicing variants, may influence the

pharmacology of any drugs. Very few information about that are available in patients, but no study was performed in breast cancer cells.

BCCL have been created to study tumour development and related mechanisms and to test molecules potentially active. They are inevitable models for many studies. However, their extensive use in all areas of research on breast cancer remains sometimes controversial due to the over simplicity of the model, the instability of the strain, the existence of “false cell lines” and the failures of representativeness of the tumour. Thus, it clearly appears that these models are not sufficient to answer all the questions on breast cancer, and it is essential to turn to complementary models. Consequently, new models were introduced in the late 70s. They were used to a lesser extent than cell lines for a long time, but they tend to be more used now.

2.2 Improving representativeness of the model: Direct culture of tumour fragment

There are several methods to circumvent the problem of representativeness of BCCL, e.g. the direct culture of tumour fragments. The first attempts in this direction were made in the late 60s from tumours of 1mm³ volume (Matoska & Stricker 1967). However, these cultures were proven difficult due to the high thickness of the samples, preventing the diffusion of nutrients and oxygen to the center of the sample, and thus, avoiding a long-term cultivation *in vitro*. This method has been modified over time, and with the use of microtome, problems associated with diffusion of nutrients have been resolved. The samples are now constituted of extremely thin slices of about 150 to 200 µM thick (Nissen *et al.* 1983).

This type of model was used to study the different inter-tumoural cell interactions and also to test the sensitivity to drugs (Milani *et al.* 2010). The slice tumour model associated with the development of microscopic analysis methods, such as the triple-fluorescence viability assay developed by Van Der Kuip, allowed the study of the cytotoxic effect of Taxol on this breast cancer model (Van Der Kuip *et al.* 2006).

Another example of drug study is the evaluation of the action of cytokines and cytotoxic drugs on animal (MMTV-Neu mice) breast cancer slices, especially the monitoring of apoptosis increase and DNA damage after treatment with interferon-gamma or doxorubicin (Parajuli & Doppler 2009).

The last noticeable example is the use of a tropism-modified oncolytic adenovirus, and a wild-type adenovirus on these slices to treat breast cancer. The results showed that the modified oncolytic adenovirus can infect and replicate in breast cancer tissue slices, suggesting the great potential of this model for evaluating the potential of oncolytic adenovirus constructs (Pennington *et al.* 2010).

This list is not exhaustive and the literature shows that a lot of results were obtained by the slice culturing method, more particularly on the study of drugs effects like tamoxifen or paclitaxel (Conde *et al.* 2008; Sonnenberg *et al.* 2008; Rajendran *et al.* 2011).

Although used since the late 70's, the slice technique evolved over time and was adapted to technological innovations. We may especially underline the use of silicon sensor chips wearing electrodes and sensors as a carrier of culture slice. The samples are deposited on the chip and data concerning the tumour-slice are analysed continuously during its cultivation and during its contact with drugs; measurements are made in real-time by the readout of ionic-sensitive field effect transistors and an oxygen electrode. This model was used to study the effects of Taxol on 200 slices of breast cancer, which revealed a dose-dependent decrease

of the metabolic activity showed by the measurement of a decrease in the acidification of the medium (Mestres *et al.* 2006).

This technique has advantages and drawbacks. The direct culture of tumour fragment has the major advantage of preserving tissue architecture and all the cell populations constituting the human tumour. This method is thus a valuable technique which permits to take into account the whole tumour environment *in vivo*, allowing the investigation of the role of 3-dimensional structures and stromal interactions in tumour. It also allows to study the response of a particular tumour type to environmental stimulations, drugs, and cytokines under well-defined and reproducible conditions.

However, the culture of tumour samples presents limitations that do not allow its widespread use. Obtaining tumour samples is submitted to ethical constraints relative to the use of patient samples for research. In addition, it must be performed under ideal conditions. Thus, the samples have to be prepared very quickly after their excision, which means that the research laboratory should have particular facilities to have a direct access to fresh tissues. Moreover, the samples excised by the surgeon are becoming smaller and smaller, due to early diagnoses, and the major part of the samples is kept for diagnosis. Then, if some sample is still available for research, priority is given to research on biomarkers of the tumour in order to give personalised therapies, and, only after, it is disposable for fundamental research. Additionally to the availability restrictions, the same sample cannot be used for many tests because of the limitations of growth of this tissue *in vitro*. Repetition of assays and comparative measurements are thus more difficult with this model.

The use of samples from animal models with mammary tumour partially resolves the problem of availability of samples, but it also raises questions on the representativeness of the samples with human breast tumours. High improvements for providing human tissues of good quality will be brought by the emergence of biobanks.

2.3 Circumventing the lack of diversity: Co-culturing of cell lines

The co-culturing represents another way to circumvent the lack of cell diversity found in cell lines and to allow understanding of the tumoural proliferation mechanisms and inter-cellular interactions within a tumour. It is an indispensable tool to elucidate the regulation of the tumour by epithelial and stromal components surrounding it.

This model can be used by different ways: co-culturing of two cell types with a direct contact or co-culturing with a separating porous membrane between both cell types. The first method implicates to be able to differentiate the two cell types by microscopy. For that the use of fluorescent markers is a valuable tool (see Figure 4 for an example of co-culture of MDA-MB-231 with hASCs (adipose stem cells) respectively stained by the lipophilic tracers DiI (dialkylindocarbocyanines) and DiO (dialkylloxacarbocyanines), Pinilla *et al.* 2009).

The second method allows a relative isolation of the two cell types, the porosity of the membrane separating them allowing the exchange of substances. The two techniques give complementary information on the behavior of cells studied, especially the crucial role of the inter-cellular communication (Cappelletti *et al.* 1991).

In example, we could cite the co-culture of MDA-MB-231 and MCF-7, which has highlighted the importance of the heterogeneity of tumours for their growth and the role of oestrogen receptors. In this study, the co-culture of MCF-7 and MDA-MB-231 (respectively ER+ and

ER-) in a membrane separation system, was characterised by an increase of the MCF-7 cells growth rate in comparison with monocultures. This suggests that complex interactions between heterogenous cells population in tumour could explain the variability in tumour progression between different patients and the failure in response to endocrine treatment for some patients with ER+ tumours.

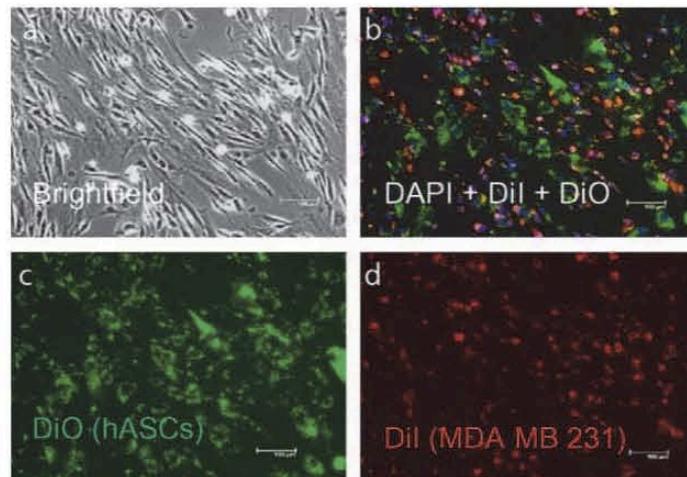


Fig. 4. Human stem cells derived from adipose tissue (hASCs) and breast cancer cells (MDA-MB-231) cultured in a monolayer co-culture system. (a) Direct microscopic observation of the co-culture of MDA-MB-231 and hASCs cells. (b) Overlay of DiO (hASCs), DiI (MDA-MB-231) and DAPI (nucleus) stainings. (c) DiO staining of hASCs derived stem cells (green). (d) DiI staining of MDA-MB-231 breast cancer cells (red). Reprinted from Pinilla *et al.* 2009, ©2009, with permission from Elsevier.

Another example concerns the direct co-culturing of MCF-10A, a non-cancerous breast cell line, with the cancerous one MCF-7. An exposure to hormonal treatment with 17 β -estradiol was able to inhibit the proliferation of MCF-7 cells in this co-culture, whereas this phenomenon was not observed in a monoculture of MCF-7. This highlighted the complex interactions between ER+ MCF-7 and ER- MCF-10A cells which may reflect physiologically relevant mechanisms of the paracrine regulation of cell proliferation (Spink *et al.* 2006).

The co-culture of MCF-7 with fibroblasts derived from normal biopsies or from cancer biopsies also allowed to highlight the crucial role of fibroblasts in breast tumours. The results of two studies, one in direct co-culturing (Samoszuk *et al.* 2005) the second in membrane separated system (Dong-Le Bourhis *et al.* 1997), showed that MCF-7 growth rate was inhibited by fibroblasts issued from non cancerous tissues, but not by fibroblasts issued from tumourous tissues or serum-activated fibroblasts which enhanced MCF-7 growth rate. This suggests that fibroblasts could release some tumour growth inhibiting or activating factors.

The role of tumour-associated macrophages in the proliferation of tumour cells was also studied by co-culturing macrophages with MCF-7 cells in a membrane separated system. This co-culture lead to a significant increase of MCF-7 invasiveness *in vitro* (Hagemann *et al.* 2004).

These repeatable techniques have permitted to highlight the regulation of mammary tumours by the surrounding stroma and the complex interactions between the cell subtypes of the tumour.

2.4 A model with a tumour-like structure and cell diversity: 3-D culture

Another particular model allows cells to grow in 3-dimensions, generally with a matrix support (Yuhás *et al.* 1978). This type of culture permits an *in vitro* depiction of tumour tissue more accurate than classical 2-dimensional cultures in monolayers, as this last model does not correctly imitate the architecture and cellular gradients of oxygen and nutrients that are found in poorly vascularised regions of the tumour.

Only few cell lines are spontaneously able to establish spheroid architectures under certain culture conditions, but most of the systems require the use of synthetic or non-synthetic matrix. Systems are most often made of agar matrices or collagen support (Kim *et al.* 2004b). The Figure 5 show the growth of a MCF-7 spheroid growth in a hydrogel agarose matrix system (Fritsch *et al.* 2010).

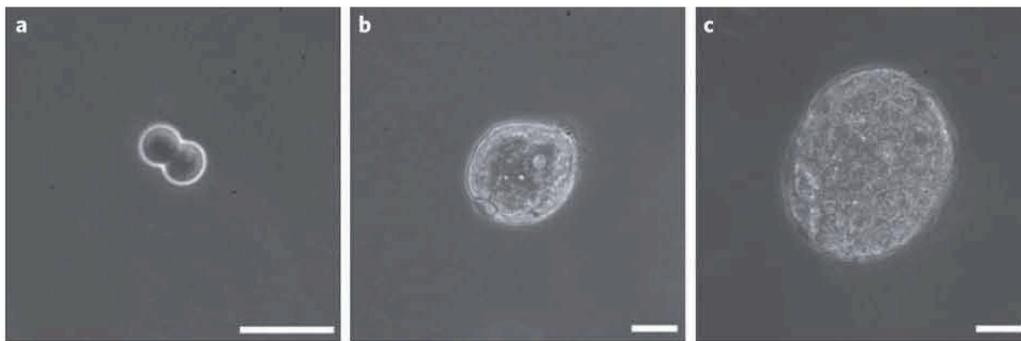


Fig. 5. Growth of a MCF-7 tumour spheroid in agarose hydrogel. The pictures represent the spheroid at 2 days old (a), 11 days old (b) and 27 days old (c) (the scale bar represent 50 μm). Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Physics, Fritsch *et al.* 2010, ©2010. <http://www.nature.com/nphys>.

Co-culturing of multiple cell types on these 3-dimensional systems is often used to study the relationship between cells, while simulating the tumour architecture with the most fidelity. These systems generally implicate the cultivation of tumour cells with other cell types like stromal, endothelial, fibroblasts and immune-competent cells. Moreover, this type of model, structurally like-looking the tumour, can be used quite indefinitely because it relies on the use of immortalised cells lines. This allows circumventing the problem of the lack of samples which is the major drawback of the tumour fragment culturing.

More advanced systems have been derived from this principle; one can cite the microfluidic-based 3-dimensional culturing (Bauer *et al.* 2010) that allows to grow multicellular tumour spheroid on a microchannel support, in order to analyze complex and heterotypic cellular interactions between breast cancer cells and fibroblast from the surrounding stroma. It has many advantages compared to the standard 3D culture: the culture volume and the number of needed cells are smaller than in standard support, the molecules are only distributed by diffusion mechanisms and the model is adapted to high throughput screenings.

2.5 Xenografts: An intermediary model between cell lines and *in vivo* models

We previously saw that some *in vitro* models tend to provide essential information on the inter-cellular interactions, by taking more or less into account the 3-dimensional structure of the tumour, but none of them benefit from the nervous and hormonal regulations found in the living organism.

There are particular models which can do perfectly the junction between *in vitro* and *in vivo* models, the xenografts. They are obtained by injecting cancer cells, usually derived from established cell lines, into a living organism. They are called xenografts because the injected cells are of human origin but are introduced into an animal organism, usually an immunodeficient rodent. The injection can be orthotopic (in breast gland) or heterotopic (localised in another part of the body, usually subcutaneously).

The xenograft model has the advantage of using cells from human tumour cell lines for which a significant amount of data was collected *in vitro*, and to study their behavior *in vivo*. There are several models available for research on breast cancer, principally using immunodeficient mice. The model nude is by far the most commonly used (Kim *et al.* 2004a). It is characterised by an absence of a functional thymus and active T cells (Kindred 1971). The second common model is the SCID mouse (severe combined immunodeficiency). These mice have a deficit in VDJ recombinases that allow the binding of specific and non-specific parts of immunoglobulin and T cell receptor (Bosma & Carroll 1991). See Figure 6 illustrating the two common models of mice used for breast cancer xenografts: nude and SCID.

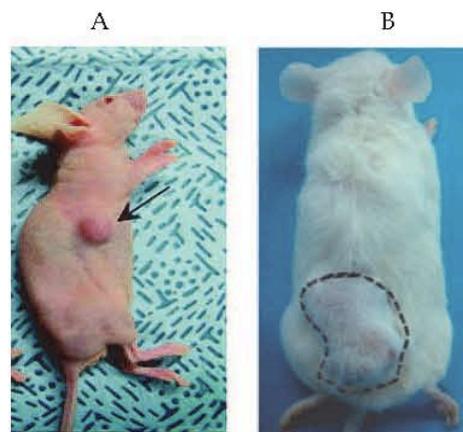


Fig. 6. **Nude (A) and SCID (B) mice models** xenografted respectively with MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. (A) was taken from Nizamutdinova *et al.* 2008, by permission of Oxford University Press, and (B) was taken from Wang *et al.* 2010, with permission from ASBMB journals.

The injected breast cancer cells mostly come from established cell lines like MCF-7, MDA-MB-231, T-47-D or ZR-75-1. The first experiments of cell transplantations were made in the 80s, and opened onto success in the establishment of malignant tumours in nude mice (Ozzello & Sordat 1980; Kim *et al.* 2004a). Since then, a lot of models have been developed for investigation of new treatments, therapeutic targets and establishment of new cancer detection method by medical imaging.

This technique is widely used to test the effect of new antitumourous compounds or therapeutic methods, for example to test new virotherapies. Thus, a benign virus

Coxsackievirus 21 (CVA21) was intravenously injected in SCID mice xenografted with MDA-MB-231 breast cancer cells. CVA21 virus targets the receptors ICAM-1 and DAF that are overexpressed in breast cancer cells. In this experiment a rapid lysis focused on cancer cells was observed in all mice, making this virus a good candidate for use in systemic therapy (Skelding *et al.* 2009). See Figure 7 illustrating the effect of the virus on xenografted mice, visualised by bioluminescent analysis.

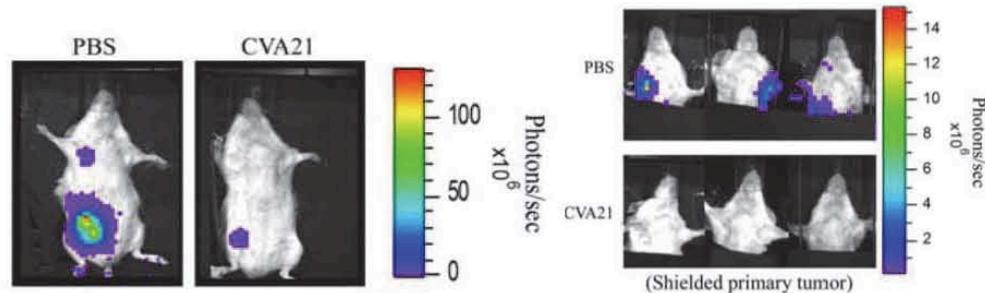


Fig. 7. Observation of the oncolytic activity of CVA21 virus in SCID mouse xenografted with MDA-MB-231-luc. The breast cancer cells were xenografted into the mammary fat pad, mice were then treated with PBS or CVA21. Metastases were detected 3 weeks post-cell injection. The mice on the pictures are representative for bioluminescent observation at day 42 post treatment. From Skelding *et al.* 2009, with kind permission from Springer Science and Business Media B.V.

In the investigation of new treatments, the vitamin D β receptors constitute good targets as they are present in over 80% of mammary tumours and they are negative growth regulator of both oestrogen-dependent and independent breast cancer cells *in vitro*. In a study published in 1998 it was shown that EB1089, a vitamin D β analog, was able to highly reduce the growth of tumour in nude mice xenografted with MCF-7 cells (tumours were 4-fold smaller than those in untreated mice). This reduction was resulting from an enhancement of apoptosis and reducing proliferation of tumour epithelial cells, suggesting the great potential of vitamin D β analogs such as EB1089 against human breast cancer (VanWeelden *et al.* 1998).

This model can also be used to explore new potential targets for anticancer therapies. A good example is the targeting of receptor ER β . In an experiment, standard T47D ER α + ER β - and modified T47D ER α + ER β + (T47D stably transfected with a plasmid allowing the expression of the receptor ER β), were xenografted in SCID mice. 17 β -estradiol was then injected into mice. The treatment triggered an acceleration of tumour growth in mice xenografted with the native T47D strain, and conversely a regression of tumours T47D ER β +. These results emphasize the antagonistic role of ER β receptors that appear to play an antitumourigenic role, and offered prospects for the development of ER-selective inhibitors. (Hartman *et al.* 2006).

The targets cited above are non exhaustive. Many other therapeutic targets are tested with xenografts models, as it is the case of the VEGF pathway implicated in tumour angiogenesis (Le *et al.* 2008), or of cell cycle regulating proteins such as CDK kinases (Fry *et al.* 2004).

The use of established cell lines for producing xenografts raises several questions about their relevance. The murine model presents considerable differences with the human body, concerning the biochemical and physiological regulation. Moreover, the stroma that will grow surround the tumour will be of murine origin and it will result in a chimeric tumour

which biology may significantly differ from human one (Kim *et al.* 2004a). Furthermore, in humans, the immune system plays an important role in the fight against tumour, whereas in xenografts models the immune system is totally absent.

The xenograft model has some limitations but is the most accomplished of all models because it takes into account the complexity of the organism.

Besides the xenografts, there are also murine models which can develop tumours spontaneously or under the influence of inducing compounds (Russo & Russo 1996). Although the achievement of these models is easy, their use is largely debated because of their relevance to the clinical situation. Indeed, murine breast cancers are most often caused by viral infections and are not hormone dependent, whereas a considerable proportion of human cancers are oestrogen dependent. To date there is no evidence suggesting a viral induction of breast cancer in humans. The biology of spontaneous rodent tumours differs from the human ones. The size, the oncogenic targets or the degree of maturation and differentiation of cells differ between the two species, making them hardly comparable.

3. Conclusion

In this chapter, we described the main models used in breast cancer research in order to obtain results of high scientific quality. In summary, we can say that BCCL models allow repeatable experiments with simple material and methods. They are inevitable models for basic studies and mechanistic explorations, but their use is still controversial owing to their approximate representativeness of breast tumours in human and to the existence of misidentified cell lines.

Cultures of cancerous tissues preserve the tumour architecture and the cell diversity of a tumour but this model suffers of limited reproducibility and cannot be easily maintained for a long time. Co-culture systems offer an alternative with reproducible long term culture systems, and offer the possibility to study the relations between different types of cells in tumour, but this model suffers from the same controversies as BCCL as it mainly relies on their use.

3-dimensional systems allow the mimicking of the tumour architecture and microenvironment, but very few cell lines are able to form spheroids under specific conditions.

Considering the advantages and drawbacks of these models, the xenografts appear to be good alternative models as they enable to take into account the tumour structure, its microenvironment, the role of the metabolism and they preserve the cell diversity of the tumour. But as other models, they also have drawbacks principally due to the metabolic and physiological differences existing between human and rodents, and to the fact that the role of the immune system against tumour is not taken into account with the immunodeficient rodent models used for xenografts.

Application of the 3Rs principle led to the development of all these models, but we showed that none of them is sufficient by itself and able to perfectly mimic breast cancer in human. However it clearly appears that all these models are essential to accumulate data and information to fight breast cancer.

4. Acknowledgements

The “Ligue contre le Cancer” (54, 55, 57 and 88 Departmental committees) is acknowledged for its financial support. E.B is recipient of an AFR grant of the National Research Fund, Luxembourg.

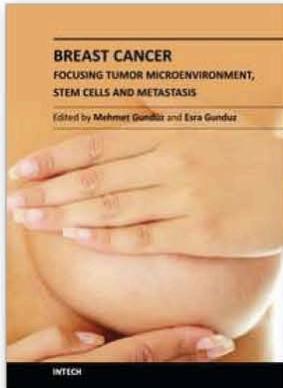
5. References

- Amadori, D., Bertoni, L., Flamigni, A., Savini, S., De Giovanni, C., Casanova, S., De Paola, F., Amadori, A., Giulotto, E. and Zoli, W. (1993). Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 28, No.3: 251-260.
- Androutsopoulos, V. P., Li, N. and Arroo, R. R. (2009). The methoxylated flavones eupatorin and cirsiol induce CYP1 enzyme expression in MCF7 cells. *J Nat Prod*, Vol. 72, No.8: 1390-1394.
- Bauer, M., Su, G., Beebe, D. J. and Friedl, A. (2010). 3D microchannel co-culture: method and biological validation. *Integr Biol (Camb)*, Vol. 2, No.7-8: 371-378.
- Bosma, M. J. and Carroll, A. M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*, Vol. 9: 323-350.
- Bray, J., Sludden, J., Griffin, M. J., Cole, M., Verrill, M., Jamieson, D. and Boddy, A. V. (2010). Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer*, Vol. 102, No.6: 1003-1009.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. and Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, Vol. 5, No.2: 89-95.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M. and Reeves, W. J., Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 53, No.3: 661-674.
- Cappelletti, V., Ruedl, C., Granata, G., Coradini, D., Del Bino, G. and Di Fronzo, G. (1991). Interaction between hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. *Eur J Cancer*, Vol. 27, No.9: 1154-1157.
- Chen, Y., Tang, Y., Chen, S. and Nie, D. (2009). Regulation of drug resistance by human pregnane X receptor in breast cancer. *Cancer Biol Ther*, Vol. 8, No.13: 1265-1272.
- Conde, S. J., Luvizotto, R. A., Sibio, M. T., Katayama, M. L., Brentani, M. M. and Nogueira, C. R. (2008). Tamoxifen inhibits transforming growth factor- α gene expression in human breast carcinoma samples treated with triiodothyronine. *J Endocrinol Invest*, Vol. 31, No.12: 1047-1051.
- Di, Y. M., Chow, V. D., Yang, L. P. and Zhou, S. F. (2009). Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Curr Drug Metab*, Vol. 10, No.7: 754-780.
- Dong-Le Bourhis, X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M. and Calvo, F. (1997). Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int J Cancer*, Vol. 71, No.1: 42-48.
- Fogh, J., Wright, W. C. and Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 58, No.2: 209-214.
- Fritsch, A., Höckel, M., Kiessling, T., Nnetu, K. D., Wetzels, F., Zink, M. and Käs, J. A. (2010). Are biomechanical changes necessary for tumour progression? *Nature Physics*, Vol. 6: 730-732.
- Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W. R., Pryer, N. K. and Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*, Vol. 3, No.11: 1427-1438.
- Gazdar, A. F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H. T., Wistuba, II, Tomlinson, G., Tonk, V., Ashfaq, R., Leitch, A. M., Minna, J. D. and Shay, J. W. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer*, Vol. 78, No.6: 766-774.

- Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, G. J., Vassal, G. and Paci, A. (2010). Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, Vol. 6, No.8: 919-938.
- Gollahon, L. S. and Shay, J. W. (1996). Immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53 (273his). *Oncogene*, Vol. 12, No.4: 715-725.
- Hagemann, T., Robinson, S. C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F. R. and Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, Vol. 25, No.8: 1543-1549.
- Hartman, J., Lindberg, K., Morani, A., Inzunza, J., Strom, A. and Gustafsson, J. A. (2006). Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res*, Vol. 66, No.23: 11207-11213.
- Huang, Z., Fasco, M. J. and Kaminsky, L. S. (1997). Alternative splicing of CYP2D mRNA in human breast tissue. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 343, No.1: 101-108.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. and Brenner, H. J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*, Vol. 15, No.5: 659-670.
- Kim, J. B., O'Hare, M. J. and Stein, R. (2004a). Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res*, Vol. 6, No.1: 22-30.
- Kim, J. B., Stein, R. and O'Hare, M. J. (2004b). Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer-- a review. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 85, No.3: 281-291.
- Kindred, B. (1971). Antibody response in genetically thymus-less nude mice injected with normal thymus cells. *J Immunol*, Vol. 107, No.5: 1291-1295.
- Kivisto, K. T., Kroemer, H. K. and Eichelbaum, M. (1995). The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*, Vol. 40, No.6: 523-530.
- Lacroix, M. (2008). Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer*, Vol. 122, No.1: 1-4.
- Lacroix, M. and Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 83, No.3: 249-289.
- Le, X. F., Mao, W., Lu, C., Thornton, A., Heymach, J. V., Sood, A. K. and Bast, R. C., Jr. (2008). Specific blockade of VEGF and HER2 pathways results in greater growth inhibition of breast cancer xenografts that overexpress HER2. *Cell Cycle*, Vol. 7, No.23: 3747-3758.
- Liscovitch, M. and Ravid, D. (2007). A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett*, Vol. 245, No.1-2: 350-352.
- Lo, R., Burgoon, L., Macpherson, L., Ahmed, S. and Matthews, J. (2010). Estrogen receptor-dependent regulation of CYP2B6 in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1799, No.5-6: 469-479.
- Macpherson, L. and Matthews, J. (2010). Inhibition of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription by resveratrol or kaempferol is independent of estrogen receptor alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett*, Vol. 299, No.2: 119-129.
- Matoska, J. and Stricker, F. (1967). Following human tumours in primary organ culture. *Neoplasma*, Vol. 14, No.5: 507-519.
- Mestres, P., Morguet, A., Schmidt, W., Kob, A. and Thedinga, E. (2006). A new method to assess drug sensitivity on breast tumor acute slices preparation. *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 1091: 460-469.
- Milani, C., Welsh, J., Katayama, M. L., Lyra, E. C., Maciel, M. S., Brentani, M. M. and Folgueira, M. A. (2010). Human breast tumor slices: a model for identification of

- vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, Vol. 121, No.1-2: 151-155.
- Mitra, R., Guo, Z., Milani, M., Mesaros, C., Rodriguez, M., Nguyen, J., Luo, X., Clarke, D., Lamba, J., Schuetz, E., Donner, D. B., Puli, N., Falck, J. R., Capdevila, J., Gupta, K., Blair, I. A. and Potter, D. A. (2011). CYP3A4 mediates growth of ER+ breast cancer cells, in part, by nuclear translocation of phospho-Stat3 through biosynthesis of (+/-)-14,15-EET. *J Biol Chem*, Vol.:
- Mo, S. L., Liu, Y. H., Duan, W., Wei, M. Q., Kanwar, J. R. and Zhou, S. F. (2009). Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. *Curr Drug Metab*, Vol. 10, No.7: 730-753.
- Nagaoka, R., Iwasaki, T., Rokutanda, N., Takeshita, A., Koibuchi, Y., Horiguchi, J., Shimokawa, N., Iino, Y., Morishita, Y. and Koibuchi, N. (2006). Tamoxifen activates CYP3A4 and MDR1 genes through steroid and xenobiotic receptor in breast cancer cells. *Endocrine*, Vol. 30, No.3: 261-268.
- Nelson-Rees, W. A. and Flandermeyer, R. R. (1977). Inter- and intraspecies contamination of human breast tumor cell lines HBC and BrCa5 and other cell cultures. *Science*, Vol. 195, No.4284: 1343-1344.
- Nissen, E., Tanneberger, S., Weiss, H. and Bender, E. (1983). [In vitro cultivation of vital tissue slices: a new variation of organ culture technics]. *Biomed Biochim Acta*, Vol. 42, No.7-8: 907-916.
- Nizamutdinova, I. T., Lee, G. W., Lee, J. S., Cho, M. K., Son, K. H., Jeon, S. J., Kang, S. S., Kim, Y. S., Lee, J. H., Seo, H. G., Chang, K. C. and Kim, H. J. (2008). Tanshinone I suppresses growth and invasion of human breast cancer cells, MDA-MB-231, through regulation of adhesion molecules. *Carcinogenesis*, Vol. 29, No.10: 1885-1892.
- Ozzello, L. and Sordat, M. (1980). Behavior of tumors produced by transplantation of human mammary cell lines in athymic nude mice. *Eur J Cancer*, Vol. 16, No.4: 553-559.
- Parajuli, N. and Doppler, W. (2009). Precision-cut slice cultures of tumors from MMTV-neu mice for the study of the ex vivo response to cytokines and cytotoxic drugs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, Vol. 45, No.8: 442-450.
- Pauley, R. J., Paine, T. J., Herbert, D. and Soule, D. N. (1991). Immortal Human Mammary Epithelial Cell Sublines. *United States Patent*, Patent n°. 5206165,
- Pennington, K., Chu, Q. D., Curiel, D. T., Li, B. D. and Mathis, J. M. (2010). The utility of a tissue slice model system to determine breast cancer infectivity by oncolytic adenoviruses. *J Surg Res*, Vol. 163, No.2: 270-275.
- Pinilla, S., Alt, E., Abdul Khalek, F. J., Jotzu, C., Muehlberg, F., Beckmann, C. and Song, Y. H. (2009). Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion. *Cancer Lett*, Vol. 284, No.1: 80-85.
- Rae, J. M., Creighton, C. J., Meck, J. M., Haddad, B. R. and Johnson, M. D. (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 104, No.1: 13-19.
- Rajendran, S., O'Hanlon, D., Morrissey, D., O'Donovan, T., O'Sullivan, G. C. and Tangney, M. (2011). Preclinical evaluation of gene delivery methods for the treatment of loco-regional disease in breast cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, Vol. 236, No.4: 423-434.
- Rooseboom, M., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. (2004). Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev*, Vol. 56, No.1: 53-102.
- Ross, D. T. and Perou, C. M. (2001). A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers*, Vol. 17, No.2: 99-109.
- Russell, W. M. S. and Bursch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, Methuen, 978-0900767784.

- Russo, I. H. and Russo, J. (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, Vol. 104, No.9: 938-967.
- Shen, C., Gu, M., Liang, D., Miao, L., Hu, L., Zheng, C. and Chen, J. (2009). Establishment and characterization of three new human breast cancer cell lines derived from Chinese breast cancer tissues. *Cancer Cell Int*, Vol. 9: 2.
- Skelding, K. A., Barry, R. D. and Shafren, D. R. (2009). Systemic targeting of metastatic human breast tumor xenografts by Coxsackievirus A21. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 113, No.1: 21-30.
- Sonnenberg, M., van der Kuip, H., Haubeis, S., Fritz, P., Schroth, W., Friedel, G., Simon, W., Murdter, T. E. and Aulitzky, W. E. (2008). Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast. *BMC Cancer*, Vol. 8: 364.
- Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Jr., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F. and Brooks, S. C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, Vol. 50, No.18: 6075-6086.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 51, No.5: 1409-1416.
- Spink, B. C., Cole, R. W., Katz, B. H., Gierthy, J. F., Bradley, L. M. and Spink, D. C. (2006). Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by MCF-10A breast epithelial cells in coculture. *Cell Biol Int*, Vol. 30, No.3: 227-238.
- Stampfer, M. R. (1989). Continuous human cell lines and method of making same. *United States Patent*, Patent n°. 4808532,
- Stiborova, M., Rupertova, M. and Frei, E. (2011). Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1814, No.1: 175-185.
- Van der Haegen, B. A. and Shay, J. W. (1993). Immortalization of human mammary epithelial cells by SV40 large T-antigen involves a two step mechanism. *In Vitro Cell Dev Biol*, Vol. 29A, No.3 Pt 1: 180-182.
- Van Der Kuip, H., Murdter, T. E., Sonnenberg, M., McClellan, M., Gutzeit, S., Gerteis, A., Simon, W., Fritz, P. and Aulitzky, W. E. (2006). Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer*, Vol. 6: 86.
- VanWeelden, K., Flanagan, L., Binderup, L., Tenniswood, M. and Welsh, J. (1998). Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D3 analog, EB1089. *Endocrinology*, Vol. 139, No.4: 2102-2110.
- Wang, H. and Tompkins, L. M. (2008). CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr Drug Metab*, Vol. 9, No.7: 598-610.
- Wang, Z., Bryan, J., Franz, C., Havlioglu, N. and Sandell, L. J. (2010). Type IIB procollagen NH(2)-propeptide induces death of tumor cells via interaction with integrins alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5). *J Biol Chem*, Vol. 285, No.27: 20806-20817.
- Yuhas, J. M., Tarleton, A. E. and Molzen, K. B. (1978). Multicellular tumor spheroid formation by breast cancer cells isolated from different sites. *Cancer Res*, Vol. 38, No.8: 2486-2491.
- Zhang, J., Tian, Q., Yung Chan, S., Chuen Li, S., Zhou, S., Duan, W. and Zhu, Y. Z. (2005). Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev*, Vol. 37, No.4: 611-703.



Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis

Edited by Prof. Mehmet Gunduz

ISBN 978-953-307-766-6

Hard cover, 584 pages

Publisher InTech

Published online 14, December, 2011

Published in print edition December, 2011

Cancer is the leading cause of death in most countries and its consequences result in huge economic, social and psychological burden. Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer type and the leading cause of cancer death among females. In this book, we discussed characteristics of breast cancer cell, role of microenvironment, stem cells and metastasis for this deadly cancer. We hope that this book will contribute to the development of novel diagnostic as well as therapeutic approaches.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Emilie Bana and Denyse Bagrel (2011). In Vitro Breast Cancer Models as Useful Tools in Therapeutics?, *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*, Prof. Mehmet Gunduz (Ed.), ISBN: 978-953-307-766-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-focusing-tumor-microenvironment-stem-cells-and-metastasis/in-vitro-breast-cancer-models-as-useful-tools-in-therapeutics->

INTECH
open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells

Nathaniel Edward Bennett Saidu^a, Sergio Valente^b, Emilie Bana^b, Gilbert Kirsch^b, Denyse Bagrel^b, Mathias Montenarh^{a,*}

^a Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of the Saarland, Building 44, 66424 Homburg, Germany

^b Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, Université Paul Verlaine-Metz, 1 Boulevard Arago, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2011

Revised 14 December 2011

Accepted 17 December 2011

Available online 30 December 2011

Keywords:

Coumarin polysulfides

Apoptosis

Cell cycle arrest

p53

Phosphatase

ABSTRACT

Coumarins and coumarin derivatives as well as diallyl polysulfides are well known as anticancer drugs. In order to find new drugs with anticancer activities, we combined coumarins with polysulfides in the form of di-coumarin polysulfides. These novel compounds were tested in the HCT116 colorectal cancer cell line. It turned out that they reduced cell viability of cancer cells in a time and concentration dependent manner. Cells tested with these coumarin polysulfides accumulate in the G₂/M phase of the cell cycle and finally they go into apoptosis. A decrease in bcl-2 level, and increase in the level of bax, cytochrome c release into the cytosol, cleavage of caspase 3/7 and PARP suggested that coumarin polysulfides induced the intrinsic pathway of apoptosis. Comparison of these new coumarin compounds with the well known diallyl polysulfides revealed that the coumarin disulfides were more active than the corresponding diallyl disulfides. The activities of the coumarin tetrasulfides and the corresponding diallyl tetrasulfides are similar. The novel coumarin compounds regulated the phosphatase activity of the cell cycle regulating cdc25 family members, indicating that these phosphatases are implicated in the induction of cell cycle arrest and possibly in apoptosis induction as well. In addition, coumarin polysulfides also down-regulated the level of cdc25C, which also contributed to the arrest in the G₂-phase of the cell cycle.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Natural as well as synthetic coumarins have recently drawn much attention due to their broad pharmacological activities. Coumarins bear a 2*H*-1-benzopyran-2-one as part of their structure.¹ They show a wide range of biological activities, for example, as antioxidants,² anticoagulants,³ antifungal agents,⁴ monoamine oxidase B (MAO-B) selective inhibitors,^{5,6} human acetylcholine esterase (hAChE) and beta-site amyloid precursor protein cleavage enzyme (BACE1) inhibitors,⁷ NFB inhibitors,⁸ Hsp90 inhibitors,⁹ HIV-1 integrase inhibitors^{10,11} and cdc25 phosphatases inhibitors.¹² Moreover, the coumarin scaffold has recently been reported to inhibit matrix metalloproteinase-7 expression,¹³ 17β-hydroxysteroid-dehydrogenase type 1 (17β-HSD1) activity,^{14,15} as well as cannabinoid receptor antagonists.¹⁶ The potential use of coumarin derivatives as anticancer agents has been well reviewed,¹⁷ and moreover recently new studies have highlighted the interesting role of coumarin analogues in cancer therapy.^{18–25} Therefore the coumarin scaffold remains of great interest for researchers.

Another class of compounds which are highly effective in affording protection against various cancers in animal models are the polysulfides. Organo sulfur compounds can afford protection against cancer induced by a variety of chemical carcinogens in animal models (for review see:²⁶). Diallyl sulfides in particular are known to prevent cancer by multiple mechanisms including impairment of carcinogen activation, inhibition of post-translational modifications of proteins, induction of apoptosis, histone modifications, inhibition of angiogenesis and metastasis (for review see:²⁷). It is also becoming clear that diallyl polysulfides in particular are promiscuous because they target multiple signal transduction pathways to trigger growth arrest and eventually apoptosis. The anti-proliferative effects of the polysulfides seem to be related to their capacity to cause oxidative damage by increasing the production of reactive oxygen species. Cells lacking antioxidant defences are quite susceptible to polysulfides, whereas, cells well equipped with antioxidant defences such as glutathione peroxidase, copper/zinc superoxide dismutase are resistant to at least diallyl disulfide.^{28,29} The number of sulfur atoms in the polysulfides seems to be critical for the activity of the compounds. Replacement of the sulfur atoms in diallyl sulfides by carbon atoms results in inactive molecules.³⁰ The presence of the allyl group generally enhances protection over that provided by the propyl moiety. In order to find new drugs with anticancer

* Corresponding author. Tel.: +49 6841 162 6502; fax: +49 6841 162 6027.

E-mail address: mathias.montenarh@uks.eu (M. Montenarh).

activities, we made use of both coumarin and polysulfide and designed the synthesis and biological evaluation of novel hybrid-type bis-coumarin polysulfides, as disulfur, trisulfur and tetrasulfur coumarins. These compounds were tested in human HCT116 colon cancer cells to assay the capability of inducing cell growth inhibition and apoptosis. We found that coumarin polysulfides effectively reduced cell viability in a concentration and time dependent manner. This reduction in cell viability is accompanied by cell cycle arrest in the G₂-phase of the cell cycle and induction of apoptosis. Down-regulation of the cdc25 phosphatase activity and the level of cdc25C protein seem to be responsible at least for the cell cycle arrest. A decrease in the level of bcl-2 and an increase in the level of bax, release of cytochrome c into the cytosol, caspase 3/7 activation and PARP cleavage strongly argue for the induction of the intrinsic pathway of apoptosis.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of coumarin sulfides

The solvents used for the synthesis of coumarin sulfides were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and the reactives from Acros Organics (Illkirch, France). Melting points were determined with a Stuart SMP3 apparatus and are uncorrected. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker AC 250 MHz spectrometer in CDCl₃ or DMSO-*d*₆. Mass spectra were recorded with a MicroTof-Q 98. Chemical shifts are reported in δ (ppm) units relative to the internal reference tetramethylsilane (Me₄Si). All reactions were routinely checked by TLC. TLC was performed on aluminum-backed silica gel plates (Merck DC, Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄) with spots visualized by UV light. Tetrahydrofuran was distilled from sodium and benzophenone (Scheme 1).

2.2. Synthesis of 4-mercaptomethylchromen-2-one (2)

An equimolar mixture of 4-chloromethylcoumarin **1** (4.45 mmol, 1 g) and thiourea (4.45 mmol, 0.339 g) was stirred in ethanol/diethylether (1:1) mixture at room temperature for 2 h and then refluxed on a steam-bath overnight. After the separated solid was filtered, washed with diethylether (3 × 20 ml), dissolved in 5% NaOH (15 ml), filtered and the filtrate was re-precipitated with 2 N HCl. The solid was washed with water (3 × 15 ml) and diethylether (3 × 15 ml) to provide pure **2** as a colorless solid that was recrystallized in ethanol; mp: 150–152; Yield: 75%; ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.78–1.84 (t, 1H, –SH), 3.70–3.74 (d, 2H, –CH₂SH), 3.85 (s, 3H, –OCH₃), 6.25 (s, 1H, –CHCOO–), 6.77–6.84 (m, 2H, benzene protons), 7.47–7.51 (d, 1H, benzene proton) ppm; ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 25.11, 55.81, 101.24, 111.27,

112.56, 125.22, 153.98, 155.86, 161.16, 162.84 ppm; HRMS (ESI) [M+Na]⁺ C₁₀H₈NaO₂S calcd 215.0245, found 215.0250.

2.3. Synthesis of 4,4'-disulfanediylbis(methylene)bis(2H-chromen-2-one) (SV25)

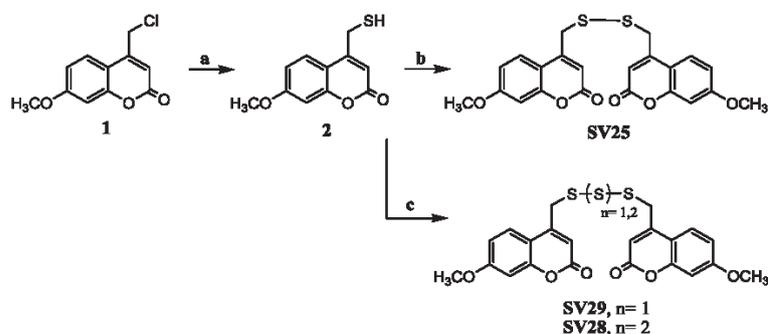
A suspension of 4-mercaptomethylcoumarin (0.90 mmol, 0.2 g) and manganese dioxide (4.50 mmol, 0.391 g) in tetrahydrofuran (10 ml) was refluxed for 1 h. The solid was then filtered and the filtrate was concentrated and recrystallized by EtOH to obtain pure SV25 as a pale yellow solid; mp: 140–142 °C; Yield: 72%; ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.85 (s, 6H, –OCH₃), 4.06 (s, 4H, –CH₂S–), 6.09 (s, 2H, –CHCOO–), 6.91–6.99 (m, 4H, benzene protons), 7.75–7.79 (d, 2H, benzene protons) ppm; ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 39.07, 55.85, 101.53, 110.83, 112.20, 113.21, 125.52, 149.52, 155.79, 160.37, 163.01 ppm; HRMS (ESI) [M+Na]⁺ C₂₂H₁₈NaO₆S₂ calcd 465.0545, found 465.0551.

2.4. General procedure for the synthesis of 4,4'-tri- and tetrasulfanediylbis(methylene)bis(7-methoxy-2H-chromen-2-one) (SV29 and SV28) Example: synthesis of 4,4'-trisulfanediylbis(methylene)bis(7-methoxy-2H-chromen-2-one) (SV29)

N,N-diisopropylethylamine (0.81 mmol, 0.14 ml), and sulfur dichloride (0.337 mmol, 0.021 ml) were added at 0 °C to a solution of 4-mercaptomethylchromen-2-one **2** (0.675 mmol, 0.150 g) in tetrahydrofuran (10 ml) and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction was then quenched by water (50 ml) and the precipitate was filtered, washed with water (3 × 10 ml), diethylether (3 × 10 ml) and thereafter, recrystallized in EtOH/THF; mp: 153–155; Yield: 68%; ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.85 (s, 6H, –OCH₃), 4.06 (s, 4H, –CH₂S–), 6.09 (s, 2H, –CHCOO–), 6.91–6.99 (m, 4H, benzene protons), 7.75–7.79 (d, 2H, benzene protons) ppm; ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 39.07, 55.85, 101.53, 110.83, 112.20, 113.21, 125.52, 149.52, 155.79, 160.37, 163.01 ppm; HRMS (ESI) [M+Na]⁺ C₂₂H₁₈NaO₆S₃ calcd 497.0266, found 497.0270. For SV28: recrystallized by EtOH/THF; mp: 126–128; Yield: 73%; ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.85 (s, 6H, –OCH₃), 4.06 (s, 4H, –CH₂S–), 6.09 (s, 2H, –CHCOO–), 6.91–6.99 (m, 4H, benzene protons), 7.75–7.79 (d, 2H, benzene protons) ppm; ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 39.07, 55.85, 101.53, 110.83, 112.20, 113.21, 125.52, 149.52, 155.79, 160.37, 163.01 ppm; HRMS (ESI) [M+Na]⁺ C₂₂H₁₈NaO₆S₄ calcd 528.9884, found 528.9889.

2.5. Reagents and antibodies

Protease inhibitor cocktail Complete™ was purchased from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, *N*-acetyl cysteine (NAC)



Scheme 1. Reaction scheme for the synthesis of coumarin sulfides. Reagents and conditions: (a) (1) thiourea, EtOH/Et₂O, reflux, overnight; (2) 2 N NaOH; (3) 2 N HCl; (b) MnO₂, dry THF, 70 °C, 1 h; (c) Et₃N, sulfur dichloride or disulfur dichloride, 0 °C, 1 h.

and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Antibodies against p53, bax, bcl-2, cdc25C (H6), cytochrome *c* and GAPDH were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibody against caspase 3/7 was purchased from Promega (Mannheim, Germany). Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and a rabbit serum against nucleolin was prepared in our laboratory.³¹

2.6. Cell culture

p53-Positive HCT116 cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in McCoy's 5A medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) with 10% fetal calf serum (FCS). LNCaP cells were cultured to obtain positive control lysates for apoptosis induction. These cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Coumarin polysulfides and diallyl polysulfides were dissolved in DMSO to a 80 mM stock solution, which was freshly prepared before use. NAC was dissolved in distilled water to a 80 mM stock solution and applied to the cell culture medium 0.5 h (unless otherwise stated) before treatment. Doxorubicin was dissolved in distilled H₂O to a stock solution (10 mg/ml). Cells were treated with the coumarin polysulfides or doxorubicin at the indicated final concentrations for different times.

2.7. Evaluation of cell viability

In order to determine the effect of coumarin polysulfides on HCT116 colorectal cells, cells were seeded at 1×10^4 cells per well to a final volume of 500 μ l in a 24-well plate and incubated overnight. Cells were then incubated in various concentrations of coumarin polysulfides for 8, 24 and 48 h. Viability of the cells was determined by a colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay according to the manufacturer's instructions. One hour before the end of treatment, 50 μ l MTT (5 mg/ml PBS) were added. The enzymatic reaction took place at 37 °C in a humidified atmosphere. Following 1 h MTT treatment, medium was disposed off and cells solubilized by adding 500 μ l solubilizing solution (0.05% (w/v) SDS in DMSO and 0.01% acetic acid) to each well and allowing the crystals to completely dissolve. The spectrophotometrical absorbance of the purple-blue formazan dye was determined in an ELISA reader at 595 nm.

2.8. Cell cycle analysis

HCT116 cells (5×10^4) were allowed to grow on a 10 cm petri dish overnight. The medium was changed and cells were treated with 0 (control), 25 or 50 μ M SV29 and incubated for 24 h. Cells were collected and washed two times with cold PBS before being resuspended in PBS and fixed with 70% ethanol. The cells were further incubated with RNase and propidium iodide to label DNA as previously described.³⁰ Cells were then analyzed in a cytofluorimeter (Guava easyCyte HT system, Millipore) according to the manufacturer's instructions.

2.9. Treatment with antioxidant

To explore the effects of antioxidants on coumarin polysulfide-induced apoptosis, HCT116 cells were pretreated with 5 mM NAC for 0.5 h prior to exposure to 50 μ M SV29.

2.10. Extraction of cellular proteins

Following incubation of HCT116 cells with coumarin polysulfides, cells were resolved in cold phosphate buffered saline (PBS,

pH 7.4) and centrifuged together with the cell culture medium at 4 °C and 250 \times g for 7 min. After one washing step with cold PBS, cells were resolved in 50–150 μ l RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% sodium desoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete™ according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The cell lysate was left on ice for 15 min, subjected to sonification (3 \times 1 min) at 4 °C and then the pellet removed by centrifugation at 16250 \times g at 4 °C for 30 min. The protein content of the supernatant was determined according to the Bradford method using the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, Munich, Germany).

For caspase 3/7 analysis, the modified technique described in Ref. 32 was used. In brief, cells were harvested and extracted for 5 min on ice in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10 mM DTT) supplemented with the protease inhibitor cocktail Complete™. Lysates were centrifuged for 10 min at 7,000 rpm at 4 °C and the supernatants were removed and assayed for protein content.

Cytosolic extracts for cytochrome *c* release were generated by resolving treated cells in cold phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and centrifuged together with the cell culture medium at 4 °C and 250 \times g for 7 min. The pellets were further resuspended in cold PBS and snap frozen in liquid nitrogen. Cellular fragments were removed by centrifugation at 12500 \times g at 4 °C for 10 min. Extracts were immediately used for Western blot analysis or stored at –20 °C (for the short term) or –80 °C (for the long term).

2.11. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis

Proteins of total cell extract (50–100 μ g) were separated by size using a 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Following electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) by tank blotting with 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 150 mM glycine as transfer buffer. To ensure equal loading of samples, GAPDH or nucleolin was used as a control. Subsequent immunoblotting was performed by blocking non-specific binding regions of the membrane with 5% skimmed milk in PBS with 0.1% Tween-20 for 1 h at room temperature. The rabbit polyclonal anti-PARP, anti-cdc25C (H6), monoclonal anti-bax, anti-bcl-2, anti-cytochrome *c* and rabbit monoclonal anti-caspase 3 antibodies were each separately used in a dilution of 1:1000 overnight with gentle shaking at 4 °C. The mouse monoclonal p53 (DO-1), rabbit polyclonal GAPDH and the rabbit serum nucleolin antibodies were also used in a dilution of 1:1000 at room temperature for 1 h. After washing (3 \times 10 min) the membranes with PBS-Tween-20 containing 1% skimmed milk, they were then incubated with their respective peroxidase-coupled secondary antibodies in appropriate dilutions at room temperature. The membranes were further washed (3 \times 10 min) in PBS-Tween-20. Signals were developed and visualized by the Lumilight system of Roche Diagnostic (Mannheim, Germany).

2.12. In vitro phosphatase assay for cdc25

The enzymatic activity of the GST-cdc25 recombinant enzyme was evaluated by fluorimetric assay and was performed in 96-well plates in a specific reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, pH 8.1) containing 3-*O*-methylfluorescein phosphate (500 μ M) as substrate. The GST-cdc25 proteins, diluted in assay buffer, were used at a final concentration of 1 μ g/well. 3-*O*-Methylfluorescein fluorescent emission was measured every 20 minutes for 2 h at 30 °C with a CytoFluor system Perseptive Applied Biosystems; excitation filter: 475 nm and emission filter: 510 nm.

3. Results

Recently we have shown that treatment of tumor cells with diallyl sulfides reduced their viability considerably depending on the length of the sulfur chain.^{30–33} Now, we tested the newly designed and synthesized coumarin polysulfides SV25, SV28 and SV29 (Fig. 1A) for their effect on HCT116 cells in different concentrations as 12.5, 25, 50, 100 and 200 μ M. As a control, we treated cells with the solvent DMSO alone. Cell viability was measured with an MTT assay. As shown in Figure 1B using 25 μ M SV25, SV28 or SV29 for 24 h led to reduction in cell viability by 30%, 18% or 22%, respectively. At a concentration of 50 μ M, cell viability was reduced to around 50%; at higher concentrations, there was only a slightly further reduction in cell viability. In order to analyze a time dependency of the treatment, cells were incubated with 50 μ M SV25, SV28 or SV29 for 8, 24 and 48 h and then cell viability was measured by an MTT assay as shown in Figure 1B and C. The graphs shown in Figure 1C demonstrate that cell viability was already reduced to around 50% after 24 h treatment and further reduced to around 20% viability after 48 h. Thus, these experiments showed a dosage and a time dependent effect of all three coumarin polysulfides.

Furthermore, in our cell viability studies, we found no significant difference between cells treated with SV25, SV28 and SV29; therefore, in subsequent experiments we treated the cells with only SV29 or SV25 and SV29 at different times.

Since reduced cell viability might be due to cell cycle arrest, we addressed the question whether coumarin polysulfide treated cells arrest in G₁- or G₂-phase of the cell cycle. For this, we treated HCT116 cells with 0, 25 or 50 μ M SV29 for 24 h. Cells were harvested and incubated with propidium iodide to label DNA. Cells were then analyzed in a cytofluorimeter. As shown in Figure 2, SV29 treated cells clearly accumulated in the G₂-phase (63%). Moreover, cells in sub G₁-phase indicated that cells might also go into apoptosis. Untreated HCT116 cells showed a normal cell cycle profile with about 63% of the cells in G₁-phase, around 5% in S-phase and about 24% of cells in G₂-phase.

Since we detected a sub G₁-fraction, we then analyzed whether coumarin polysulfides might indeed induce apoptosis. Therefore, in this study, we treated HCT116 cells with SV25 and SV29 for different time periods. Cells were then lysed and the cell extract transferred onto a 12% SDS–polyacrylamide gel. After transfer to a PVDF membrane, the filter was incubated with antibodies directed against PARP. Starting at 24 h after treatment of the cells with the coumarin polysulfides, we observed cleavage of PARP with a molecular weight of 116 kDa into the 89 kDa cleavage products (Fig. 3). In agreement with these data, we also observed an increase in the level of γ H₂AX, which detects DNA double strand breaks and is a further indication of apoptosis (data not shown). In order to support our conclusion about apoptosis induction, we repeated the experiment described above, but since we found no significant difference between the cells treated with SV25, SV28 and SV29, we

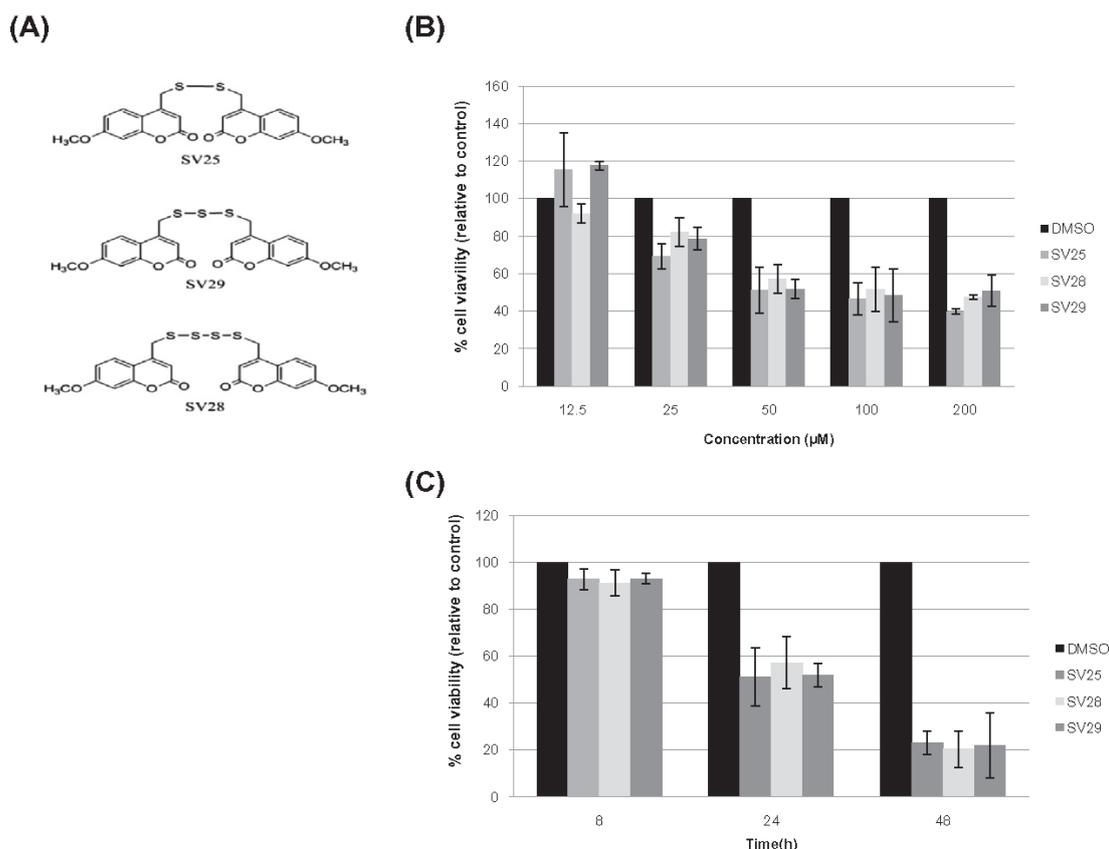


Figure 1. Coumarin polysulfides affect the viability of HCT116 cells in both time and dosage dependent manners. (A) Structures of three of the compounds synthesized—4,4'-disulfanediyldis(methylene)bis(2H-chromen-2-one) (SV25), 4,4'-trisulfanediyldis(methylene)bis(2H-chromen-2-one) (SV29) and 4,4'-tetrasulfanediyldis(methylene)bis(2H-chromen-2-one) (SV28). (B) Cells were seeded in 24-well plates and treated with 0.05% DMSO as a control or 12.5, 25, 50, 100 or 200 μ M SV29 for 24 h. Afterwards, MTT assay was done to determine the number of viable cells. (C) Cells were seeded in 24-well plates and treated with 50 μ M SV25, SV28, SV29 or 0.05% DMSO for 8, 24 and 48 h. Afterwards, MTT assay was used to determine the number of viable cells as in (B). Data are depicted as means \pm SD, (n = 3).

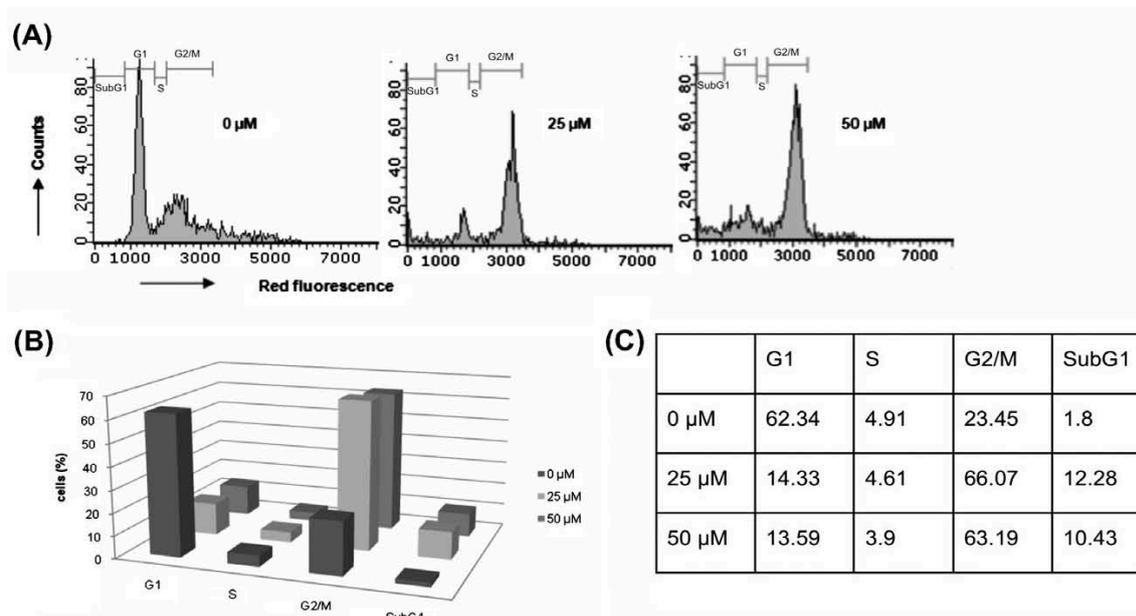


Figure 2. Influence of SV29 on cell cycle distribution. HCT116 cells were treated for 24 h with 0, 25 or 50 μM SV29 and then analyzed by FACS. (A) Cytofluorimetric analysis of the treated cells. (B) Percentage distribution of cells in different cell cycle phases. (C) Data for (B). One representative of at least three similar independent experiments is shown here.

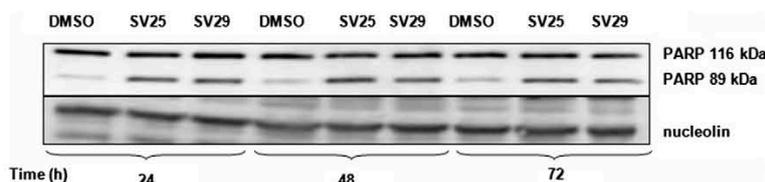


Figure 3. Coumarin polysulfides induce PARP cleavage. HCT116 cells were treated for 24, 48 and 72 h with 0.05% DMSO as a control or 50 μM SV25 or SV29 and cell extracts were treated for PARP cleavage using SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting. Total protein extract (75 μg) was separated on a 7.5% SDS–polyacrylamide gel, blotted on a PVDF membrane and PARP was detected using the corresponding antibody. Nucleolin was used as a loading control.

performed the experiment with only SV29. Western blot analysis showed a decrease in the level of the anti-apoptotic bcl-2 protein (Fig. 4A), and an increase in the level of the pro-apoptotic bax protein (B) in a time dependent manner. An antibody against GAPDH was used as a loading control. Since mitochondrial cytochrome *c* release is regulated by a decrease in the bcl-2 level, we analyzed the cytochrome *c* release into the cytosol after treatment of the cells with coumarin polysulfides. Accordingly, an increase in cytosolic cytochrome *c* was detected after treatment (Fig. 4C). Finally, we analyzed caspase 3/7 activation after treatment of HCT116 cells with coumarin polysulfides. After 24 and 48 h treatment, we detected an activation of caspase 3/7 (Fig. 4D). LNCaP cells treated with doxorubicin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) served as a positive control for caspase activation. Thus, from these results we are convinced that apoptosis is induced in HCT116 cells after treatment with coumarin polysulfides. Furthermore, the reduction in bcl-2, the increase in bax, cytochrome *c* release and caspase 3/7 cleavage all clearly argue for the induction of the intrinsic pathway of apoptosis.

Coumarin polysulfides like other polysulfides might induce reactive oxygen species (ROS). In order to evaluate the contribution of ROS to the coumarin polysulfide induced apoptosis, we treated HCT116 cells with SV29 in the absence or in the presence of N-acetyl cysteine (NAC). Cells were lysed and then the cell extract

analyzed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blot with a PARP specific antibody. As shown in Figure 4E, SV29 induced PARP cleavage already after 24 h and also after 48 and 72 h. In the presence of NAC, however, there was no cleavage of PARP, indicating that NAC prevented apoptosis (Fig. 4E). Thus, these results indicated that ROS might contribute to the coumarin polysulfides induced apoptosis.

In order to evaluate the potential of the coumarin polysulfides, we compared their activities with those of the well characterized diallyl polysulfides (Fig. 5A). We therefore treated HCT116 cells with the coumarin disulfide (SV25) or with the diallyl disulfide (Al_2S_2) or in a second set of experiments with coumarin tetrasulfide (SV28) or with diallyl tetrasulfide (Al_2S_4). After 24 h or 48 h, cell viability was measured with an MTT assay. As shown in Figure 5B, SV25 reduced cell viability more efficiently than the corresponding diallyl disulfide, whereas, the corresponding tetrasulfides exhibited nearly the same activity. Thus, this result indicated that the activity of the coumarin derivatives is not dependent on the length of the sulfur chain as it is the case for the diallylpolysulfides. This result also supports the observation shown in Figure 1B.

To analyze whether this behavior might also lead to a more efficient apoptosis induction, we treated HCT116 cells with SV25 or with Al_2S_2 . After 24 or 48 h of treatment, cells were extracted and

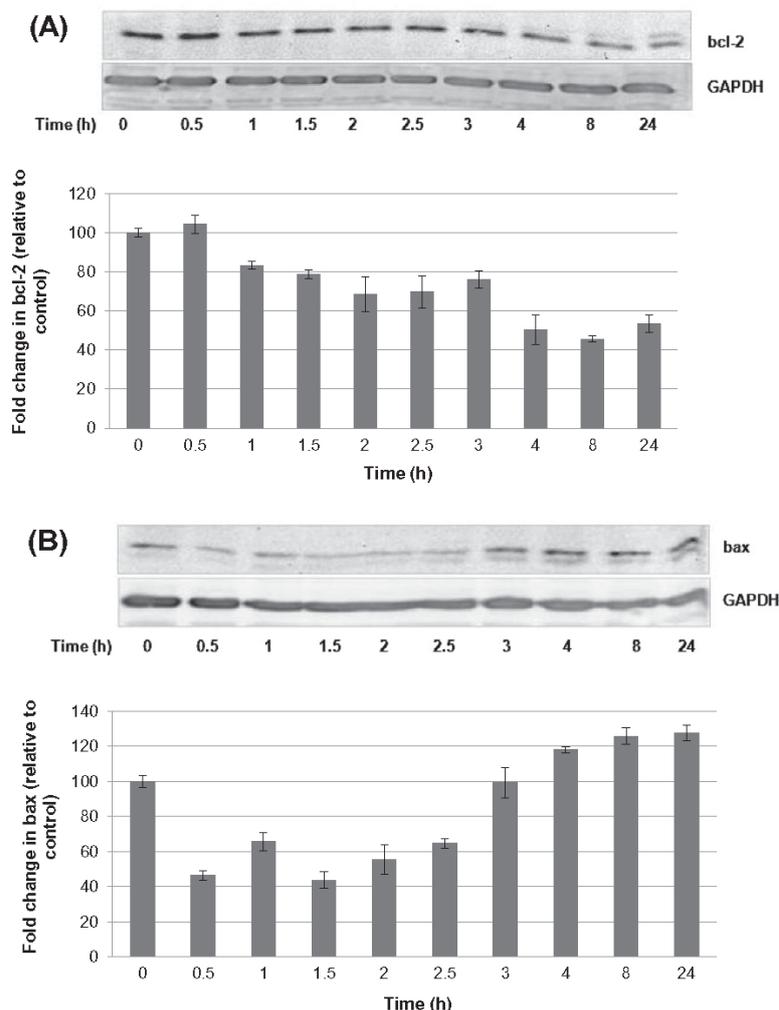


Figure 4. SV29 modulates bcl-2 and bax expression, induces cytochrome c release and activates caspase 3/7 in HCT116 cells. HCT116 cells were untreated (0 h) or treated with SV29 for 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 8 and 24 h, and protein expression was studied by Western blotting. The proteins (50 μ g) were separated on a 12.5% SDS–polyacrylamide gel, blotted on a PVDF membrane and bcl-2 (A), bax (B) or cytochrome c (C) was visualized with the appropriate antibody. For (D), HCT116 cells were treated with 0 or 50 μ M SV29 for 24 and 48 h. As a positive control, LNCaP cells were treated with 20 μ g/ml doxorubicin for 24 h or left untreated. Caspase activation was analyzed by Western blot. Cell lysates were separated by electrophoresis as in (A). Full-length caspase 3 and its cleavage products were detected with a caspase 3-specific antibody. One representative of at least 3 Western blots is shown here. NAC pretreatment reduces coumarin polysulfide-mediated apoptosis in HCT116 cells. Pretreatment of HCT116 colon cancer cells with NAC at a concentration of 5 mM for 0.5 h before treatment with 50 μ M SV29 prevented PARP cleavage (E). HCT116p53wt cells were treated for 24, 48 and 72 h with 0.05% DMSO, or 50 μ M SV29 and cell extracts were treated for PARP cleavage using SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting. Total protein extract (75 μ g) was separated on a 7.5% SDS–polyacrylamide gel, blotted on a PVDF membrane and PARP was detected using the corresponding antibody. Nucleolin or GAPDH were used as a loading control.

the cell extract analyzed on a SDS–polyacrylamide gel followed by Western blot analysis for PARP cleavage. As shown in Figure 5C, the PARP cleavage product was clearly detectable for SV25 after 24 h and even more after 48 h. In contrast only a very faint protein band for the cleavage product was found for Al₂S₂. This result supported the observation that the coumarin disulfide was more active inducing apoptosis than the corresponding diallyl disulfide.

p53 is known to be a key player in the regulation of life and death of a cell. Therefore, we asked whether we could detect an increase in p53 protein expression after incubation of the cells with SV25 and SV29. After incubating the cells for different time periods from 8 to 48 h with SV25 and SV29, cells were lysed and p53 analyzed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blot with a p53 specific antibody (DO1). GAPDH was used

as a loading control. Figure 6 shows an increase in the level of p53 over the indicated time periods following treatment.

Since cdc25C is one of the key enzymes responsible for G₂–M phase transition,³⁴ we tested whether the coumarin polysulfides might influence the level of cdc25C and its activity. HCT116 cells were incubated for various time periods with SV29. Cells were extracted and the cell extract analyzed on a 10% SDS–polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a membrane and blotted with the cdc25C specific antibody H6. As shown in Figure 7A, we found a time dependent decrease in the level of cdc25C. In the next step, we analyzed whether coumarin polysulfides might also influence the phosphatase activity. For this type of analysis, we used the human glutathione-S-transferase (GST)–cdc25 recombinant enzyme which was prepared as previously described.³⁵ We tested the

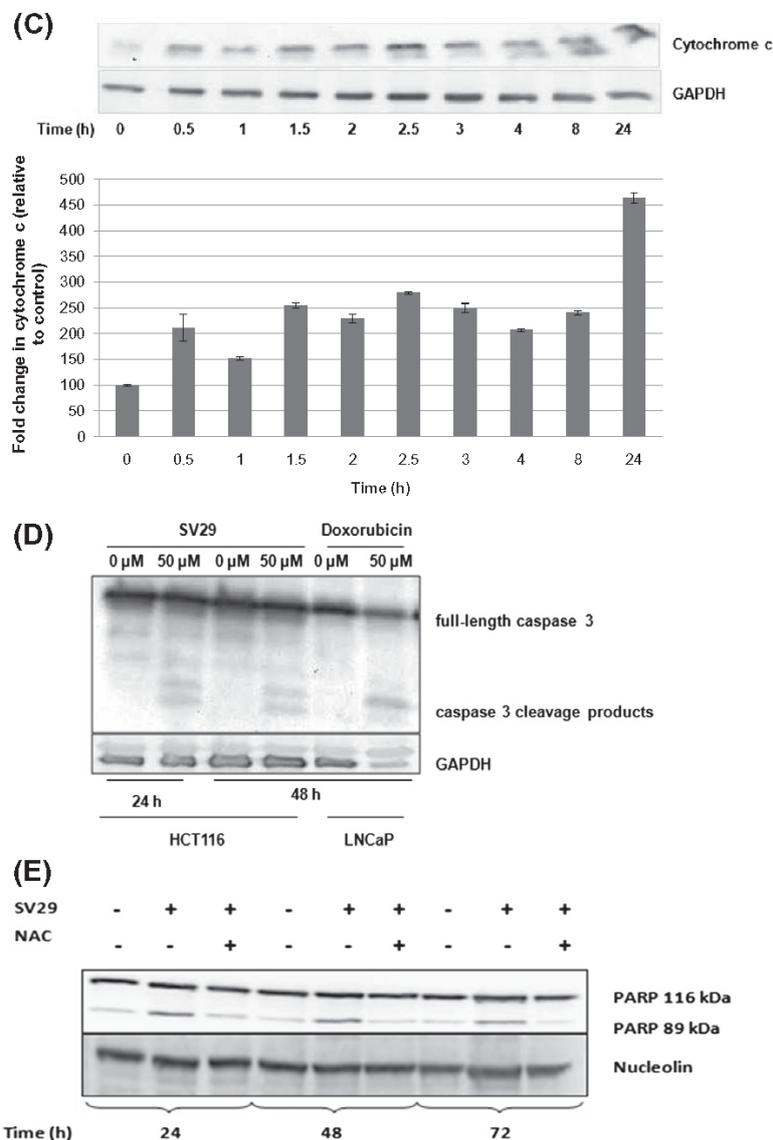


Fig. 4 (continued)

inhibitory potential of coumarin polysulfides, SV25, SV28, SV29, and compared this to BN82002 (Sigma–Aldrich), used as reference inhibitor drug. The inhibitory activity was compared to that of DMSO (i.e., expressed as a percentage relative to DMSO control). As shown in Figure 7B, these compounds were able to inhibit cdc25 phosphatase activity. Specifically, the disulfide (SV25) and the trisulfide (SV29) were able to inhibit cdc25A and cdc25C. However, the progressive introduction of sulfur atoms increased the inhibiting activity of such molecules, showing the tetrasulfide to be more potent than the trisulfide, and the trisulfide more potent than the disulfide.

All three polysulfides were less active than the established cdc25 inhibitor BN82002 (Fig. 7B). Nevertheless, we were able to show that the coumarin polysulfides down-regulated the level cdc25C and also the phosphatase activity of cdc25C and cdc25A, which might be both responsible for the G₂-arrest of the cells.

4. Discussion

Coumarins have a long history as anticancer agents (for review see:¹⁷). On the other hand diallyl polysulfides are among the most studied organosulfur compounds from garlic which are known to be highly effective in affording protection against various cancers in animal models.²⁶ Most of the experiments published up to now are performed with diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide whereas, the corresponding tetrasulfide was almost recently used. Beside allyl groups, propyl groups were also attached to the sulfur chain.³⁶ In order to combine the power of coumarins with those of polysulfides, here, for the first time we described the synthesis of dicoumarin polysulfides as di-, tri- and tetrasulfides. Synthesis of the coumarin polysulfides as described here is similar to the method described by Derbesy and Harpp.³⁷ Treatment of the colon carcinoma cell line HCT116 with coumarin polysulfides,

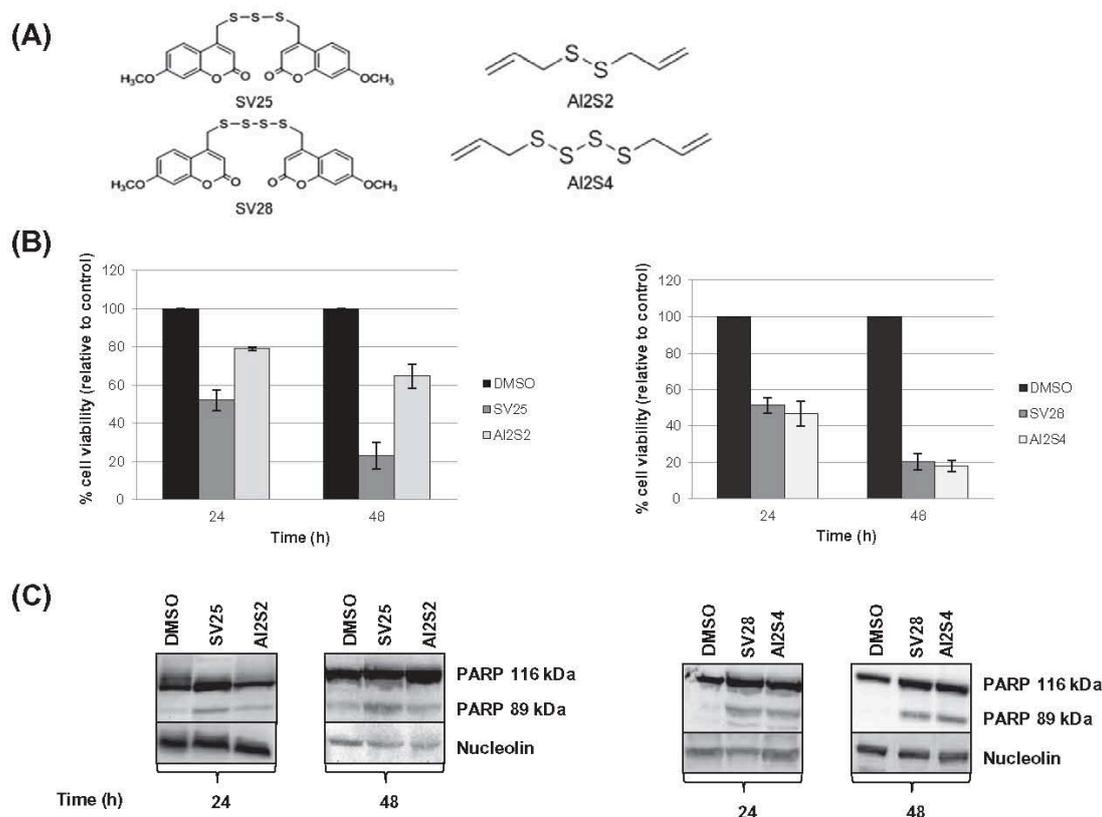


Figure 5. Coumarin polysulfides compared with diallyl polysulfides. (A) structures of two of the newly synthesised compounds—4,4'-disulfanediybis(methylene)bis(2H-chromen-2-one) (SV25), and 4,4'-tetrasulfanediybis(methylene)bis(2H-chromen-2-one) (SV28) with their corresponding well characterized diallyl polysulfides—diallyl disulfide (Al₂S₂) and diallyl tetrasulfide (Al₂S₄). (B), Cells were seeded in 24-well plates and treated with 0.05% DMSO as a control, 50 μ M SV25 or 50 μ M Al₂S₂ for 24 h or 48 h. In a second set of experiments, cells were treated with 0.05% DMSO as a control, 50 μ M SV28 or Al₂S₄ for 24 h or 48 h. Afterwards, MTT assay was done to determine the number of viable cells in both set of experiments as in Figure 1B. Data are depicted as means \pm SD, ($n = 3$). (C), HCT116 cells were treated for 24 or 48 h with 0.05% DMSO as a control, 50 μ M SV25 or Al₂S₂ for 24 h or 48 h. In a second set of experiments, cells were treated with 0.05% DMSO as a control, 50 μ M SV28 or Al₂S₄ for the same time periods. (D) Cell extracts were treated for PARP cleavage as in Figure 3. Nucleolin was used as a loading control.

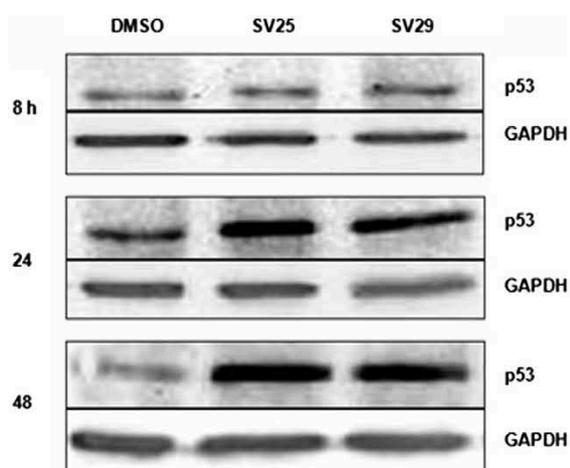


Figure 6. Coumarin polysulfides induce p53 expression in HCT116 cells. HCT116 cells were treated for 8, 24 and 48 h with 0.05% DMSO as a control or 50 μ M SV25 or SV29, and p53 protein expression was studied by Western blotting. Total proteins (50 μ g) from the cell extract were separated on a 12.5% SDS–polyacrylamide gel, blotted on a PVDF membrane and p53 was visualized with the mouse monoclonal p53 (DO-1) antibody. One representative of at least 3 Western blots is shown here.

resulted in reduced cell viability as shown in Figure 1. The coumarin disulfide, trisulfide and the tetrasulfide were nearly equally active, whereas, in the case of the diallyl polysulfides, the trisulfide is more active than the disulfide and the tetrasulfide is more active than the trisulfide. These differences in the activities were shown in a direct comparison of the corresponding disulfides and tetrasulfides. The coumarin disulfide was considerably more active than the corresponding diallyl disulfide, whereas, the activities of the coumarin tetrasulfide and that of the diallyl tetrasulfide are comparable. All three coumarin derivatives acted in a time and concentration dependent manner.

A decrease in cell viability may result in apoptosis which may be induced via an extrinsic or an intrinsic or mitochondria-mediated pathway. The intrinsic pathway is regulated by the anti-apoptotic bcl-2 family of proteins and by the pro-apoptotic bax protein. Here, we show a decrease of the level of bcl-2 and an increase in the level of bax after incubation of HCT116 cells with coumarin polysulfides indicating that the coumarin polysulfides act via the intrinsic pathway of apoptosis. Moreover, we observed a cytochrome *c* release from the mitochondria after treatment of HCT116 cells with coumarin polysulfides, further supporting the idea of the induction of the intrinsic pathway of apoptosis. Apoptosis was further documented by PARP cleavage as a final step in apoptosis. These observations are in agreement with the results

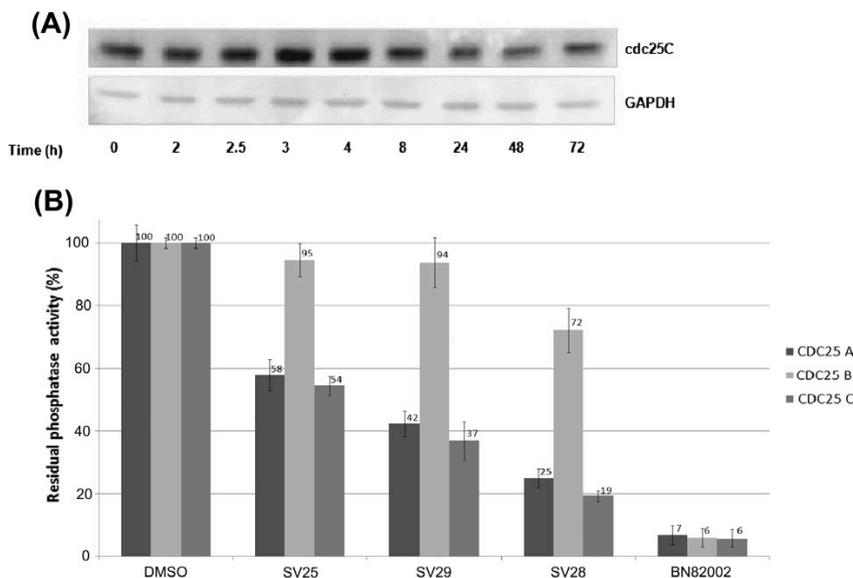


Figure 7. Coumarin polysulfides down-regulate *cdc25C* expression in HCT116 cells and inhibit the phosphatase activity of recombinant *cdc25C* phosphatase. (A) HCT116 cells were treated with 50 μM SV29 and *cdc25C* protein expression was determined by Western blotting. Total protein extract (50 μg) was separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel, blotted on a PVDF membrane and *cdc25C* was detected using anti-*cdc25C* (H6) antibody. GAPDH was used as a loading control. (B) Residual activity of *cdc25* phosphatases was measured by a dephosphorylation assay with 3-O-methyl fluorescein phosphate following incubation with 100 μM SV25, SV29 and SV28. DMSO treated cells were set 100%.

showing that bcl-2 overexpression confers protection against diallyl polysulfide induced apoptosis³⁸ at least in prostate cancer cells.

The apoptotic effects of the polysulfides seem to be in part due to their capacity to cause oxidative damage by increasing the production of reactive oxygen species. Diallyl disulfides can undergo a network of different redox reactions as described by Jacob.³⁹ These redox reactions can include one- or two-electron and radical reactions. Furthermore, polysulfides can coordinate metal ions. Here we show that *N*-acetyl-cysteine-(NAC) prevented the coumarin polysulfide induced apoptosis.

There are contradictory results concerning the role of p53 in diallyl polysulfide induced apoptosis in human colon cancer cells. Song *et al.* reported no change in the expression level of p53 by less than 12 h post-exposure⁴⁰ whereas Busch *et al.* found an increase in the p53 level.³⁰ Furthermore, down-regulation of p53 siRNA prevented apoptosis after diallyl polysulfide treatment. Here, we have shown that coumarin polysulfides induced an increase in the p53 level between 8 and 72 h after treatment. On the other hand, HCT116 cells lacking p53 were also stimulated to apoptosis by diallyl polysulfides indicating that p53 might be implicated in apoptosis induction but it also seems to be dispensable.³⁰

Knowles and Milner were the first to show that diallyl disulfide caused an accumulation in the G₂/M phase of the cell cycle.^{41,42} Here, we show that the coumarin polysulfides also caused a growth arrest in the G₂-phase of HCT116 cells. We further show that the growth arrest was accompanied by a decrease in the level of the *cdc25C* phosphatase which is in agreement with data published for diallyl disulfide.^{30,42,43} In addition to the down-regulation of the level of *cdc25C*, we also found that coumarin polysulfides directly inhibited the phosphatase activity of purified *cdc25C* and also the other family members, namely *cdc25A* and *cdc25B*. As shown by Viry *et al.*⁴⁴, this inhibitory activity increased with the length of the sulfur chain. *cdc25C* phosphatases contain an active-site cysteine. It has been shown that redox reactions of active-site cysteines serve as a form of reversible regulation of *cdc25s*. Furthermore, it has been shown that the active-site cysteines of *cdc25s* are highly susceptible to oxidation.⁴⁵ Thus, it might

well be that coumarin polysulfides directly target the active centres of the *cdc25* family of phosphatases. Down-regulation of the *cdc25s* as well as inhibition of the phosphatase activities are probably both responsible for the observed growth arrest of the cells in G₂-phase of the cell cycle.

5. Conclusion

The newly synthesized di-coumarin polysulfides are potent agents which induce cell cycle arrest in the G₂/M phase. This cell cycle arrest is due to a down-regulation of the level and the activity of *cdc25C*. Furthermore treatment of colon cancer cells with these new polysulfides resulted in the induction of the intrinsic pathway of apoptosis. Thus, coumarin polysulfides are promising new anti-cancer agents.

References and notes

- Kostova, I. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 29.
- Kostova, I. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 365.
- Wu, L.; Wang, X.; Xu, W.; Farzaneh, F.; Xu, R. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4236.
- Curir, P.; Galeotti, F.; Dolci, M.; Barile, E.; Lanzotti, V. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1668.
- Pisani, L.; Muncipinto, G.; Miscioscia, T. F.; Nicolotti, O.; Leonetti, F.; Caito, M.; Caccia, C.; Salvati, P.; Soto-Otero, R.; Mendez-Alvarez, E.; Passeleu, C.; Carotti, A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6685.
- Matos, M. J.; Vina, D.; Picciau, C.; Orallo, F.; Santana, L.; Uriarte, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5053.
- Piazzi, L.; Cavalli, A.; Colizzi, F.; Belluti, F.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Recanatini, M.; Andrisano, V.; Rampa, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 423.
- Appendino, G.; Maxia, L.; Bascope, M.; Houghton, P. J.; Sanchez-Duffhues, G.; Munoz, E.; Sterner, O. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1101.
- Donnelly, A.; Blagg, B. S. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2702.
- Reddy, M. V.; Rao, M. R.; Rhodes, D.; Hansen, M. S.; Rubins, K.; Bushman, F. D.; Venkateswarlu, Y.; Faulkner, D. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1901.
- Ong, E. B.; Watanabe, N.; Saito, A.; Futamura, Y.; Abd El Galil, K. H.; Koito, A.; Najimudin, N.; Osada, H. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14049.
- Valente, S.; Bana, E.; Viry, E.; Bagrel, D.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5827.
- Yamazaki, T.; Tokiwa, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 1716.
- Starcevic, S.; Brozic, P.; Turk, S.; Cesar, J.; Lanisnik, R. T.; Gobec, S. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 248.
- Starcevic, S.; Kocbek, P.; Hribar, G.; Lanisnik, R. T.; Gobec, S. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *191*, 60.

17. Riveiro, M. E.; De, K. N.; Moglioni, A.; Vazquez, R.; Monczor, F.; Shayo, C.; Davio, C. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1325.
18. Sun, J. G.; Chen, C. Y.; Luo, K. W.; Yeung, C. L.; Tsang, T. Y.; Huang, Z. Z.; Wu, P.; Fung, K. P.; Kwok, T. T.; Liu, F. Y. *Chemotherapy* **2011**, *57*, 162.
19. Miri, R.; Motamedi, R.; Rezaei, M. R.; Firuzi, O.; Javidnia, A.; Shafiee, A. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2011**, *344*, 111.
20. Musa, M. A.; Zhou, A.; Sadik, O. A. *Med. Chem.* **2011**, *7*, 112.
21. Jin, L.; Tabe, Y.; Kimura, S.; Zhou, Y.; Kuroda, J.; Asou, H.; Inaba, T.; Konopleva, M.; Andreeff, M.; Miida, T. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 91.
22. Musa, M. A.; Badisa, V. L.; Latinwo, L. M.; Waryoba, C.; Ugochukwu, N. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 4613.
23. Sashidhara, K. V.; Kumar, A.; Kumar, M.; Sarkar, J.; Sinha, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7205.
24. You, L.; An, R.; Wang, X.; Li, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7426.
25. Ngo, N. T.; Nguyen, V. T.; Vo, H. V.; Vang, O.; Duus, F.; Ho, T. D.; Pham, H. D.; Nguyen, L. H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2010**, *58*, 1487.
26. Stan, S. D.; Kar, S.; Stoner, G. D.; Singh, S. V. *J. Cell Biochem.* **2008**, *104*, 339.
27. Shukla, Y.; Kalra, N. *Cancer Lett.* **2007**, *247*, 167.
28. Filomeni, G.; Aquilano, K.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5940.
29. Filomeni, G.; Aquilano, K.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11735.
30. Busch, C.; Jacob, C.; Anwar, A.; Burkholz, T.; Ba, L. A.; Cerella, C.; Diederich, M.; Brandt, W.; Wessjohann, L.; Montenarh, M. *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 743.
31. Götz, C.; Bachmann, C.; Montenarh, M. *The Prostate* **2007**, *67*, 125.
32. Hessenauer, A.; Schneider, C. C.; Götz, C.; Montenarh, M. *Cell Signal* **2011**, *23*, 145.
33. Cerella, C.; Scherer, C.; Cristofanon, S.; Henry, E.; Anwar, A.; Busch, C.; Montenarh, M.; Dicato, M.; Jacob, C.; Diederich, M. *Apoptosis* **2009**, *14*, 641.
34. Hoffmann, I. *Protoplasma* **2000**, *211*, 8.
35. Brault, L.; Denance, M.; Banaszak, E.; El, M. S.; Battaglia, E.; Bagrel, D.; Samadi, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 243.
36. Hu, X.; Benson, P. J.; Srivastava, S. K.; Xia, H.; Bleicher, R. J.; Zaren, H. A.; Awasthi, S.; Awasthi, Y. C.; Singh, S. V. *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 897.
37. Derbesy, G.; Harpp, D. N. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5381.
38. Xiao, D.; Choi, S.; Johnson, D. E.; Vogel, V. G.; Johnson, C. S.; Trump, D. L.; Lee, Y. J.; Singh, S. V. *Oncogene* **2004**, *23*, 5594.
39. Jacob, C. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 851.
40. Song, J. D.; Lee, S. K.; Kim, K. M.; Park, S. E.; Park, S. J.; Kim, K. H.; Ahn, S. C.; Park, Y. C. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2009**, *23*, 71.
41. Knowles, L. M.; Milner, J. A. *Nutr. Cancer* **1998**, *30*, 169.
42. Knowles, L. M.; Milner, J. A. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1129.
43. Moede, T.; Leibiger, B.; Pour, H. G.; Berggren, P.; Leibiger, I. B. *FEBS Lett.* **1999**, *461*, 229.
44. Viry, E.; Anwar, A.; Kirsch, G.; Jacob, C.; Diederich, M.; Bagrel, D. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 1103.
45. Sohn, J.; Rudolph, J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10060.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases

E. Sibille^a, E. Bana^{b,c}, W. Chaouni^c, M. Diederich^b, D. Bagrel^c, P. Chaimbault^{a,*}^aLaboratoire de Chimie et Physique–Approche Multi échelle des Milieux Complexes (LCP–A2MC), Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, F-57078 Metz, France^bLaboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg, Luxembourg^cLaboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, F-57078 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2012

Received in revised form 26 July 2012

Accepted 8 August 2012

Available online 16 August 2012

Keywords:

Screening test

MALDI–MS

CDC25 phosphatases

Inhibition

ABSTRACT

The cell division cycle 25 phosphatases (CDC25s) are key regulators of the physiological cell cycle progression. Their overexpression has been reported in a significant number of cancers, and their inhibition appears to be an interesting strategy for treatments. We propose here a rapid screening test allowing the detection of reversible and irreversible CDC25A and –C inhibitors. The test is based on the incubation of the candidate molecules with the human CDC25 proteins followed by an ultrafiltration step. The retentate is then directly analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOFMS) to detect reversible inhibitors or submitted to peptide mass fingerprint (PMF) analysis to reveal irreversible inhibitors covalently bound to the protein active site. After its validation, the protocol is applied to the detection of a novel candidate inhibitor of CDC25s named SV37. The screening procedure, as well as the preliminary biological results, demonstrates that this compound behaves as a reversible inhibitor.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Discovered by Russell and Nurse during the 1980s, the cell division cycle 25 phosphatases (CDC25s)¹ are key regulators of the cell division cycle. In mammals, three CDC25 isoforms labeled A, B, and C were identified [1,2]. Each isoform is encoded by a specific gene that can generate several splice variants. The CDC25 proteins comprise a regulatory domain and a catalytic one containing the active site HCX₂R [3]. CDC25s activate their substrates (cyclin-dependent kinases, CDKs) by dephosphorylation and, consequently, allow the progression of the cell cycle [4]. Thus, CDC25s are regulators of the cell division [5], and their overexpression has been observed in several cancers [6,7] (e.g., lung, breast, ovarian [8–10]). Therefore CDC25s became attractive targets for anticancerous therapy by inhibiting their activity.

A limited number of potent inhibitors have been discovered so far. They can be classified into two categories depending on their

behavior: reversible and irreversible inhibitors. Few of the reversible inhibitors have been evidenced. Most of them belong to the family of indolyl-1,4-hydroxyquinones [11], but some 1,2-hydroxyquinones may also be active. For example, 10 to 30 μM of the 1,2-hydroxyquinone named 5169131 inhibits CDC25B, causing G1/S and G2/M arrest [12].

Irreversible inhibitors inhibit the CDC25s' active site through a covalent modification of the active site or an oxydation of the catalytic cystein [11,13,14]. Consequently the target proteins are definitely inactivated and the cell proliferation is efficiently slowed down. In this way, menadione (vitamin K3), NSC663284, caulibugulones, and BN82002 were found to irreversibly inhibit CDC25s [13,15–17].

Evidencing new drugs that may be potential inhibitors of a given target is very often laborious and time-consuming. It is indeed necessary to verify whether the *in vitro* observed inhibition of a purified protein is confirmed by assays in cellular systems [18,19] and by *in vivo* experimentations [20]. Thus, there is a real need for a rapid screening procedure allowing a fast identification of potential inhibitors. Previous studies led by Hannewald and coworkers come to the development of a screening test that evidences active compounds against two cancerous targets: tubulin and dihydrofolate reductase (DHFR) [21,22]. In the first mentioned article, potential inhibitors of microtubule assembly (e.g., vinblastine, vincristine) are discriminated from other compounds thanks

* Corresponding author. Fax: +33 3 87 31 58 51.

E-mail address: patrick.chaimbault@univ-lorraine.fr (P. Chaimbault).

¹ Abbreviations used: CDC25, cell division cycle 25; CDK, cyclin-dependent kinase; MALDI–TOFMS, matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry; LC, liquid chromatography; ESI, electrospray ionization; MS/MS, tandem MS; TOF/TOF, tandem TOF; CHCA, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; FTICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; TFA, trifluoroacetic acid; SA, sinapinic acid; S/N, signal/noise; PMF, peptide mass fingerprint; MW, molecular weight; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; LDI, laser desorption ionization.

to their high affinity for tubulin. The ligand–target protein complex is then submitted to matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOFMS). Reversible inhibitors are weakly bonded to the target, and the laser energy is sufficient to break the complex during the ionization process. Then, the ligand is detected in positive ion mode as a protonated molecular ion. However, this screening procedure is able to reveal only noncovalent inhibitors. Covalent inhibitors remain bonded to the target protein and are not detected.

As already mentioned, most CDC25 active inhibitors are described as irreversible inhibitors. Therefore, the protocol previously described needs to be extended to the detection of this type of inhibitors. In 2002, Pu and coworkers published an interesting work proving in two steps that NSC663284 is covalently bound to the CDC25A catalytic domain [23]. First, they identified the covalent complex by MALDI–TOFMS thanks to an unresolved shoulder mass peak emerging from the $[M+H]^+$ signal of the CDC25A catalytic domain. However, the mass accuracy of such an experiment is very low (mean errors ~ 30 – 50 Da). Then, to identify the accurate mass of the reaction adduct, the authors proceeded with a 50-min microcapillary liquid chromatography (LC)–electrospray ionization (ESI)–MS run after an in-gel digestion (trypsin) of the CDC25A catalytic domain. After additional tandem MS (MS/MS) experiments, they finally determined the exact nature of the chemical reaction between NSC663284 and the CDC25A active site. Moreover, they showed that NSC663284 is covalently bound to the Ser114 of the CDC25A catalytic domain. Nevertheless, this procedure appears to be time-consuming and complex in the framework of a screening test. MALDI–TOFMS remains a technique of choice for the development of a rapid screening test even for covalent complexes. For example, Kato and coworkers used MALDI and post-source decay–MALDI–TOFMS to assess peptide binding to predict skin sensitization [24]. In their study, they used glutathione as a probe for the detection of conjugates with chemicals. Similarly, Soares and coworkers evidenced the covalent binding of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 to PPAR γ receptors by comparing MALDI–TOF mass spectra with and without the presence of ligand [25]. Lately, Brisson and coworkers used MALDI–TOF and tandem TOF (TOF/TOF)–MS experiments to show the ability of some quinoleinediones to irreversibly oxidize the catalytic cysteine of CDC25B. Their results are supported by the detection of the fragment corresponding to the sulfonic acid form ($Cys-SO_3^-$) of the catalytic site [14].

In this article, we present the development of a screening test evidencing the potential activity of reversible, as well as irreversible, inhibitors of CDC25A and -C phosphatases starting from a sole incubation protocol. This screening test combining the two MALDI–MS approaches mentioned above is also evaluated for a rapid highlight of a new candidate molecule for CDC25 inhibition.

Materials and methods

Chemicals and reagents

High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile, ethanol, and methanol were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Ultrapure water was obtained from a Simplicity Personal Ultrapure water system (Millipore, Molsheim, France). BN82002, amiodarone, and NSC663284 were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), and their purities were $\geq 97\%$, 99% , and $\geq 98\%$, respectively. The 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone was synthesized according to Pirrung *et al.* [26]. CDC25A and -C were produced and purified at a laboratory according to the protocol published by Brault and Bagrel in 2008 [18]. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and

2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) were obtained from Sigma–Aldrich.

MALDI–TOFMS and MALDI–FTICRMS analyses

MALDI–TOFMS analyses were carried out on a Bruker Reflex IV TOF mass spectrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source fitted with a nitrogen pulsed laser (337 nm, model VSD-337ND, Laser Science, Boston, MA, USA). The laser output energy was $400 \mu J/pulse$. Two different modes of analysis were used. The linear mode was used for high-mass analyses (m/z 1–20 kDa). Positive ions were accelerated without any extraction delay at a 20-kV acceleration voltage. The reflectron mode was used for low masses (m/z 0–5000 Da). The reflector voltage was 23 kV. Positives ions were accelerated with a 200-ns extraction delay. Mass spectra were manually acquired using FlexControl software (Bruker Daltonic) by accumulating four series of 100 laser shots.

MALDI–Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)–MS analyses were carried out on an IonSpec mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA) fitted with a 9.4 T shielded magnet. The external ProMALDI source was equipped with an Nd:YAG laser at 355 nm (third frequency, New Wave Research, Fremont, CA, USA). After ionization, positives ions were stored in a hexapole, transferred in the FTICR cell through the ion guide, and then analyzed. All mass spectra were manually acquired with Omega software in Wizard mode (Varian). Approximately 35 laser shots were averaged with laser energy at 17% of the laser output maximum.

Two matrices were used for MALDI analyses: (i) a 1-M DHB solution (Sigma–Aldrich) in 50% acetonitrile and 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA) (Merck, Darmstadt, Germany) and (ii) a saturated sinapinic acid (SA) solution (Sigma–Aldrich) in 50% acetonitrile and 10% formic acid (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). All of the depositions were performed using the dried droplet method. After the screening step, the protein–inhibitor complex was concentrated and desalted using C18 resin pipet tips (ZipTip, Molsheim, France). The ZipTip was first equilibrated with $10 \mu l$ of acetonitrile and then washed three times with $10 \mu l$ of a mixture composed of acetonitrile/water/TFA (50:50:0.1, v/v/v) and four times with $10 \mu l$ of an aqueous solution acidified with 0.1% TFA. Next, $5 \mu l$ of the sample was adsorbed on the ZipTip (five aspirate dispense cycles) and then washed four times with $10 \mu l$ of 0.1% TFA. The sample was eluted using $4 \mu l$ of acetonitrile/water/TFA (50:50:0.1, v/v/v).

External calibration was done using DHB matrix peaks and a mixture of standard peptides (Bruker Daltonic). The following monoisotopic peaks were used: m/z 155.034 ($[DHB+H]^+$), m/z 757.400 (bradykinin), m/z 1046.542 (human angiotensin II), and m/z 1533.860 ($P_{14}R$). The calibration was successful if the root mean square (RMS) error was in the range of ± 1 to 2 ppm and ± 10 to 15 ppm for FTICRMS and TOFMS, respectively. Digest mass spectra were internally calibrated with two trypsin autolytic peaks: m/z 842.510 (VATVSLPR) and m/z 2211.104 (LGEHNIDVLEGNEQFINAAK).

Tryptic digestion and protein identification by PMF analysis

A solution of $0.2 \mu g/\mu l$ commercial trypsin (V5111, Promega, Madison, WI, USA) was prepared in the trypsin buffer. The solution was then diluted to obtain a final enzyme/protein ratio of 1:10, and CDC25s were digested overnight at $37^\circ C$. The digests were then analyzed by MALDI–FTICRMS using DHB matrix. Peaks in the 400 to 4000 m/z range with a signal/noise (S/N) ratio greater than 3 were considered and reduced to files containing peak lists (FTDOC version 4.1.54, Varian) and used for the database search. The

MASCOT search engine was used for interpretation of peptide mass fingerprint (PMF) data with the SwissProt database (2012.02, 534,695 sequences, 189,667,883 residues) without any taxonomy, *pI*, or molecular weight (MW) restrictions. One possible missed cleavage for trypsin digestion was allowed. Identifications were validated when at least six peptides were matched with an error lower than 10 ppm, as recommended for FTICRMS [27]. A score greater than 70 was considered as significant ($P < 0.05$).

Screening protocol

The screening of CDC25 inhibitors is presented in Fig. 1. The first step (1) of the protocol consisted in incubating the target protein (CDC25A or C) with the evaluated compound. This compound was dissolved in ethanol at a concentration of 10^{-2} M and then diluted in ultrapure water (18 M Ω) to a final concentration of 2×10^{-3} M. CDC25 phosphatases were solubilized in Tris A buffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 1 mM dithiothreitol [DTT], pH 8.0) at a concentration of approximately 8×10^{-5} M for isoform A and 2×10^{-5} M for isoform C. Then, 30 μ l of CDC25A or 50 μ l of CDC25C was incubated with 10 μ l of the evaluated compound for 1 h.

The second step (2) was designed to separate unbound species from bound species through a centrifugation step. The incubating solution was introduced into the reservoir of a Microcon centrifugal filter unit with a mass cutoff of 30 kDa (Millipore). The filter was centrifuged for 8 min at 12,000 rpm and then washed by adding 100 μ l of ultrapure water. Three washings are sufficient to remove all unbound species [21]. CDC25s and potential protein–ligand complexes were retained by the membrane (retentate). The retentate is dissolved with 20 μ l of ultrapure water and desalted using ZipTip C18. Depending on the nature of the tested molecules, the analytical step was divided into two parts. During the third step (3), 1 μ l of this solution (desalted retentate) was directly analyzed in MALDI-TOFMS with DHB matrix in low mass ($0 < m/z < 4000$) to evidence potential noncovalent ligands and with SA matrix in higher mass ($m/z > 10,000$ Da) in order to check the presence of the protein. The last step (4) consisted in the digestion of CDC25 or the CDC25–ligand covalent complex by trypsin. The digestion was performed as described by Da Silva *et al.* [28]. The digest was analyzed in MALDI-FTICRMS as described above.

Biological evaluation

These evaluations were performed on recombinant human CDC25s [18]. CDC25 phosphatase activity was evaluated *in vitro* by the fluorimetric method described previously [29]. Briefly, the assay was performed in 96-well plates in buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Bovine Serum Albumine, pH 8.1) containing 3-*O*-methylfluorescein phosphate as substrate. After 2 h at 30 °C, 3-*O*-methylfluorescein fluorescent emission was measured with CytoFluor 4000 (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA). Inhibition tests were performed in triplicate by preliminary incubation of inhibitors with the enzyme (20 min) before assessing activity. Results are expressed as the percentage of residual activity of CDC25 phosphatase. The compound concentrations inhibiting 50% of enzyme activity (IC_{50}) were evaluated by using a nonlinear approximation model based on the least squares method.

To assess the reversible/irreversible fixation mode of a compound *in vitro*, a previously described dilution method [11] was applied. Briefly, the recombinant enzymes were incubated with a strong inhibitory concentration of compound for different times and then diluted to obtain a final weak inhibitory concentration. Activity was then measured by fluorimetry.

Results and discussion

Regarding the potential inhibition of CDC25 phosphatases, the candidate molecules can be divided into three categories: (i) the inactive compounds, (ii) the reversible inhibitors, and (iii) the irreversible inhibitors. Obviously, the forthcoming screening protocol must deal with each category. Moreover, the inactive compounds must behave specifically toward the analytical procedure and must not interfere with the two categories of inhibitors. Thus, to validate the screening test, it is necessary to evaluate a negative control (*i.e.*, a molecule that has no interaction with the target protein). Like Hannewald and coworkers [21,22], the chosen compound is amiodarone (Fig. 2A), an antiarrhythmic agent.

Screening of reversible inhibitors

As mentioned previously, there are only a few described reversible inhibitors for CDC25 phosphatases. Moreover, they are not

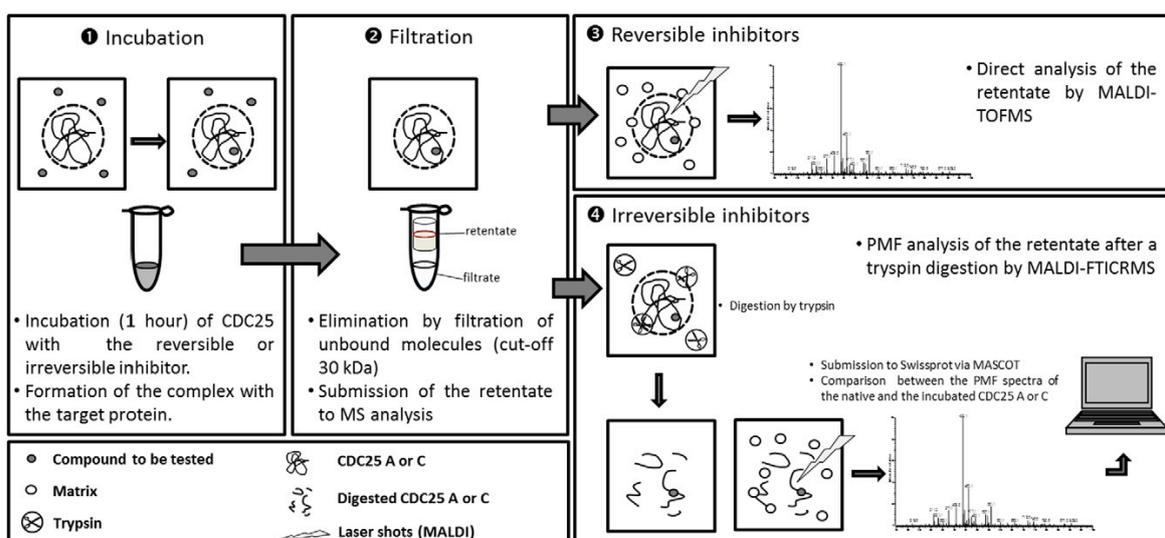


Fig.1. Principle of the screening protocol.

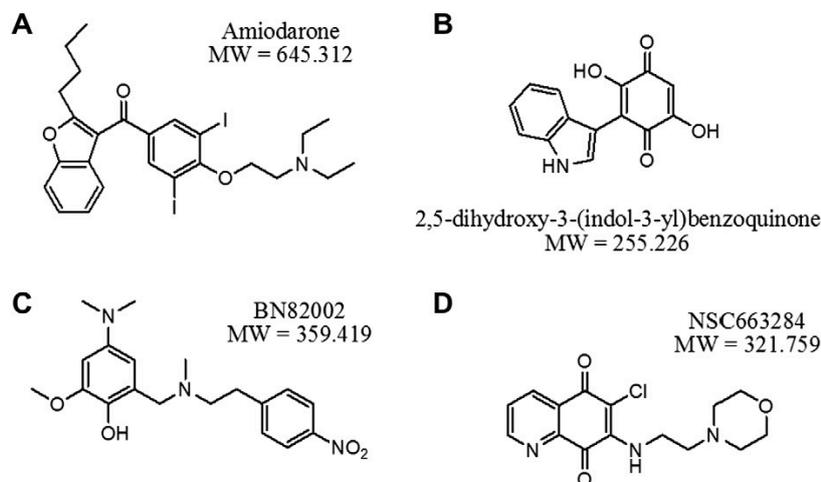


Fig. 2. Structures and molecular weights of the tested compounds: (A) amiodarone; (B) 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone; (C) BN82002; and (D) NSC663284.

commercially available. Among them, 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone ($C_{14}H_8O_4N$; see Fig. 2B) was synthesized to develop and validate the screening procedure.

Targeted proteins are put in contact with an excess of 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. The incubation medium is ultrafiltered using a 30-kDa cutoff Microcon unit. For reversible inhibitors, it is expected that the sample reservoir is retaining the noncovalent complex formed by the target protein and the ligand [19]. Then, 1 μ l of the retentate is analyzed by MALDI–TOFMS with DHB. Because the ligand–target protein is a weak complex in this case, the laser energy is sufficient to break the complex during the ionization step. Consequently, the reversible inhibitor is detected by its protonated molecular ion ($[M+H]^+$) in the mass spectrum in positive mode or as its deprotonated molecular ($[M-H]^-$) in negative mode.

2,5-Dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone can be detected either in positive ion mode at m/z 256.1 (Fig. 3B) or in negative mode at m/z 254.1 (data not shown). However, negative ion mode is approximately 10 times less sensitive than positive mode and, thus, is not compatible with the concentration of the inhibitor that remains bound to CDC25s after the ultrafiltration step. Consequently, positive ion mode is selected for the detection. The results obtained after the screening procedure with CDC25A and -C are displayed in Fig. 3C and D, respectively. As expected for a reversible inhibitor, the signal corresponding to its protonated molecular ion (m/z 256.1) is observed with an S/N ratio of 20. Its isotopic pattern does not look good because the peak at m/z 257.1 is much too intense. This is due only to an interference (Fig. 3A) observed with the matrix DHB. This hypothesis has been checked in FTICRMS of which resolution is able to distinguish both ions at m/z 257.0638 for 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone containing one ^{13}C and at m/z 257.0683 observed for the interference (see Fig. S1 of the supplementary material). To avoid the interference at m/z 257, the matrix CHCA is evaluated but the ionization of the 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone is unsuccessful. The daily recrystallization of a matrix is a somewhat burdensome, but it can be an efficient way in which to remove some impurities. With freshly recrystallized DHB, there are still some impurities but the isotopic pattern of the 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone is correct even if the baseline remains a little bit disturbed (see Fig. S2 of the supplementary material). This last result confirms the hypothesis of an impurity for ion at m/z 257.1.

Amiodarone, BN82002, and NSC663284 (Fig. 2) are never observed in such conditions, raising three hypotheses: (i) the ultrafiltrate device has been damaged during the protocol, (ii) the molecule is not a natural ligand of the target protein (e.g., amiodarone), and (iii) the candidate molecule is covalently bound to the target (e.g., BN82002, NSC663284).

The first hypothesis can easily be checked. When the retentate is analyzed by MALDI–TOFMS with SA as a matrix in linear mode, the $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, and $[M+3H]^{3+}$ ions can be observed for CDC25A and -C. The dimer ion $[2M+H]^+$ is also present for CDC25C. This kind of result confirms that the proteins are well retained on the membrane.

From this point, we can conclude that the test is able to screen reversible inhibitors. However, to resolve the two other hypotheses, the protocol needs to be completed.

Screening of irreversible inhibitors

BN82002 and NSC663284 (Fig. 2C and D) are described in the literature as irreversible inhibitors of CDC25 proteins [23,30]. NSC663284 binds the CDC25A catalytic site thanks to Ser434 (corresponding to Ser114 for Pu and coworkers, who studied only the catalytic site). Although BN82002 is given as an irreversible inhibitor (with an IC_{50} in the micromolar range), the exact way in which this compound inhibits the CDC25 proteins remains unclear. Both compounds have been used as a reference for the development of this part of the test.

When the CDC25A and -C phosphatases are incubated with BN82002, direct mass spectra of the retentate (Fig. 4A and B) do not exhibit the protonated molecular ion of the inhibitor. Similar results were obtained for NSC663284 (data not shown). However, the detection of small molecules in complex samples often undergoes signal suppression. To discard this hypothesis, the same amount of BN82002 is spiked with some denatured CDC25A and directly analyzed (without ultrafiltration) by MALDI–TOFMS. As shown in Fig. 4C, the $[M+H]^+$ ion corresponding to BN82002 effectively appears on the mass spectra, discarding the hypothesis of signal suppression. Furthermore, this experiment shows that BN82002 is not able to bind CDC25A when this protein is denatured. Finally, CDC25A and -C have been incubated with increasing amounts of BN82002. After the ultrafiltration step, the filtrate is analyzed by MALDI–TOFMS. Results are presented in Fig. 5. As long

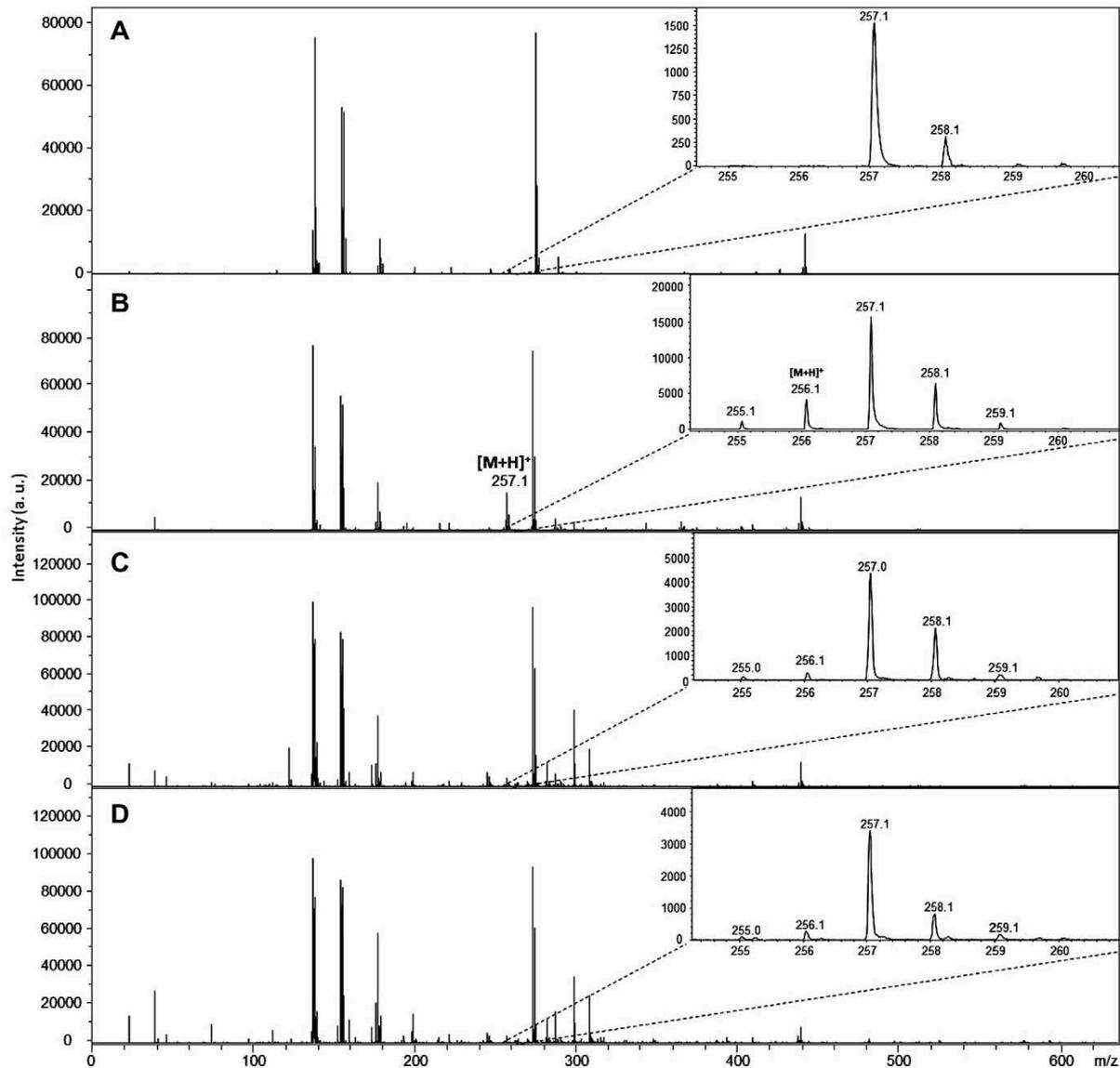


Fig. 3. (A and B) MALDI-TOF mass spectra (reflectron mode) of DHB matrix (A) and 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone (DHB matrix, $C = 5 \times 10^{-4}$ M) (B). (C) Direct analysis of CDC25A screened with 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. (D) Direct analysis of CDC25C screened with 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone.

as the ratio of target protein versus inhibitor does not reach 1:1, no BN82002 is evidenced in the filtrate. For a higher ratio, the excess is detected and the higher the concentration of BN82002, the higher the MS signal. Thus, the excess of inhibitor is well eliminated from the retentate during the washing procedure.

All of these experiments are in a good agreement with the formation of a covalent bond between the target protein and the two inhibitors, but they are not sufficient to demonstrate this hypothesis. Indeed, no amiodarone is detected in the retentate because it is eliminated during the washing step and, finally, this negative control compound behaves as BN82002 and NSC663284 in excess.

To determine whether a given compound is covalently linked to the target protein or not, a digestion of the retentate is performed with trypsin. Then, the digest is analyzed by PMF using MALDI-FTICRMS. The high mass accuracy measurement of FTICRMS is used

here to improve the confidence of the submitted data. Indeed, by measuring m/z ratio with accuracy in the ppm range, FTICRMS significantly increases the reliability of PMF analyses [31,32].

When the PMF analysis is performed on the native protein, CDC25A is identified with sequence coverage of 73% (Fig. 6A) and the protonated ion corresponding to the active site (m/z 1551.7624, VIVVFHCFSSER) is detected 9 of 10 times with a signal ratio equal to 5.5. For CDC25C, 61% of the protein sequence is covered (Fig. 6B) and the active site (m/z 1579.794, IIVFHCERFSSER) is detected 8 of 10 times by MALDI-FTICRMS with a signal ratio equal to 8.0. Thus, the PMF analysis of the native proteins constitutes a reference that can be compared with further PMF analysis obtained from incubated samples.

Fig. 6C and D display the results of the PMF analyses obtained with BN82002 incubated with CDC25A and -C, respectively. Com-

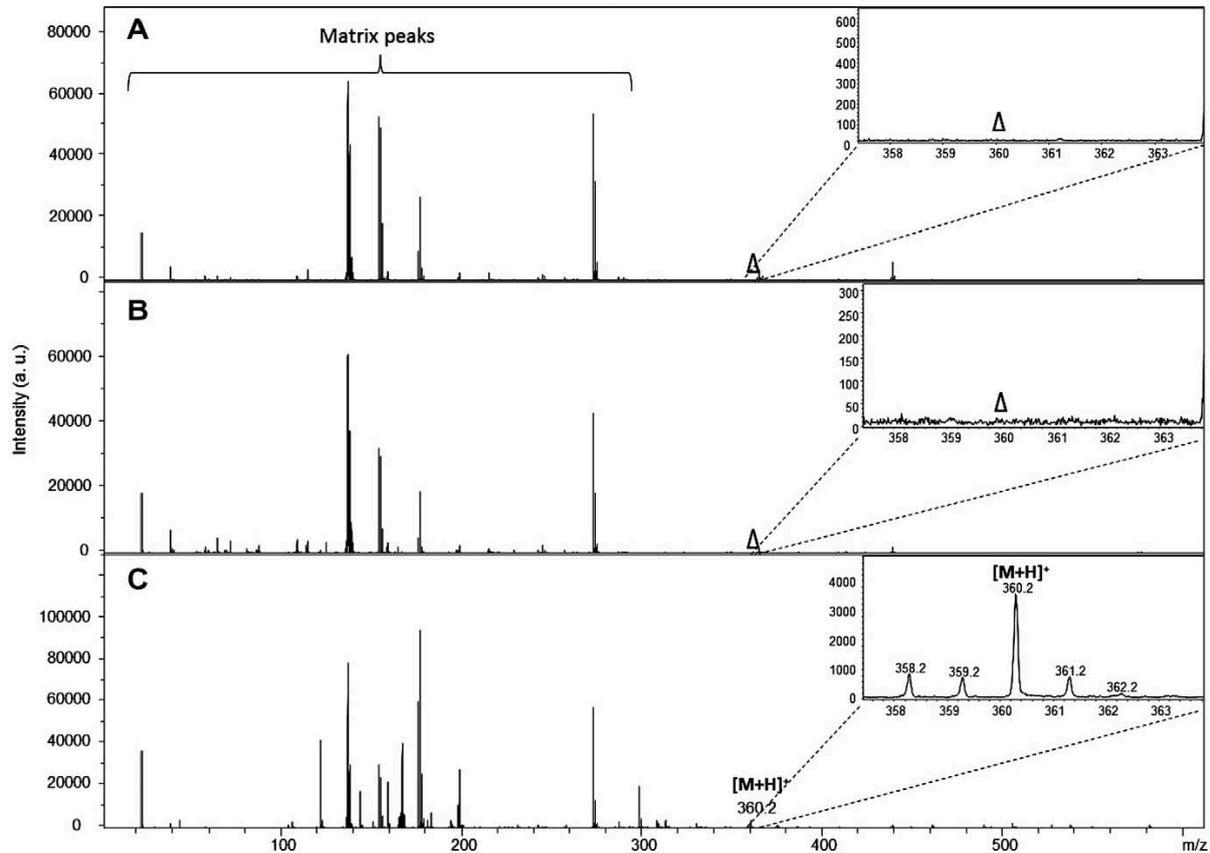


Fig. 4. MALDI-TOF mass spectra (reflectron mode) of CDC25A incubated with BN82002 (A), CDC25C incubated with BN82002 (B), and BN82002 incubated with denatured CDC25A (C). Mass peak indexed with Δ corresponds to the $[M+H]^+$ of BN82002 (the spectrum also exhibits the M^+ at m/z 359.2 and a hydrogen loss by fragmentation at 358.2).

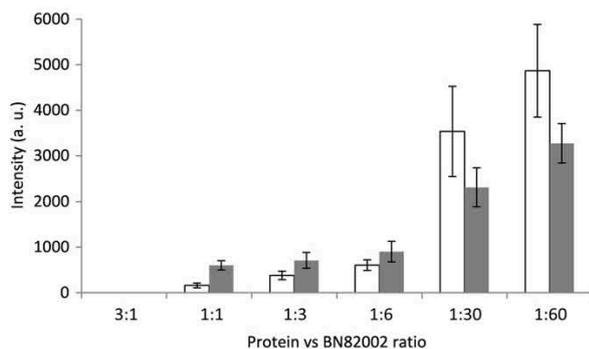


Fig. 5. MS signal intensity of BN82002 in the wash filtrates as a function of its concentration during the incubation with CDC25A (white columns, $C = 5 \times 10^{-5}$ M) and CDC25C (gray columns, $C = 2 \times 10^{-5}$ M). Error bars represent the standard deviations obtained from 10 experiments.

parison of these analyses with those obtained with their respective control samples (Fig. 6A and B) clearly shows that the active site of both CDC25A and -C is never identified when the proteins are screened with the irreversible inhibitor. The same trend is observed with NSC663284, which is known to covalently bind the second serine of the CDC25A active site [23]. When the PMF is performed from incubation sample containing amiodarone (negative control compound) or the 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoqui-

none (reversible inhibitor), the active site is always detected in PMF.

Our results confirm the covalent binding between the active site of the target protein and the two evaluated irreversible ligands. In addition, they show that inactive compounds and reversible inhibitors do not interfere with the PMF analysis. Notwithstanding the disappearing of the active site of the mass spectrum, no mass peak corresponding to the active site linked to the ligand appears on the PMF spectra. For example, the protonated adduct ion corresponding to $[VIVVFHCFESSER + NSC663284 - Cl]^+$ is not detected at m/z 1837.7 in MALDI-FTICRMS, contrary to LC-ESI-MS [23]. It seems that the adduct peptide become silenced in MALDI-FTICRMS. Nevertheless, the systematic disappearing of the active site in PMF coupled to the absence of the protonated molecular ion in direct MALDI-TOFMS analysis constitutes a proof of irreversibility. Our screening test confirms that BN82002 is an irreversible inhibitor. Furthermore, the presented study shows that it covalently binds the active site of CDC25A and -C. Obviously, further experiments (e.g., LC-ESI-MS/MS) would assess the determination of the exact position of the covalent bond.

Conclusion on developed screening procedure

Table 1 summarizes the expected results associated with the developed screening procedure. Each category of molecule has its own behavior toward the test:

(A) CDC25A

1	MELGPEP	PHR	RRLIFAC	SFP	PASQPVV	KAL	FGASAAG	GLS	PVTNLT	VTMD
51	QLQGLG	SDYE	QPLEVKN	NNSN	LQRMGS	SEST	DSGFCLD	SPG	PILDSK	ENLEN
101	PMRRIH	SLPQ	KLLGCS	PALK	RSHSDS	LDHD	IFQLIDP	DEN	KENEAF	EFKK
151	FVRPVS	RGC	HSGLQ	EGKD	LFTQRQ	NSAP	ARMLSS	NERD	SSEPGN	FIPL
201	FTPQSP	VTAT	LSDEDD	GFVD	LLDGEN	LKNE	EETPSC	MASL	WTAPLV	MRTT
251	NLDNRK	CLFD	SFSLCS	SSTR	SVLKR	PERSQ	EESPPG	STRK	RKSMG	SASP
301	ESTNPE	KAHE	TLHQSL	SLAS	SPKGTI	ENIL	DNDPRD	LIGD	FSKGLF	FHTV
351	AGKHQD	LKYI	SPEIMAS	VLN	GKFNLI	KEF	VIIDCR	YPYE	YEGGHI	KGAV
401	NLHMEE	EVED	FLLKRP	IVPT	DGKRVI	VVFH	CEFSSR	GPR	MCRYVR	ERDR
451	LGNEYP	KLHY	PELVYL	KGGY	KEFFMK	CQSY	CEPPSY	RP	HEDFK	EDLKK
501	FRTKSR	TWAG	EKSREMY	SR	LKKL					

(C) CDC25A incubated with BN82002

1	MELGPEP	PHR	RRLIFAC	SFP	PASQPVV	KAL	FGASAAG	GLS	PVTNLT	VTMD
51	QLQGLG	SDYE	QPLEVKN	NNSN	LQRMGS	SEST	DSGFCLD	SPG	PILDSK	ENLEN
101	PMRRIH	SLPQ	KLLGCS	PALK	RSHSDS	LDHD	IFQLIDP	DEN	KENEAF	EFKK
151	FVRPVS	RGC	HSGLQ	EGKD	LFTQRQ	NSAP	ARMLSS	NERD	SSEPGN	FIPL
201	FTPQSP	VTAT	LSDEDD	GFVD	LLDGEN	LKNE	EETPSC	MASL	WTAPLV	MRTT
251	NLDNRK	CLFD	SFSLCS	SSTR	SVLKR	PERSQ	EESPPG	STRK	RKSMG	SASP
301	ESTNPE	KAHE	TLHQSL	SLAS	SPKGTI	ENIL	DNDPRD	LIGD	FSKGLF	FHTV
351	AGKHQD	LKYI	SPEIMAS	VLN	GKFNLI	KEF	VIIDCR	YPYE	YEGGHI	KGAV
401	NLHMEE	EVED	FLLKRP	IVPT	DGKRVI	VVFH	CEFSSR	GPR	MCRYVR	ERDR
451	LGNEYP	KLHY	PELVYL	KGGY	KEFFMK	CQSY	CEPPSY	RP	HEDFK	EDLKK
501	FRTKSR	TWAG	EKSREMY	SR	LKKL					

(B) CDC25C

1	MTELFS	STR	EEGSSG	SGPS	FRSNQR	KMLN	LLLERD	TST	VCPDVP	TRTPV
51	GKFLG	DSANL	SILSGG	TPKR	CLDLSN	LSSG	EITATQ	LTTT	ADLDET	GHLD
101	SSGLQ	EVHLA	GMNHD	QHLK	CSPAQL	LCST	PNGLDR	GHRK	RDAMC	SSAN
151	KENDNG	NLVD	SEMYLG	SP	TTVPKL	DKNP	NLGEDQ	AEEI	SDELME	FSLK
201	DQEA	KVSRG	LYRSP	SMPEN	LNRPRL	KQVE	KFKDNT	IPDK	VKKYF	SGQG
251	KLRK	GLCLK	TVSLC	DITIT	QMLEED	SNQG	HLIGDF	SKVC	ALPTV	SGKHQ
301	DLKYV	NFETV	AALLSG	KFQG	LIEKPY	VIDC	RYPYEL	GGH	IQQALN	LYSQ
351	EELFN	FFLKK	PIVPLD	TQKR	IIIVFH	CEFS	SERGPR	MCR	LREEDR	SLNQ
401	YPALY	PELY	ILKGGY	RDF	PEYMEL	CPEQ	SYCPMH	HQDH	KTELLR	CRSQ
451	SKVQ	EGERQ	REQIALL	VKD	MSP					

(D) CDC25C incubated with BN82002

1	MTELFS	STR	EEGSSG	SGPS	FRSNQR	KMLN	LLLERD	TST	VCPDVP	TRTPV
51	GKFLG	DSANL	SILSGG	TPKR	CLDLSN	LSSG	EITATQ	LTTT	ADLDET	GHLD
101	SSGLQ	EVHLA	GMNHD	QHLK	CSPAQL	LCST	PNGLDR	GHRK	RDAMC	SSAN
151	KENDNG	NLVD	SEMYLG	SP	TTVPKL	DKNP	NLGEDQ	AEEI	SDELME	FSLK
201	DQEA	KVSRG	LYRSP	SMPEN	LNRPRL	KQVE	KFKDNT	IPDK	VKKYF	SGQG
251	KLRK	GLCLK	TVSLC	DITIT	QMLEED	SNQG	HLIGDF	SKVC	ALPTV	SGKHQ
301	DLKYV	NFETV	AALLSG	KFQG	LIEKPY	VIDC	RYPYEL	GGH	IQQALN	LYSQ
351	EELFN	FFLKK	PIVPLD	TQKR	IIIVFH	CEFS	SERGPR	MCR	LREEDR	SLNQ
401	YPALY	PELY	ILKGGY	RDF	PEYMEL	CPEQ	SYCPMH	HQDH	KTELLR	CRSQ
451	SKVQ	EGERQ	REQIALL	VKD	MSP					

Fig. 6. Peptide sequence obtained after PMF study of CDC25A native protein (A), CDC25C native protein (B), CDC25A incubated with BN82002 (C), and CDC25C incubated with BN82002 (D). Bold letters highlighted with a gray background are identified peptides, and the active site of the protein is underlined.

Table 1

Overview of expected results from developed screening test on CDC25 phosphatases.

	Control samples		Evaluated compounds		
	Native CDC25s	Negative controls	Inactive compounds	Reversible inhibitors	Irreversible inhibitors
Direct analysis by MALDI–MS (step 3)	✓*	0	0	✓**	0
Presence of active site of CDC25 by PMF analysis (step 4)	✓	✓	✓	✓	0

Note: Step numbers corresponding to Fig. 1 are in parentheses. ✓, positive detection; 0, absence of detection; *, high mass spectrum with SA; **, low mass spectrum with DHB.

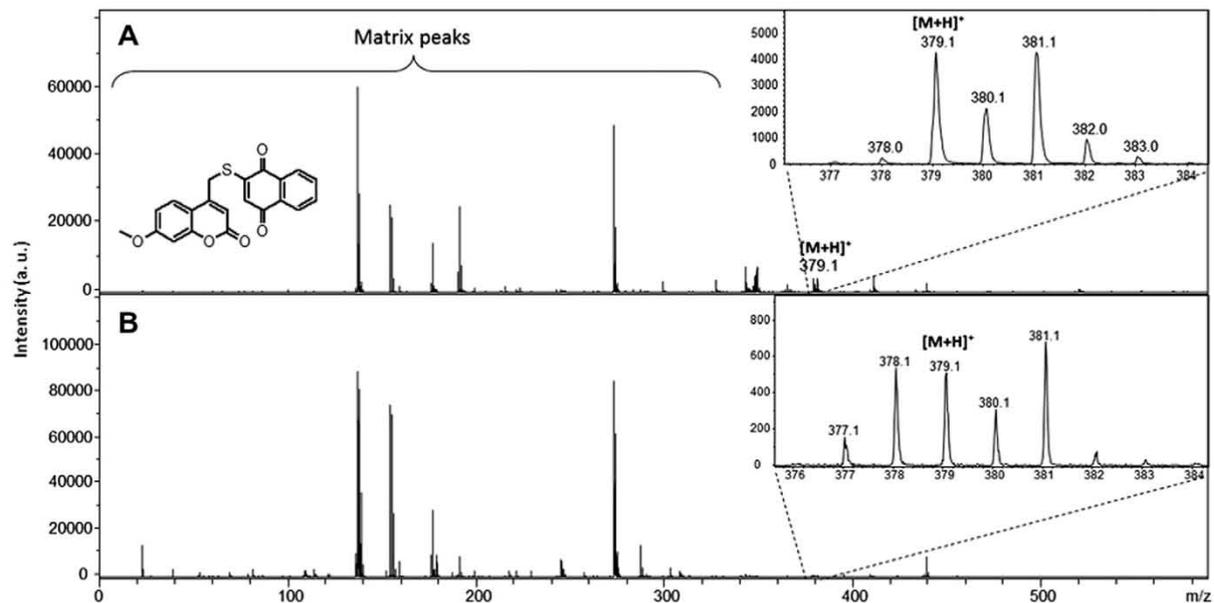


Fig. 7. MALDI–TOF mass spectra (reflectron mode) of SV37 (DHB matrix, $C = 2 \times 10^{-4}$ M) and CDC25C incubated with SV37 (B). The ion m/z 378.1 corresponding to M^+ and m/z 377.1 is due to a hydrogen loss. The difference between the two ion patterns is due to the difference of laser energy between the standard and incubated samples. The standard is obtained with 20% of the laser energy, whereas 40% is required for the incubated sample. At higher laser energy, the fragmentation of the $[M+H]^+$ increases. Consequently, the relative abundance of m/z 379 is decreasing, whereas m/z 377 is increasing. Meanwhile, the intensity of m/z 378 ($[M]^+$) is also increasing at higher energy.

- Inactive compounds do not present any ions corresponding to their molecular structure in direct MS analysis, but the catalytic site of CDC25s is observed by PMF analysis.
- Reversible compounds can already be evidenced by the direct MS analysis of the retentate, but PMF analysis can also be performed as control. In this case, the catalytic site of the CDC25s is observed and the sequence corresponding to the active site appears in the MASCOT report after PMF analysis.
- Irreversible inhibitors covalently bound to the active site are deduced from both direct and PMF analysis by the absence of detection of the molecule and the absence of the catalytic site in the MASCOT report. The absence of the catalytic site is also expected if its cysteine is definitely oxidized.

Application

The aim of a screening test is to rapidly discriminate potentially active compounds from the others. Such a procedure is particularly interesting because the evaluation of inactive compounds by expensive and time-consuming procedures can be avoided. The developed procedure is applied to some synthesized compounds from which a molecule named SV37 ($C_{21}H_{14}O_5S_1$) emerges as a candidate.

SV37 is incubated with CDC25C as described previously and submitted to the developed testing procedure. Results of direct MALDI–TOFMS analysis (step 3) are presented in Fig. 7. In positive MALDI–TOFMS, the signal corresponding to the molecular ion (M^+) can be observed at m/z 378.1 and 379.1 for the $[M+H]^+$ ion. As for indolylquinone, the isotopic pattern looks complicated, but the

reason is completely different. Such a complicated pattern was already observed by Calba and coworkers for electron-rich compounds (spirooxazines), and the abundant $M+2$ and $M+3$ ions were attributed to hydrogenated ions $[M+H_2]^+$ and $[M+H_2+H]^+$ [33]. When the ionization process is performed in laser desorption ionization (LDI) without any matrix addition, SV37 is detected as M^+ with a correct isotopic pattern but LDI leads to a less sensitive detection.

Direct MALDI–TOF mass spectrum obtained after the screening with CDC25C presents the typical ion profile of SV37 obtained with matrix (the M^+ is a little bit more abundant). Such results characterize potential reversible inhibitors. This behavior is confirmed when step 4 is performed (Fig. 8). Indeed, the active site is still detected in PMF.

To check the reliability of the screening test, two *in vitro* experiments are performed. First, the IC_{50} (concentration inhibiting 50% of the enzymatic activity) of SV37 on recombinant CDC25 is evaluated. Fig. 9A shows that the IC_{50} value is approximately 1 μM with CDC25C. This IC_{50} curve allowed us to define a strong inhibitory concentration (22 μM , corresponding to $\geq 70\%$ of inhibition) and a weak inhibitory concentration (0.12 μM , corresponding to $<30\%$ of inhibition) for the evaluation of reversibility.

Second, the dilution test is performed to check the reversibility of SV37 against CDC25C. The enzymes are preincubated with the strongly inhibitory concentration of SV37 for 0, 15, 30, 60, and 90 min and then diluted 180-fold to obtain the final weakly inhibitory concentration. Two controls are used to define positive and negative inhibition controls of 22 and 0.12 μM final inhibitor concentration, respectively (no dilution was performed). For an

CDC25C incubated with SV37

1	MSTELFSSTR	EEGSSGSGPS	FRSNQRKMLN	LLLERDTSFT	VCPDVPRTEV
51	GKFLGDSANL	SILSGGTPKR	CLDLSNLSSG	EITATQLTTS	ADLDETGHLD
101	SSGLQEVHLA	GMNHDQHLMK	CSPAQLLCST	PNGLDRGHRK	RDAMCSSSAN
151	KENDNGNLVD	SEMKYLGSP	TTVPKLDKNP	NLGEDQAEI	SDELMEFSLK
201	DQEAQVSRSG	LYRSPSPEN	LNRPRLKQVE	KFPDNTIPDR	VKKKYFSGQG
251	KLRKGLCLKK	TVSLCDITIT	QMLEEDSNQG	HLIGDFSKVC	ALPTVSGKHQ
301	DLKYVNPETV	AALLSGKFGQ	LIEKFYVIDC	RYPYELGGH	IQGALNLYSQ
351	EELFNFFLKK	PIVPLDTQKR	IIIVFHCEFS	SERGPRMCR	LREEDRSLNQ
401	YPALYPPELY	ILKGGYRDFE	PEYMELCEPQ	SYCPMHQDH	KTELLRCRSQ
451	SKVQEGERQL	REQLALLVKD	MSP		

Fig. 8. Peptide sequence obtained after PMF study of CDC25C screened with SV37. Bold letters highlighted with a gray background are identified peptides, and the active site of the protein is underlined.

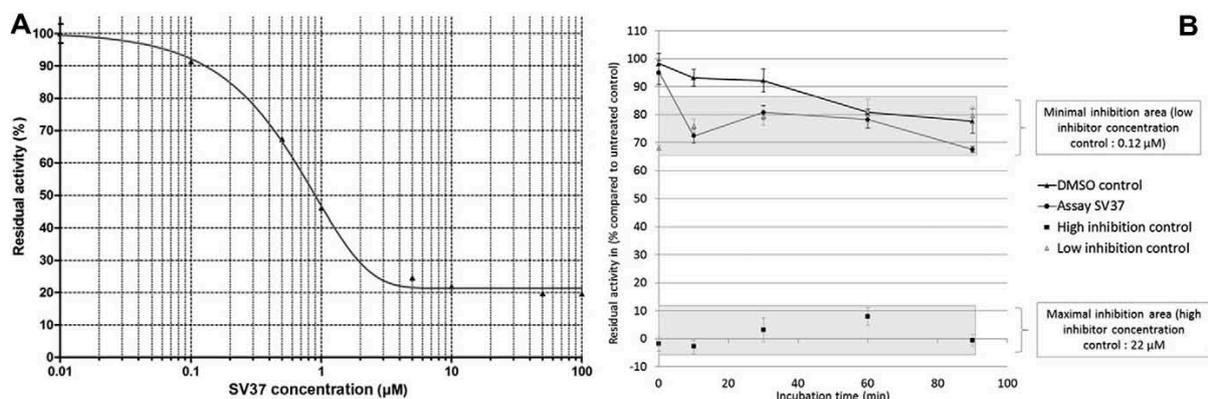


Fig. 9. (A) IC_{50} curve for SV37. (B) Reversibility of SV37 against CDC25C. DMSO, dimethyl sulfoxide.

irreversible inhibitor, the fixation to the enzyme is still effective even after a strong dilution. Thus, the inhibition will be maintained after dilution, and the residual activity of the enzyme is expected to be in the same range as the positive inhibition control. On the contrary, with a reversible inhibitor, the dilution will allow the inhibitor to leave the enzyme, and the enzyme will recover the whole or major part of its activity and is expected to be in the same range as the negative inhibition control. SV37 was found to behave like a reversible compound given that the major part of the activity is recovered after dilution for the recombinant CDC25C (Fig. 9B).

According to these results, SV37 seems to be a promising CDC25 inhibitor. This compound, highlighted by the developed procedure, is actually still undergoing complementary biological tests. This study will be published soon.

Conclusion

In this article, we have proposed a rapid screening test allowing the detection of reversible and irreversible CDC25A and -C inhibitors starting from a very simple sample preparation. The sample preparation consists in an incubation of the candidate molecule with the entire target protein, followed by an ultrafiltration step. The retentate is then directly analyzed by MALDI-TOFMS to bring to light reversible inhibitors or is submitted to PMF analysis to reveal irreversible inhibitors.

Such a procedure can be applied to highlight new synthetic inhibitors. In the future, it could also be easily automated in order to increase the analytical throughput and be applied to more complex mixtures. For example, it could be a convenient way in which to screen plant or marine samples for a rapid discrimination of active extracts from inactive extracts before starting a long and heavy complementary biological study.

Acknowledgments

The authors acknowledge the “Région de Lorraine” (E. Sibille) and the “Fond National de la Recherche” of Luxembourg (E. Bana) for scholarships and financial support. The authors also acknowledge G. Kirsch and S. Valente from the Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (Metz University, France) for providing the compound SV37.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.006>.

References

- [1] A. Nagata, M. Igarashi, S. Jinno, K. Suto, H. Okayama, An additional homolog of the fission yeast *cdc25⁺* gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells, *New Biol.* 3 (1991) 959–968.
- [2] K. Galaktionov, D. Beach, Specific activation of *cdc25* tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins, *Cell* 67 (1991) 1181–1194.
- [3] R. Boutros, V. Lobjois, B. Ducommun, CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 495–507.
- [4] E.B. Fauman, M.A. Saper, Structure and function of the protein tyrosine phosphatases, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 413–417.
- [5] C. Cans, V. Baldin, V. Mils, B. Ducommun, Les phosphatases CDC25: régulateurs du cycle cellulaire et oncogènes potentiels, *Med. Sci.* 14 (1998) 269–274.
- [6] J.W. Eckstein, Cdc25 protein phosphatase: regulation and its role in cancer, *Gene Ther. Mol. Biol.* 1 (1998) 707–711.
- [7] K. Kristjansdottir, J. Rudolph, Cdc25 phosphatases and cancer, *Chem. Biol.* 11 (2004) 1043–1051.
- [8] H. Sasaki, H. Yukiue, Y. Kobayashi, M. Tanahashi, S. Moriyama, Y. Nakashima, I. Fukui, M. Kiriya, Y. Yamakawa, Y. Fujii, Expression of the *cdc25B* gene as a prognosis marker in non-small cell lung cancer, *Cancer Lett.* 173 (2001) 187–192.
- [9] M.G. Cangi, B. Cukor, P. Soung, S. Signoretti, G. Moreira, M. Ranasinghe, B. Cady, M. Pagano, M. Loda, Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 753–761.
- [10] M. Broggin, G. Buraggi, A. Brenna, L. Riva, A.M. Codegioni, V. Torri, A.A. Lissoni, C. Mangioni, M. D'Incalci, Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients, *Anticancer Res.* 20 (2000) 4835–4840.
- [11] J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M.C. Pirrung, J. Rudolph, Inhibition of Cdc25 phosphatases by indolyldihydroxyquinones, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 2580–2588.
- [12] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C.R.J. Stephenson, P. Wipf, J.S. Lazo, Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 824–833.
- [13] K.E. Pestell, A.P. Ducruet, P. Wipf, J. Lazo, Small molecule inhibitors of dual specificity protein phosphatases, *Oncogene* 19 (2000) 6607–6612.
- [14] M. Brisson, T. Nguyen, P. Wipf, B. Joo, B.W. Day, J.S. Skoko, E.M. Schreiber, C. Foster, P. Bansal, J. Lazo, Redox regulation of Cdc25B by cell-active quinolinediones, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 1810–1820.
- [15] J.S. Lazo, D.C. Aslan, E.C. Southwick, K.A. Cooley, A.P. Ducruet, B. Joo, A. Vogt, P. Wipf, Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4042–4049.
- [16] M.C. Brezak, M. Quaranta, O. Mondésert, A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases: BN82002, *Cancer Res.* 64 (2004) 3320–3325.
- [17] G. Prévost, M.C. Brezak, F. Goubin, B. Ducommun, Inhibitors of the CDC25 phosphatases, *Prog. Cell Cycle Res.* 5 (2003) 225–234.
- [18] L. Brault, D. Bagrel, Activity of novel Cdc25 inhibitors and preliminary evaluation of their potentiation of chemotherapeutic drugs in human breast cancer cells, *Life Sci.* 82 (2008) 315–323.
- [19] E. Viry, A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diederich, D. Bagrel, Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases, *Int. J. Oncol.* 38 (2011) 1103–1111.
- [20] M.C. Brezak, M. Quaranta, M.O. Contour-Galcera, O. Laverne, O. Mondésert, P. Auvray, P.G. Kasprzyk, G.P. Prevost, B. Ducommun, Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 1378–1387.
- [21] P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, Tubulin-binding drug screening by MALDI-TOFMS, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4390–4397.
- [22] P. Hannewald, B. Maunit, J.-F. Muller, Screening of DHFR-binding drugs by MALDI-TOFMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 1335–1344.
- [23] L. Pu, A. Amoscato, M. Bier, J. Lazo, Dual G1 and G2 phase inhibition by a novel, selective Cdc25 inhibitor 6-chloro-7-(2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46877–46885.
- [24] H. Kato, M. Okamoto, K. Yamashita, Y. Nakamura, Y. Fukumori, K. Nakai, H. Kaneko, Peptide-binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization, *J. Toxicol. Sci.* 28 (2003) 19–24.
- [25] A.F. Soares, O. Nosjean, D. Cozzone, D. D'Orazio, M. Becchi, M. Guichardant, G. Ferry, J.A. Boutin, M. Lagarde, A. Gêloën, Covalent binding of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 to PPAR γ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337 (2005) 521–525.
- [26] M.C. Pirrung, L. Deng, Z. Li, K. Park, Synthesis of 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinones by acid-catalyzed condensation of indoles with 2,5-dichlorobenzoquinone, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 8374–8388.
- [27] D.M. Horn, E.C. Peters, H. Klock, A. Meyers, A. Brock, Improved protein identification using automated high mass measurement accuracy MALDI FT-ICR MS peptide mass fingerprinting, *Int. J. Mass Spectrom.* 238 (2004) 189–196.
- [28] D. Da Silva, T. Wasselin, V. Carré, P. Chaimbault, L. Bezdetnaya, B. Maunit, J.-F. Muller, Evaluation of combined matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry experiments for peptide mass fingerprinting analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 1881–1892.
- [29] S. Valente, E. Bana, E. Viry, D. Bagrel, G. Kirsch, Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5827–5830.
- [30] M.O. Contour-Galcéra, O. Laverne, M.C. Brezak, B. Ducommun, G. Prévost, Synthesis of small molecule CDC25 phosphatase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 5809–5812.
- [31] B. Bogdanov, R.D. Smith, Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 168–200.
- [32] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, G.S. Jackson, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, *Mass Spectrom. Rev.* 17 (1998) 1–35.
- [33] P.J. Calba, J.F. Muller, A. Hachimi, P. Laréginie, R. Guglielmetti, Spirooxazines as a molecular probe for the study of matrix-assisted laser desorption/ionization processes: I. Study of the interaction effect between the molecular probe and the matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1602–1611.

Reactivity of 4-Vinyl-2*H*-1-benzopyran-2-ones in Diels–Alder Cycloaddition Reactions: Access to Coumarin-Based Polycycles with Cdc25 Phosphatase-Inhibiting Activity

Sergio Valente,^{[a,b,c][†]} Zhanjie Xu,^{[d,e][†]} Emilie Bana,^[a] Clemens Zwergel,^[a] Antonello Mai,^[c] Claus Jacob,^[d] Peter Meiser,^[e] Denyse Bagrel,^[a] Artur M. S. Silva,^{*[b]} and Gilbert Kirsch^{*[a]}

Keywords: Antitumor agents / Oxygen heterocycles / Polycycles / Diels–Alder / Cycloaddition

The reactivity of 4-(1-butoxyvinyl)-2*H*-chromen-2-one (**1**) and (*E*)-4-(2-butoxyvinyl)-2*H*-chromen-2-one (**2**) as diene in thermal Diels–Alder cycloaddition reactions with several electron-poor dienophiles is reported. Among several dienophiles used in this study 1,4-benzoquinone afforded cyclo-

adducts 11-butoxy-1*H*-naphtho[1,2-*c*]chromene-1,4,5-trione (**3e**) and 1*H*-naphtho[1,2-*c*]chromene-1,4,5-trione (**4g**) that showed Cdc25 phosphatase-inhibition activity at low micromolar values, with both compounds more effective against Cdc25 A and Cdc25 C isoforms.

Introduction

A large number of natural products bear a 2*H*-1-benzopyran-2-one (coumarin) as part of their structure.^[1] These compounds show a wide range of biological activities, such as antioxidants,^[2] anticoagulants^[3] and antifungal agents,^[4] selective MAO-B inhibitors,^[5] and inhibitors of hAChE and BACE,^[6] NFκB,^[7] Hsp90,^[8] HIV-1 integrase^[9] and Cdc25 phosphatases^[10] (Figure 1). More recently, coumarin-based derivatives have been reported as inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression,^[11] and showing 17-β-HSD1^[12] and cannabinoid receptor antagonist activity.^[13]

Among all natural compounds containing a coumarin scaffold, coumestrol (Figure 1) is a unique coumestan phytoestrogen, mimicking the biological activity of estrogens

by inhibiting the activity of aromatase and hydroxysteroid dehydrogenase.^[14] Despite decades of research, the total synthesis of the steroid nuclei by improved strategies continues to receive considerable attention. Numerous methods have been exploited for the total synthesis of steroids that appear widely in nature, and which possess practical medical importance. A certain group of steroid-derived compounds were reported as inhibitors of human Cdc25A protein phosphatase.^[15] Furthermore, recently we described some coumarin derivatives endowed with good in-vitro inhibitory activity against Cdc25 A and C phosphatases.^[10]

Steroids have become one of the preferred testing grounds for the development of more efficient methods of organic synthesis and the Diels–Alder reaction was shown to offer a versatile method for the stereoselective synthesis of steroids. The Diels–Alder cycloaddition reaction is well reviewed both for its application in total synthesis^[16] and for synthetic routes of steroids and associated structures.^[17]

Recently our group optimized a method to provide a methyl-ketone substituent at the C4 position on the 2*H*-1-benzopyran-2-one scaffold through a very high α -regioselective Heck cross-coupling reaction by using tosylates as substrates (Scheme 1).^[18] As an intermediate we obtained 4-(1-butoxyvinyl)-2*H*-chromen-2-one (**1**), a very useful diene. However, when we performed the cross-coupling reaction on 4-bromocoumarin, instead of 4-tosylate as starting reagent, with Pd(OAc)₂/DPPP or Pd₂dba₃/DPPF as the catalytic system, the reaction regioselectively afforded the β isomer (*E*)-4-(2-butoxyvinyl)-2*H*-chromen-2-one (**2**) in high yield (85%), and not a mixture of both isomers, as expected (Scheme 1).

In the present work we studied the reactivity of dienes **1** and **2** in ($4\pi+2\pi$) thermal Diels–Alder cycloaddition reactions with several dienophiles with the aim of building new

[a] Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, SRSMC UMR 7565, Université de Lorraine, 1 Boulevard Arago, 57070 Metz, France
E-mail: kirsch@univ-metz.fr
gilbert.kirsch@univ-lorraine.fr

[b] Department of Chemistry & QOPNA, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal
E-mail: artur.silva@ua.pt
Homepage: <https://sites.google.com/site/artursilva/>

[c] Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognietti, Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma, P.le A. Moro 5, 00185 Roma, Italy

[d] Division of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany

[e] Ursapharm Arzneimittel GmbH & Co KG, Industriestraße 35, 66129 Saarbrücken Germany

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201201736>.

FULL PAPER

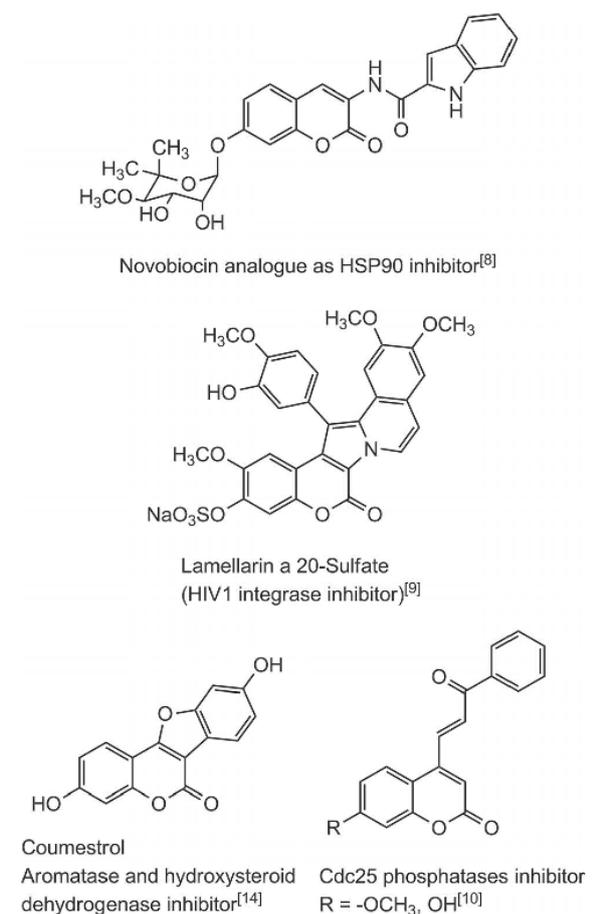
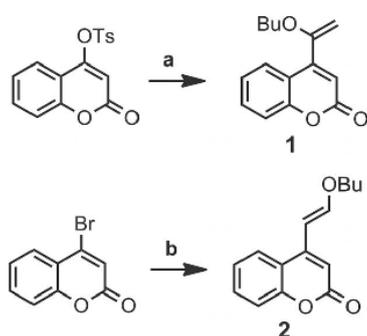
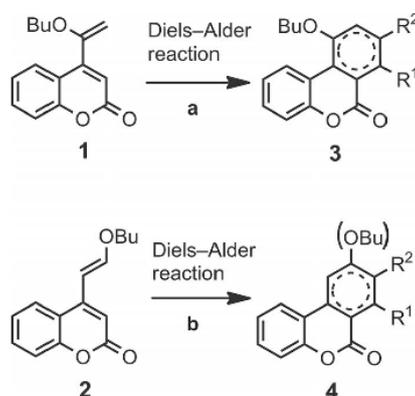
A. M. S. Silva, G. Kirsch *et al.*

Figure 1. Some biologically active known coumarin-based derivatives.



Scheme 1. Synthesis of starting dienes **1** and **2**. Reagents and conditions: (a) butyl vinyl ether, *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), 1,3-bis(diphenylphosphanyl)propane (DPPP), Pd(OAc)₂, dioxane, 80 °C, 12 h; (b) butyl vinyl ether, DIPEA, 1,1'-bis(diphenylphosphanyl)ferrocene, Pd₂dba₃, dioxane, 80 °C.

coumarin-containing polycycles (steroid-like) or precursors of steroid structures and/or its manipulation, as shown in Scheme 2 and Table 1.

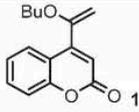
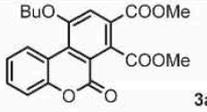
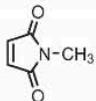
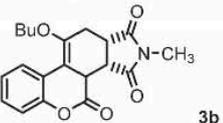
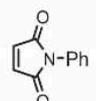
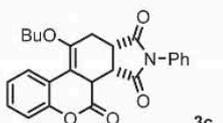
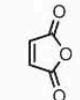
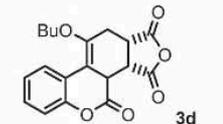
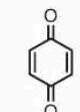
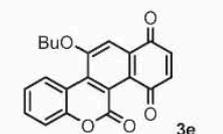
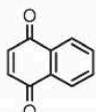
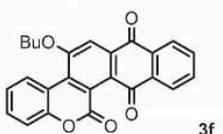
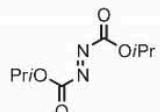
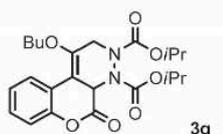
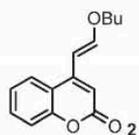
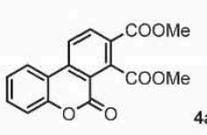
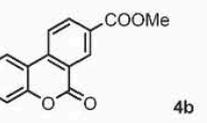
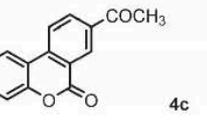


Scheme 2. Thermal Diels–Alder cycloaddition reaction of dienes **1** and **2** with several dienophiles. Reagents and conditions: (a) toluene, 100 °C or xylene, 130 °C or 1,2-dichlorobenzene, 180 °C, sealed tube; (b) toluene, 100 °C, sealed tube.

Results and Discussion

All Diels–Alder cycloaddition reactions were performed under thermal conditions in a sealed tube. In general the cycloaddition reactions with diene **1** were complete within 6 h, with the exception of the reaction with maleic anhydride leading to derivative **3d** (Table 1, Entry 4; 12 h) and within 4 h for diene **2**, with the exception of the reaction with methyl propiolate or 3-buten-2-one leading to compounds **4b** and **4c** (Table 1, Entries 9 and 10; 12 h). The reactivity of both diene isomers **1** and **2** towards different dienophiles was similar only for dimethyl acetylene dicarboxylate (Table 1, Entries 1 and 8). Diene **2** showed higher reactivity for all other dienophiles relative to diene **1**, for which temperatures as high as 180 °C were necessary (Table 1, Entries 5 and 6) to reach sufficient energy for HOMO–LUMO overlapping, or longer reaction times were needed to complete the reaction. Every attempt to use mild conditions for these cycloaddition reactions, such as lower temperature and Lewis acid catalysts (AlCl₃, ZnCl₂, BF₃·Et₂O), did not afford positive results for dienes **1** and **2**. When we reacted diene **1** with dimethyl acetylene dicarboxylate (Table 1, Entry 1), 1,4-benzoquinone (Table 1, Entry 5) or 1,4-naphthoquinone (Table 1, Entry 6), the cycloaddition was followed by spontaneous oxidation-aromatization of the new cycle onto the 2*H*-1-benzopyran-2-one nucleus giving unique aromatized compounds **3a**, **3e** and **3f**. However, reaction of diene **2** with the same dienophiles (Table 1, Entries 8, 14 and 15) afforded cycloadducts that spontaneously underwent rearrangement, butanol elimination and aromatization giving compounds **4a**, **4g**, and **4h** (Scheme 3 shows the reaction mechanism for **4a**). The same rearrangement occurred for other acetylene dienophiles (Table 1, Entries 9 and 10). In the other cases (Table 1, Entries 11–13 and 16) the first cycloadduct (expected after Diels–Alder reaction) was unstable and a [1,3]-proton shift occurs, as shown in Scheme 3 for **4d**. The general driving force is the reforming of the fully conjugated coumarin structure, whereas in the case of compounds **4a–c** the pres-

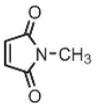
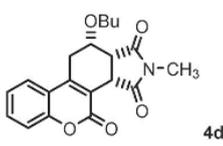
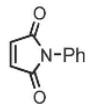
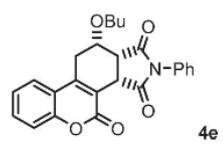
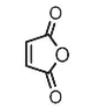
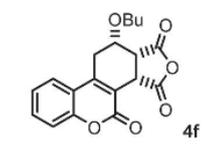
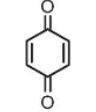
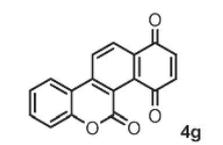
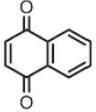
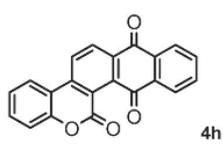
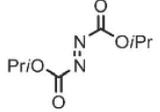
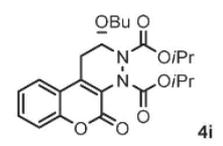
Table 1. Study of intermolecular thermal Diels–Alder cycloaddition reactions.^[a]

Entry	Diene	Dienophile	Cycloadduct	Solvent/time (h)/temp. (°C)	Yield (%) ^[b]
1				toluene/3/100	55
2	1			toluene/6/100	76
3	1			toluene/6/100	73
4	1			xylene/12/130	56
5	1			ODCB/4/180	52
6	1			ODCB/4/180	48
7	1			toluene/6/100	57
8				toluene/2/100	72
9	2			toluene/12/100	52
10	2			toluene/12/100	68

FULL PAPER

A. M. S. Silva, G. Kirsch *et al.*

Table 1. (Continued)

Entry	Diene	Dienophile	Cycloadduct	Solvent/time (h)/temp. (°C)	Yield (%) ^[b]
11	2			toluene/3/100	80
12	2			toluene/3/100	78
13	2			toluene/4/100	67
14	2			toluene/4/100	54
15	2			toluene/4/100	58
16	2			toluene/4/100	72

[a] Reaction conditions: diene **1** or **2** (1.0 equiv.), dienophile (3 equiv.), in solvent. Reactions were performed in a sealed tube. [b] Greater than 95% purity as determined by MS.

ence of two double bonds and the elimination of butanol facilitates the formation of fully conjugated structures. When 1,4-benzoquinone or 1,4-naphthoquinone is used they play two roles, as dienophile and as oxidizing agent.

In order to elucidate the structure and to establish the stereochemistry of the obtained cycloadducts we carried out COSY, HSQC and NOESY NMR experiments of selected cycloadducts **3b** and **4d**. In the Diels–Alder reaction of diene **1** with electron poor dienophiles the *endo* cycloadduct was selectively obtained, as shown by the *syn* configuration of the coumarinic H-3 and the dienophile moiety (Figure 2; see NOESY experiment in Supporting Information). In the reaction of diene **2** the *endo* cycloadducts were also obtained, because the close proximity of the butoxy substituent with the dienophile moiety was observed (Scheme 3). The COSY and HSQC spectra of **4d** also

proved the [1,3]-proton shift in the obtained cycloadduct, with two different methylene groups observed (one from the butoxy substituent and the other resulting from the 1,3-proton shift).

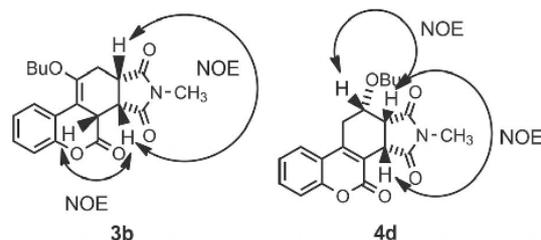
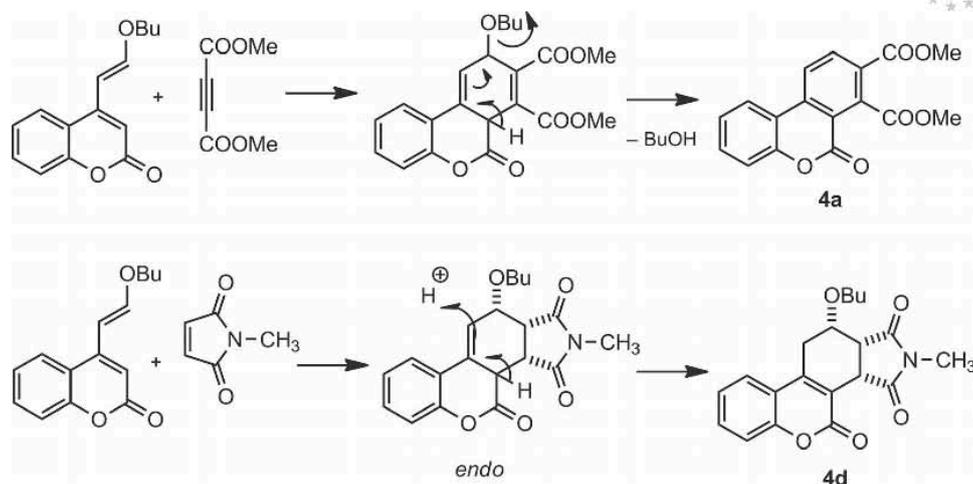


Figure 2. Main NOE correlations of compounds **3b** and **4d**.



Scheme 3. Proposed mechanisms for the Diels–Alder cycloadduct rearrangement.

Furthermore we explored the reactivity of both dienes **1** and **2** with the azo-dienophile, diisopropyl azodicarboxylate, to obtain polycyclic structures **3g** and **4i** (Table 1, Entries 7 and 16), which are useful starting materials to access to a pyridazino-coumarin scaffold. Both dienes **1** and **2** showed good reactivity with this dienophile, and within 4 h and 6 h (Table 1, Entries 16 and 7, respectively) the cycloaddition reactions were complete with good yields. We also studied whether the most reactive diene **2** behaved in a regioselective manner with non-symmetric dienophiles, such as methyl propiolate or 3-butyne-2-one (Table 1, Entries 9 or 10). As expected, the Diels–Alder reaction provided as sole product the regioisomer cycloadduct **4b** and **4c** that were obtained even under these conditions (dienophile with only one electronic withdrawing group) through butanol elimination and aromatization. However, longer reaction times (12 h) were needed by both methyl propiolate and 3-butyne-2-one (Table 1). The unequivocal assignment of the structure of compounds **4b** and **4c** is based on the multiplicity of the H-3 NMR signal. It appears as a broad singlet for **4b** and as a doublet with a small coupling constant ($^4J = 2.0$ Hz) for **4c**, which was not the case if the other isomer was obtained, for which three consecutive aromatic protons appear.

Following our recent work on coumarin-based derivatives as Cdc25 phosphatase inhibitors,^[10] we decided to test some of the new compounds against the three Cdc25 isoforms, A, B and C. Cdc25 phosphatases are key enzymes regulating the cell cycle and are a valuable target for cancer treatment. Human glutathione-*S*-transferase (GST)-Cdc25 recombinant enzymes were used to evaluate the inhibitory potential of the compounds. Each isoenzyme was prepared as described previously.^[19,20] Briefly, the GST-tagged Cdc25s were expressed in a bacterial expression system through isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside induction. After lysis of the bacteria, purification on a GSH-Agarose column gave the GST-Cdc25 recombinant proteins. Recom-

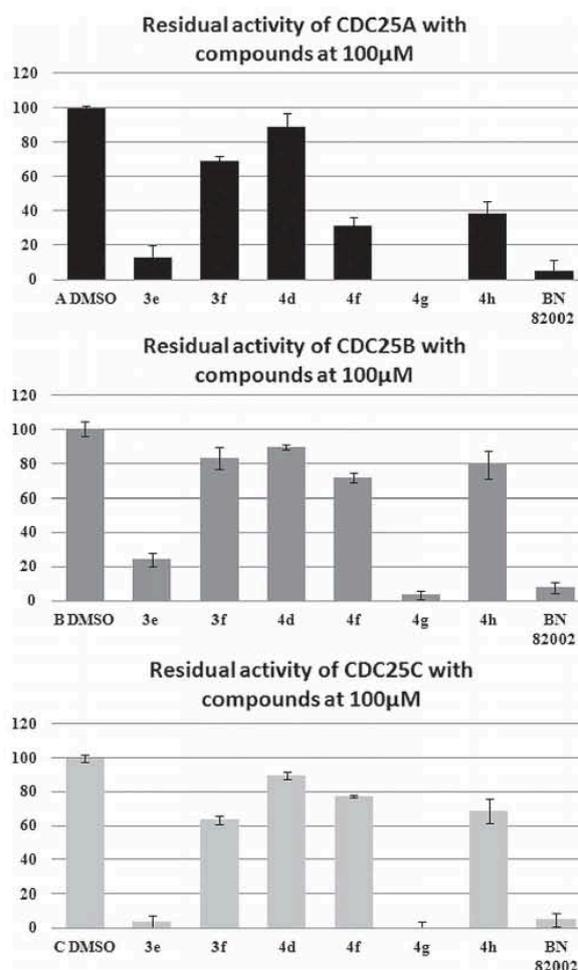


Figure 3. Inhibitory activity (expressed as residual percentage of inhibition) of compounds **3e**, **3f**, **4d**, **4f**–**h**. Tested at 100 μ M against Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C phosphatases. Values are means of three independent experiments

FULL PAPER

A. M. S. Silva, G. Kirsch *et al.*

binant Cdc25 A and Cdc25 C are full-length enzymes whereas Cdc25 B is truncated (active site only).

The enzymatic activity was measured by a dephosphorylation assay with 3-*O*-methyl fluorescein phosphate as described previously.^[21] To test the inhibitory potential of the new compounds, **3e**, **3f**, **4d**, and **4f–h** were assayed at 100 μM final concentration relative to BN82002 (Sigma Aldrich), which was used as a reference inhibitor drug at 10 μM . Inhibitory activity with dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to establish residual activity of the enzyme (as a percentage relative to DMSO reference; Figure 3). Analysis of the inhibition assay revealed compounds **3e** and **4g** as the most potent inhibitors among these coumarin derivatives. Compound **3e** showed about 80% inhibition for Cdc25 A and B, and more than 95% for Cdc25 C, and **4g** completely inhibited enzymatic activity of Cdc25 A and C at that concentration and inhibited more than 95% activity of Cdc25 B. Next we determined IC_{50} values for the most potent compounds, **3e** and **4g** (Table 2). Statistical calculations were performed with a generalized log linear regression model (Poisson regression), as described by Maul.^[22]

Table 2. Inhibitory activity (IC_{50} values) against Cdc25A, B and C phosphatases of compounds **3e** and **4g**.^[a]

Compd.	Structure	Phosphatases (IC_{50} , μM)		
		Cdc25A	Cdc25B	Cdc25C
3e		13.2	46.1	9.0
4g		5.8	14.4	2.3

[a] The IC_{50} values were determined by testing seven different concentrations of compounds (from 0 to 150 μM). For each compound, each concentration was separately tested in 3 independent microplates, at the rate of 3 wells per microplate. The statistical evaluation of IC_{50} was made with software specially designed for calculating the median inhibitory concentration for toxicity tests.^[20]

The new quinone-based tetracycle **4g** showed an interesting inhibition in the low micromolar range against all three Cdc25 phosphatases, being the most active for Cdc25 C (2.3 μM). It was also more potent (up to almost 4 fold for Cdc25C) than analogue **3e** bearing a butoxy group. Therefore this compound could be considered as a new lead for further structural optimization and deeper in-cell studies in order to validate its anticancer properties.

Conclusions

In summary, we have described the reactivity of 4-(1- and 2-butoxyvinyl)-2*H*-1-benzopyran-2-one in [4+2] thermal

Diels–Alder cycloaddition reactions with several electron-poor dienophiles, to access coumarin-based polycyclic compounds. Among these heterocycles we identified **3e** and **4g** as new Cdc25 phosphatases inhibitors.

Experimental Section

General: The solvents used were purchased from Carlo–Erba and the reagents from Acros Organics or Alfa Aesar. Melting points were determined with a Stuart SMP3 apparatus. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AC 250 MHz spectrometer in CDCl_3 or $[\text{D}_6]\text{DMSO}$. Mass spectra were recorded with a Micro-Tof-Q 98. 2D COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$), 2D HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$; delay for one bond J C/H couplings were optimized for 145 Hz) and NOESY (mixing time of 800 ms) experiments were performed in a Bruker Avance 300 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported relative to the internal reference tetramethylsilane. All reactions were routinely checked by thin-layer chromatography performed with aluminum-backed silica gel plates (Merck DC, Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄) with spots visualized by UV light. Column chromatography was performed with silica gel LC 60A (70–200 micron).

4-(1-Butoxyvinyl)-2*H*-chromen-2-one (1**):**^[18] A mixture of 2-oxo-2*H*-chromen-4-yl tosylate (0.1 g, 0.37 mmol), butyl vinyl ether (1.5 mmol, 0.19 mL), DIPEA (1.13 mmol, 0.19 mL) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.002 g, 0.009 mmol), DPPP (0.004 g, 0.010 mmol), in dry dioxane (3.0 mL) was stirred under N_2 in a sealed tube at 80 $^\circ\text{C}$ for 12 h. After this time the solvent was removed under vacuum and the residue purified by column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane, 1:7) to provide pure **1** (85.87 mg, 95%) as a colorless oil. R_f = 0.3 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 7:1). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 1.44–1.51 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.91 (t, J = 6.4 Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 4.53 and 4.55 (2d, J = 3.0 and 2.9 Hz, 2 H, = CH_2), 6.48 (s, 1 H, 3-H), 7.24–7.29 (m, 1 H, Ar-H), 7.31–7.35 (m, 1 H, Ar-H), 7.49–7.55 (m, 1 H, Ar-H), 7.78 (dd, J = 7.0 and 1.2 Hz, 1 H, Ar-H) ppm. ^{13}C NMR (62.9 MHz, CDCl_3): δ = 13.7, 19.3, 30.8, 68.1, 89.1, 114.8, 117.1, 117.7, 124.1, 126.8, 131.7, 150.9, 154.0, 156.8, 161.0 ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ 267.1099; found 267.1103.

(E)-4-(2-Butoxyvinyl)-2*H*-chromen-2-one (2**):** A mixture of 4-bromo-2*H*-chromen-2-one (0.450 g, 2.0 mmol), butyl vinyl ether (8.0 mmol, 1.04 mL), DIPEA (6.0 mmol, 1.05 mL), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.027 g, 0.03 mmol), DPPF (0.033 g, 0.06 mmol), in dry dioxane (3.0 mL) was stirred under N_2 in a sealed tube at 80 $^\circ\text{C}$ for 12 h. After this time the solvent was removed under vacuum and the residue purified by column chromatography (ethyl acetate/*n*-hexane, 1:5) to provide pure **2** (0.415 g, 85%) as a colorless solid, m.p. 100–102 $^\circ\text{C}$. R_f = 0.3 (silica gel, *n*-hexane/EtOAc, 3:1). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.92 (t, J = 7.3 Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 1.40–1.52 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 1.69–1.81 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 4.04 (t, J = 6.5 Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 6.23–6.28 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, = $\text{CH}-\text{CHO}-$), 6.32 (s, 1 H, 3-H), 7.22–7.36 (m, 3 H, Ar-H and = $\text{CHCOO}-$), 7.50–7.56 (m, 1 H, Ar-H), 7.66–7.70 (d, J = 12.5 Hz, 1 H, = $\text{CH}-\text{CHO}-$), 7.97–8.00 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ar-H) ppm. ^{13}C NMR (62.9 MHz, CDCl_3): δ = 13.7, 19.0, 31.2, 71.2, 98.2, 106.7, 117.3, 118.8, 123.9, 124.3, 131.6, 149.9, 153.7, 154.8, 161.3 ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ 267.1099; found 267.1103.

General Procedure for Thermal Diels–Alder Cycloaddition Reaction: A mixture of diene **1** or **2** (1 equiv.) and the appropriate dienophile

(3 equiv.) in the respective dry solvent (10 mL; see Table 1) was stirred in a sealed tube (for the reaction time and temperature, see Table 1). When the starting material was consumed the reaction was cooled to room temperature, the solvent was removed under vacuum and organic residue purified by column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane, ratio as noted) to provide desired cycloadducts **3a–g** and **4a–i**.

Dimethyl 10-Butoxy-6-oxo-6*H*-benzo[*d*]chromene-7,8-dicarboxylate (3a): Colorless solid, m.p. 141–143 °C. $R_f = 0.3$ (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 3:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.06$ (t, $J = 7.9$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.59–1.64 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.00–2.04 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.96 (s, 3 H, $-\text{COOCH}_3$), 4.05 (s, 3 H, $-\text{COOCH}_3$), 4.31 (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7.30–7.39 (m, 2 H, Ar-H), 7.50–7.56 (m, 1 H, Ar-H), 7.95 (s, 1 H, Ar-H), 9.07–9.10 (m, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.8, 19.4, 30.9, 53.0, 53.1, 69.8, 116.6, 117.1, 117.7, 120.7, 124.5, 128.1, 128.4, 129.0, 130.8, 131.1, 151.0, 156.8, 158.8, 164.5, 168.5$ ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 407.1209; found 407.1215.

10-Butoxy-2-methyl-11,11a-dihydrochromeno[3,4-*e*]isoindole-1,3,4-(2*H*,3*aH*,3*bH*)-trione (3b): Colorless solid, m.p. 112–114 °C. $R_f = 0.25$ (silica gel, light petroleum/EtOAc, 3:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.95$ (t, $J = 6.1$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.37–1.50 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.65–1.75 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.31–2.39 (m, 1 H, $-\text{CHHCHCON}$), 2.89 (s, 3 H, $-\text{NCH}_3$), 3.18–3.23 (d, $J = 14.2$ Hz, 1 H, $-\text{CHHCHCON}$), 3.33–3.39 (t, 1 H, CH_2CHCON), 3.48–3.50 (m, 1 H, $-\text{CHCOO}$), 3.75–3.82 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 3.90–3.97 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 3.99–4.03 (m, 1 H, CHHCHCON), 7.05–7.10 (m, 2 H, Ar-H), 7.16–7.21 (m, 1 H, Ar-H), 8.35 (d, $J = 6.6$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7, 19.0, 25.1, 26.2, 31.7, 38.4, 39.2, 44.4, 68.9, 105.2, 117.3, 117.5, 124.6, 127.4, 128.2, 148.2, 151.0, 166.4, 176.6, 178.2$ ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 355.1420; found 355.1424.

10-Butoxy-2-phenyl-11,11a-dihydrochromeno[3,4-*e*]isoindole-1,3,4-(2*H*,3*aH*,3*bH*)-trione (3c): Colorless solid, m.p. 144–146 °C. $R_f = 0.25$ (silica gel, light petroleum/EtOAc, 3:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.81$ –0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.33–1.42 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.61–1.69 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.40 (dd, $J = 6.8, 11.6$ Hz, 1 H, $-\text{CHHCH}_2\text{CON}$), 3.24 (d, $J = 11.6$ Hz, 1 H, $-\text{CHHCH}_2\text{CON}$), 3.43–3.49 (m, 2 H, CH_2CHCON and $-\text{CHCOO}$), 3.73–3.82 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 3.87–3.96 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 4.12 (dd, $J = 4.0, 6.9$ Hz, 1 H, CHHCHCON), 6.99–7.31 (m, 8 H, Ar-H), 8.30–8.33 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7, 19.1, 26.7, 31.8, 38.7, 39.5, 44.7, 69.1, 77.2, 105.5, 117.4$ (2 C), 124.7, 126.0 (2 C), 127.2, 128.2, 128.8, 129.1 (2 C), 131.2, 151.0, 166.4, 175.7, 177.3 ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 440.1474; found 440.1477.

10-Butoxy-11,11a-dihydro-1*H*-isobenzofuro[4,5-*c*]chromene-1,3,4-(3*aH*,3*bH*)-trione (3d): Colorless solid, m.p. 190–192 °C. $R_f = 0.30$ (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 2:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.83$ (t, $J = 6.5$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.16–1.28 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.34–1.40 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.77–1.87 (m, 1 H, $-\text{CHHCHCOO}$), 2.97 (dd, $J = 3.8, 9.0$ Hz, 1 H, $-\text{CHHCHCOO}$), 3.19–3.27 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 3.42–3.51 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$ and $-\text{CH}_2\text{CHCOO}$), 4.85 (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H, $-\text{CHCHCOO}$), 5.04–5.05 (m, 1 H, $-\text{CHCHCOO}$), 7.36–7.46 (m, 2 H, Ar-H), 7.63 (t, $J = 8.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.7, 18.8, 30.1, 31.2, 35.4, 38.2,$

67.0, 70.1, 117.6, 117.7, 117.8, 123.2, 124.9, 132.7, 149.7, 153.1, 160.3, 170.0, 173.7 ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 365.1001; found 365.1007.

11-Butoxy-1*H*-naphtho[1,2-*d*]chromene-1,4,5-trione (3e): Yellow solid, m.p. 136–138 °C. $R_f = 0.35$ (silica gel, light petroleum/EtOAc, 5:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.05$ –1.10 (m, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.60–1.67 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.03–2.08 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.39 (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, $-\text{CHCO}$), 7.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, $-\text{CHCO}$), 7.29–7.41 (m, 2 H, Ar-H), 7.52–7.56 (m, 1 H, Ar-H), 7.82 (s, 1 H, Ar-H), 9.00–9.03 (m, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.8, 19.4, 30.8, 70.2, 111.2, 116.5, 117.2, 124.3, 124.8, 126.7, 128.8, 130.7, 131.6, 134.2, 135.4, 141.2, 151.7, 157.8, 159.4, 183.4$ (2 C) ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 371.0895; found 371.0901.

5-Butoxy-1*H*-anthra[1,2-*c*]chromene-7,12,13-trione (3f): Yellow solid, m.p. 167–169 °C. $R_f = 0.35$ (silica gel, light petroleum/EtOAc, 5:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.08$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.61–1.69 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.05–2.10 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.42 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7.30–7.34 (m, 1 H, Ar-H), 7.39–7.42 (m, 1 H, Ar-H), 7.53–7.57 (m, 1 H, Ar-H), 7.75–7.82 (m, 2 H, Ar-H), 8.01 (s, 1 H, Ar-H), 8.23 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H, Ar-H), 9.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.8, 19.4, 30.9, 70.2, 111.5, 116.6, 117.2, 123.0, 124.2, 126.7, 127.3, 128.8, 131.1, 131.4, 131.5, 132.2, 132.2, 134.7, 135.7, 136.0, 151.92, 158.0, 159.5, 181.8, 182.7$ ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 421.1052; found 421.1058.

Diisopropyl 1-Butoxy-5-oxo-4*a*,5-dihydro-2*H*-chromeno[3,4-*c*]pyridazine-3,4-dicarboxylate (3g): Colorless oil. $R_f = 0.25$ (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 7:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.03$ (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.18–1.33 [m, 12 H, $-\text{NCOOCH}(\text{CH}_3)_2$], 1.36–1.42 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.55–1.66 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.77–3.81 (m, 1 H, $-\text{CHHCOBu}$), 3.84–3.86 (m, 1 H, $-\text{CHHCOBu}$), 3.89–3.93 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 4.78 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$), 4.84–4.99 [m, 2 H, $-\text{NCOOCH}(\text{CH}_3)_2$], 5.41 (s, 1 H, $-\text{NCHCOO}$), 6.99 (m, 1 H, Ar-H), 7.02–7.21 (m, 2 H, Ar-H), 7.78–7.81 (m, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 13.6, 19.0, 22.2, 22.6, 26.8, 29.6, 31.7, 41.8, 43.4, 68.5, 71.3, 116.7, 120.8, 124.2, 127.7, 128.4, 148.4, 148.6, 163.3$ ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 469.1945; found 469.1933.

Dimethyl 6-Oxo-6*H*-benzo[*d*]chromene-7,8-dicarboxylate (4a): Colorless solid, m.p. 230–232 °C. $R_f = 0.3$ (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 4:1). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 3.87$ (s, 6 H, $-\text{COOCH}_3$), 7.47–7.50 (m, 2 H, Ar-H), 7.63–7.66 (m, 1 H, Ar-H), 8.41–8.45 (m, 2 H, Ar-H), 8.66–8.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 52.5, 52.9, 116.5, 117.2, 117.8, 124.1, 124.6, 125.0, 127.3, 132.4, 135.5, 137.6, 138.8, 151.1, 158.0, 164.1, 167.1$ ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 335.0526; found 335.0531.

Methyl 6-Oxo-6*H*-benzo[*d*]chromene-8-carboxylate (4b): Colorless solid, m.p. 230–232 °C. $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 3.92$ (s, 3 H, $-\text{COOCH}_3$), 7.42–7.48 (m, 2 H, Ar-H), 7.61–7.64 (m, 1 H, Ar-H), 8.41 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H, Ar-H), 8.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, Ar-H), 8.74 (s, 1 H, Ar-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (62.9 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 52.5, 117.0, 117.4, 121.0, 123.4, 124.3, 125.0, 129.8, 130.6, 131.9, 134.7, 138.0, 151.2, 159.6, 164.9$ ppm. HRMS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 255.0652; found 255.0661.

8-Acetyl-6*H*-benzo[*d*]chromen-6-one (4c): Colorless solid, m.p. 176–178 °C. $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.71$ (s, 3 H,

FULL PAPER

A. M. S. Silva, G. Kirsch et al.

–COCH₃), 7.37–7.43 (m, 2 H, Ar–H), 7.54–7.58 (m, 1 H, Ar–H), 8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, Ar–H), 8.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar–H), 8.44 (dd, *J* = 1.8, 7.3 Hz, 1 H, Ar–H), 8.94 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 26.6, 117.2, 118.0, 121.2, 122.3, 123.5, 124.9, 131.3, 131.8, 133.6, 136.9, 138.5, 151.8, 160.6, 196.3 ppm. HRMS: calcd. for C₁₅H₁₁O₃ [M + H]⁺ 239.0703, found 239.0715.

11-Butoxy-2-methyl-11,11a-dihydrochromeno[3,4-*e*]isoindole-1,3,4-(2*H*,3*aH*,3*bH*)-trione (4d): Colorless solid, m.p. 181–183 °C. *R_f* = 0.3 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 2:1). ¹H NMR (250 MHz, [D₆]DMSO): δ = 0.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 0.99–1.08 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 1.14–1.22 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 2.75–2.83 (m, 1 H, –CHHCHOBu), 2.78 (s, 3 H, –NCH₃), 3.13–3.22 (m, 1 H, –CHCON–), 3.30–3.33 (m, 1 H, CH₃CH₂CH₂CHHO–), 3.37–3.45 (m, 1 H, –CHHCHOBu), 3.51–3.53 (m, 1 H, CH₃CH₂CH₂CHHO–), 4.16 (s, 1 H, –CHCON–), 4.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, –CHOBu), 7.34–7.43 (m, 2 H, Ar–H), 7.63 (t, *J* = 8.3 Hz, 1 H, Ar–H), 7.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 13.3, 18.2, 24.0, 27.3, 31.1, 38.0, 43.8, 68.0, 70.6, 116.3, 116.5, 118.8, 124.5, 124.7, 131.8, 146.4, 152.0, 159.0, 174.4, 176.2 ppm. HRMS: calcd. for C₂₀H₂₁NO₃Na [M + Na]⁺ 378.1312; found 378.1311.

11-Butoxy-2-phenyl-11,11a-dihydrochromeno[3,4-*e*]isoindole-1,3,4-(2*H*,3*aH*,10*H*)-trione (4e): Colorless solid, m.p. 162–164 °C. *R_f* = 0.35 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 2:1). ¹H NMR (250 MHz, [D₆]DMSO): δ = 0.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 0.97–1.12 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 1.22–1.33 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 2.85 (d, *J* = 17.5 Hz, 1 H, –CHHCHOBu), 3.25–3.35 (m, 1 H, –CHCON–), 3.42–3.49 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 3.60 (d, *J* = 17.5 Hz, 1 H, –CHHCHOBu), 4.30–4.32 (m, 1 H, –CHOBu), 4.51 (d, *J* = 15.5 Hz, 1 H, –CHCON–), 7.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H, Ar–H), 7.37–7.53 (m, 5 H, Ar–H), 7.58–7.64 (m, 1 H, Ar–H), 7.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 13.3, 18.3, 26.9, 31.2, 38.3, 43.9, 67.8, 70.7, 116.4, 118.7, 124.5, 124.7, 126.6 (2 C), 128.0, 128.1, 128.8 (2 C), 131.8, 132.5, 146.5, 152.0, 159.0, 173.4, 175.3 ppm. HRMS: calcd. for C₂₅H₂₃NO₃Na [M + Na]⁺ 440.1468; found 440.1454.

11-Butoxy-11,11a-dihydro-1*H*-isobenzofuro[4,5-*c*]chromene-1,3,4(3*aH*,3*bH*)-trione (4f): Colorless solid, m.p. 191–193 °C. *R_f* = 0.3 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 3:1). ¹H NMR (250 MHz, [D₆]DMSO): δ = 0.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 1.05–1.11 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 1.20–1.28 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 2.83 (d, *J* = 18.7 Hz, 1 H, CH, –CHHCHOBu), 3.45 (s, 1 H, –CHCOO–), 3.47–3.50 (m, 1 H, CH₃CH₂CH₂CHHO–), 3.54–3.59 (m, 1 H, –CHHCHOBu), 3.61–3.63 (m, 1 H, CH₃CH₂CH₂CHHO–), 4.29 (s, 1 H, –CHCOO–), 4.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, –CHOBu), 7.38–7.47 (m, 2 H, Ar–H), 7.66 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H, Ar–H), 7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 13.3, 18.2, 26.9, 30.9, 38.0, 44.8, 68.0, 69.8, 114.5, 116.5, 118.5, 124.6, 124.9, 132.1, 146.9, 152.0, 158.7, 168.9, 171.3 ppm. HRMS: calcd. for C₁₉H₁₈O₆Na [M + Na]⁺ 365.0996; found 365.1014.

1*H*-Naphtho[1,2-*c*]chromene-1,4,5-trione (4g): Yellow solid, m.p. 131–133 °C. *R_f* = 0.2 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 7:3). ¹H NMR (250 MHz, [D₆]DMSO): δ = 7.05 (d, *J* = 10.4 Hz, 1 H, –CHCO–), 7.28 (d, *J* = 10.4 Hz, 1 H, –CHCO–), 7.45–7.47 (m, 2 H, Ar–H), 7.63 (m, 1 H, Ar–H), 8.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar–H), 8.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar–H), 8.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 115.6, 116.5, 117.0, 118.4, 124.6, 124.8, 126.7, 130.5, 132.5, 133.2, 136.4, 136.5, 140.3, 151.6,

156.5, 182.8, 184.3 ppm. HRMS: calcd. for C₁₇H₈O₄Na [M + Na]⁺ 299.0315; found 299.0308.

7*H*-Anthra[1,2-*c*]chromene-7,12,13-trione (4h): Yellow solid, m.p. 167–169 °C. *R_f* = 0.2 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 7:3). ¹H NMR (250 MHz, [D₆]DMSO): δ = 7.43–7.51 (m, 2 H, Ar–H), 7.65–7.71 (m, 1 H, Ar–H), 7.91–7.96 (m, 2 H, Ar–H), 8.06–8.09 (m, 1 H, Ar–H), 8.14–8.18 (m, 1 H, Ar–H), 8.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, Ar–H), 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Ar–H), 8.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 116.6, 117.0, 119.0, 124.6, 124.8, 126.3, 126.4, 127.0, 131.2, 132.0, 132.6, 134.0, 134.7, 134.8, 135.3, 138.7, 140.6, 151.7, 156.7, 180.8, 183.1 ppm. HRMS: calcd. for C₂₁H₁₀O₄Na [M + Na]⁺ 349.0471; found 349.0483.

Diisopropyl 2-Butoxy-5-oxo-4*a*,5-dihydro-2*H*-chromeno[3,4-*e*]pyridazine-3,4-dicarboxylate (4i): Colorless oil. *R_f* = 0.3 (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 4:1). ¹H NMR (250 MHz, [D₆]DMSO): δ = 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 1.21–1.26 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 1.30–1.34 (m, 12 H, –NCOOCH(CH₃)₂), 1.48–1.52 (m, 2 H, CH₃CH₂CH₂CH₂O–), 2.94 (d, *J* = 17.5 Hz, 1 H, –CHHCHOBu), 3.32 (dd, *J* = 6.5, 17.5 Hz, 1 H, –CHHCHOBu), 3.52–3.61 (m, 1 H, CH₃CH₂CH₂CHHO–), 3.82–3.91 (m, 1 H, CH₃CH₂CH₂CHHO–), 4.91–5.06 (m, 2 H, –NCOOCH(CH₃)₂), 5.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, –CHOBu), 7.29–7.35 (m, 2 H, Ar–H), 7.44–7.50 (m, 2 H, Ar–H) ppm. ¹³C NMR (62.9 MHz, [D₆]DMSO): δ = 14.1, 18.9, 22.6 (4 C), 31.1, 31.9, 71.1 (2 C), 72.4, 81.4, 116.8, 117.0, 118.4, 123.1, 124.4, 125.1, 125.6, 130.9, 132.7, 151.6, 153.7 ppm. HRMS: calcd. for C₂₃H₃₀N₂O₇Na [M + Na]⁺ 469.1945; found 469.1932.

Supporting Information (see footnote on the first page of this article): ¹H NMR and ¹³C NMR spectra copies for all compounds and NOESY, COSY and HSQC experiments for compounds **3b** and **4d** are provided.

Acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the European Community (Seventh Framework Programme FP7/2007-2013) under grant agreement number 215009. Thanks are also due to the University of Aveiro, Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) and the Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) for funding the Organic Chemistry Research Unit (project PEst-C/QUI/UI0062/2011) and Portuguese National NMR Network (RNRMN). FEDER is also acknowledged for financing the purchase of a Flash 2000 ThermoScientific CHNS-O microanalyzer.

- [1] I. Kostova, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*, 29–46.
- [2] a) I. Kostova, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 365–74; b) A. Beillerot, J. C. Domínguez, G. Kirsch, D. Bagrel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1102–1105.
- [3] L. Wu, X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4236–60.
- [4] P. Curir, F. Galeotti, M. Dolci, E. Barile, V. Lanzotti, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1668–71.
- [5] a) L. Pisani, G. Muncipinto, T. F. Miscioscia, O. Nicolotti, F. Leonetti, M. Catto, C. Caccia, P. Salvati, R. Soto-Otero, E. Mendez-Alvarez, C. Passeleu, A. Carotti, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6685–706; b) M. J. Matos, D. Viña, C. Picciau, F. Orallo, L. Santana, E. Uriarte, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5053–5055.
- [6] L. Piazzini, A. Cavalli, F. Colizzi, F. Belluti, M. Bartolini, F. Mancini, M. Recanatini, V. Andrisano, A. Rampa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 423–426.

- [7] G. Appendino, L. Maxia, M. Bascope, P. J. Houghton, G. Sanchez-Duffhues, E. Munoz, O. Sterner, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1101–1104.
- [8] A. Dornelly, B. S. Blagg, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2702–17.
- [9] T. Yamaguchi, T. Fukuda, F. Ishibashi, M. Iwao, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3755–57, and references cited therein.
- [10] S. Valente, E. Bana, E. Viry, D. Bagrel, G. Kirsch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5827–30.
- [11] T. Yamazaki, T. Tokiwa, *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 1716–22.
- [12] S. Starcević, P. Brozic, S. Turk, J. Cesar, T. L. Rizner, S. Göbec, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 248–261.
- [13] A. Behrenswerth, N. Volz, J. Toräng, S. Hinz, S. Bräse, C. E. Müller, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2842–51.
- [14] C. H. Blomquist, P. H. Lima, J. R. Hotchkiss, *Steroids* **2005**, *70*, 507–14.
- [15] H. Peng, W. Xie, D. M. Otterness, J. P. Cogswell, R. T. McConnell, H. L. Carter, G. Powis, R. T. Abraham, L. H. Zalkow, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 834–34.
- [16] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, T. Montagnon, G. Vassilikogiannakis, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1742–1773; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1668–98.
- [17] O. Malika Ibrahim, *Steroids* **2009**, *74*, 133–62.
- [18] S. Valente, G. Kirsch, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3429–3432.
- [19] L. Brault, D. Bagrel, *Life Sci.* **2008**, *82*, 315–23.
- [20] L. Brault, M. Denance, E. Banaszak, S. El Maadidi, E. Battaglia, D. Bagrel, M. Samadi, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 243–247.
- [21] The enzymatic activity of the GST-Cdc25 recombinant enzyme was determined in 96-well plates in Tris-HCl (50 mM), NaCl (50 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (1 mM) and sodium acetate buffer (SAB) (0.1%), pH 8.1 buffer containing 3-O-methylfluorescein phosphate (500 μM) as substrate. The Gst-Cdc25 proteins, diluted in assay buffer, were used at a final concentration of 1 μg/well. After 2 h at 30 °C, 3-O-methylfluorescein fluorescent emission was measured with a CytroFluor system PerSeptive Applied Biosystems; excitation filter: 475 nm and emission filter: 510 nm.
- [22] A. Maul, *Environ. Monit. Assess.* **1992**, *23*, 153.

Received: December 23, 2012

Published Online: March 27, 2013

Résumé / Resume

Contexte : Dans le cadre de la recherche de nouvelles cibles pour le traitement du cancer, les phosphatases Cdc25 sont des candidats intéressants dont l'inhibition devrait permettre de ralentir la croissance tumorale et éventuellement d'améliorer les traitements actuellement en usage.

Objectif : Les objectifs de ce projet de thèse sont de concevoir et synthétiser de nouveaux composés capables d'inhiber les CDC25, et de déterminer l'efficacité des meilleurs composés dans les lignées cellulaires du cancer du sein.

Méthode : L'évaluation du potentiel inhibiteur des composés est réalisée *in vitro* par une méthode fluorimétrique très sensible (substrat 3-OMFP). Les effets des composés sont évalués dans les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 : La viabilité des cellules est évaluée par la méthode colorimétrique du MTT, la cytotoxicité est évaluée par coloration au bleu trypan et par observation microscopique avec le système de vidéo-microscopie Incucyte. La mort cellulaire est caractérisée par la détection de marqueurs apoptotiques (caspases) et de marqueurs des dommages de l'ADN (H.2AX Histone PARP) par western blot. L'analyse des mécanismes liés à la mort cellulaire sont explorées par cytométrie en flux via la détection d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) avec les sondes H₂DCFDA et Redox Sensor Red. L'inhibition de CDC25 dans les cellules est évaluée indirectement par détection des formes phosphorylées de CDK en Western Blot.

Résultats : L'évaluation *in vitro* de 93 molécules synthétisées nous a permis d'identifier de nouveaux composés actifs. Ils appartiennent à diverses familles chimiques comprenant des stéroïdes, thiophènes, coumarines, imidazoles ainsi que des dérivés de quinone. Les dérivés coumariniques ont montré une intéressante inhibition de CDC25, non décrite jusqu'à présent. Une nouvelle structure coumarine-soufre-quinone, nommée SV37, a été conçue pour optimiser le potentiel d'inhibition. Ce composé présente un fort potentiel inhibiteur des CDC25 *in vitro* (IC₅₀ < 5µM pour CDC25 A et C). L'effet de SV37 sur la croissance cellulaire a été évalué sur les lignées cellulaires MCF-7, MDA-MB-231, hTERT-HME1 et HepG2 sur lesquelles une inhibition de la croissance cellulaire est observée (IC₅₀ de 9 à 18 µM). L'analyse de la viabilité des cellules traitées à la IC₅₀ indique l'absence de mort cellulaire pour la lignée MCF7, tandis que pour la lignée MDA-MB-231 la diminution de la croissance cellulaire est liée à une augmentation de la mort cellulaire. Afin d'étudier les mécanismes liés à la mort cellulaire, nous nous sommes concentrés sur l'étude du modèle triple négatif MDA-MB-231. Les modifications morphologiques de ces cellules sont caractérisées par l'apparition d'altérations cellulaires compatibles avec la mort cellulaire. Le clivage des caspase-3 et 7 a été observé dès 16h de traitement, ce qui suggère l'induction d'une mort apoptotique. Par ailleurs, des ERO ont été détectées 15 min après le début du traitement, cette émission d'ERO a pu être totalement bloquée par un prétraitement avec la N-acétylcystéine (NAC). La détection de marqueurs des dommages de l'ADN, entre 16 et 28 heures après début du traitement, corrobore l'activation des caspases et les observations réalisées en vidéo-microscopie. Après traitement à IC₅₀, une accumulation des pCDK dans les cellules a été observée après 4 et 8 heures, suggérant une inhibition de l'activité CDC25. De plus, les cellules prétraitées avec la NAC n'ont montré aucune accumulation de pCDK après traitement par SV37. Ces résultats suggèrent un lien direct entre la production de ROS induit par le composé SV37 et l'inhibition des CDC25.

Conclusion : Ce projet a permis de définir les coumarines en tant que nouvelle classe de composés inhibitrice des phosphatases CDC25. Ces travaux ont de plus permis l'identification d'un composé coumarine-soufre-quinone SV37 qui constitue une structure de base pour le développement d'inhibiteurs de plus en plus efficaces, pouvant permettre une inhibition efficace de CDC25 et l'inhibition du développement des cellules tumorales.

Mots Clefs : CDC25, Cancer du sein, Coumarine, Quinone, Mort cellulaire, Espèces réactives de l'oxygène.

Background: Within the context of research for new targets for cancer therapy, Cdc25 phosphatases are interesting candidates, the inhibition of which being able to slow down tumor growth and eventually improve the cancer treatments currently in use.

Objectives: The objectives of this PhD project are to design and synthesize new compounds able to inhibit CDC25 and to determine efficiency of identified compounds in breast cancer cell lines.

Method: In vitro evaluation of inhibitory potential of compound is realized through a high sensitivity fluorometric method (3-OMFP substrate). Cellular effects were evaluated in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. Effects on cell viability are assessed through MTT assays, and cytotoxicity is evaluated through trypan blue assays and microscopic observations with Incucyte videomicroscopy system. Cell death was characterized by detection of apoptotic markers (caspases) and DNA damages markers (PARP Histone H.2AX) by Western Blotting. The analyses of mechanisms underlying cell death were explored through cytometric detection of reactive oxygen species (ROS) with H₂DCFDA and Redox Sensor Red probes. Inhibition of CDC25 in cells was indirectly evaluated through detection of phosphorylated forms of CDK by Western Blotting.

Results: In vitro evaluation of 93 synthesized compounds allowed us to find new active compound in various chemical families including steroid, thiophene, coumarinic, imidazole and quinone derivatives. The coumarinic derivatives showed potent CDC25 inhibition. A new coumarin-sulfur-quinone combined structure, named SV37, was designed to optimize efficiency of inhibition. In vitro tests on this compound, showed a strong CDC25 inhibitory potential (IC₅₀ under 5µM for CDC25 A and C). Effect of SV37 on cell growth was evaluated on various cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, hTERT-HME1 and HepG2). Results indicate inhibition of cell growth (IC₅₀ values from 9 to 18 µM). Analysis of cell viability indicates no remarkable cell death in MCF7 at IC₅₀ value whereas in MDA-MB-231 the cell growth decrease was characterized by an increase of cell death. For deeper investigations on the cell death and on the underlying mechanisms, we focused the study on the triple negative model MDA-MB-231. The morphological changes of MDA-MB-231 cells during the treatment were characterized by the appearance of cellular alterations compatible with a cellular demise and culminating with a disruption of cells after 20h. Caspase-3 and 7 cleavages were observed 16h after beginning of the treatment, suggesting an apoptotic cell death. A ROS induction was observed 15 min after the beginning of the treatment and was totally prevented by N-acetylcysteine (NAC) pretreatment. DNA damage markers were detected between 16 and 28 hours after beginning of treatment, a timing falling with caspase activation and with the appearance of cell demise observed by video microscopy. Accumulation of pCDK in cells was observed after 4 and 8 hr of treatment by SV37 at IC₅₀ suggesting an inhibition of CDC25 activity, and cells pretreated with NAC showed no accumulation of pCDK after SV37 treatment. This strongly suggests a direct link between ROS generation by the compound SV37 and the accumulation of pCDK.

Conclusion: This project increased knowledge on inhibitors of CDC25 phosphatases and allowed the identification of coumarine compound as new CDC25 inhibitors. This work will enable the development of ever more efficient inhibitors, leading to efficient inhibition of CDC25 and inhibition of tumor development.

Keywords: CDC25, Breast Cancer, Coumarine, Quinone, Cell death, Reactive Oxygen Species.