

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BATNA -2- MOSTEFA BEN BOULAÏD
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES



Thèse en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière

SCIENCES BIOLOGIQUES

Option

Biologie moléculaire

Thème

**Étude des mécanismes moléculaires de l'action
antitumorale de la désoxypodophyllotoxine *in vitro* et
exploration de son effet *in vivo* dans le cancer du sein**

Présentée par : Meyada KHALED

JURY		Grade	Université
Président	Salah LAROUI	Pr	Mostefa Benboulaid. Batna 2
Examinatrice	Hamama BOURICHE	Pr	Ferhat Abbas. Sétif 1
Examinatrice	Widad SOBHI	MCA	Ferhat Abbas. Sétif 1
Examinatrice	Bachra KHETTAL	MCA	Abderrahmane Mira. Bejaia
Examinatrice	Leila HAMBABA	Pr	Mostefa Benboulaid. Batna 2
Directrice de thèse	Ghania BELAALOU	Pr	Mostefa Benboulaid. Batna 2

Année universitaire 2017 - 2018

REMERCIEMENTS

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

À madame le Professeur Ghania BELAALOUI, directrice de ma thèse

*Ce fut un grand honneur pour moi que d'être encadrée par vous tant pour vos
qualités professionnelles incontestables que pour votre soutien. J'ai pu apprécier
l'étendue de vos connaissances, votre disponibilité et vos grandes qualités
humaines.*

*Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que
vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes
conditions. Je garderai dans mon cœur votre générosité, votre compréhension et
votre efficacité. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très
sincèrement.*

*Les conseils fructueux que vous m'avez prodigués ont été très précieux, je vous en
remercie.*

*Votre bonté, votre modestie ne peuvent que susciter ma grande estime et mon
profond respect.*

*Veillez trouver ici, professeur, l'assurance de ma reconnaissance et ma profonde
admiration.*

À Mr le Professeur Lu-Yong ZHANG

Sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

*Il m'a accueillie dans son laboratoire à bras ouverts et a accepté de collaborer
avec nous*

*Il a fait confiance en moi et m'a facilité l'accès à son plateau technique tout en
m'encourageant*

À Mr le Professeur Salah LAROUI, président de jury

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance.

Nous vous prions de trouver dans ce travail le témoignage de notre reconnaissance et l'assurance de nos sentiments respectueux,

Au Professeur Leila HAMBABA, examinatrice de thèse

Nous avons eu la chance de vous avoir parmi les membres de notre jury, et nous vous remercions d'avoir bien voulu, en toute simplicité, nous faire l'honneur de juger ce travail.

Veillez accepter, chère Madame, l'expression de mon profond respect et ma grande considération.

Au Professeur Hamama BOURICHE, examinatrice de thèse

Nous vous remercions de la spontanéité et de la simplicité avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail.

Puisse ce modeste travail représenter notre profond respect et témoigner de notre estime la plus sincère.

Au Dr Bachra KHETTAL, examinatrice de thèse

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de nous aider à juger ce travail.

Nous espérons être dignes de votre confiance, et nous prions, chère Madame, d'accepter notre profonde reconnaissance et notre haute considération.

Au Dr Widad SOBHI, examinatrice de thèse

Nous sommes particulièrement touchés par la gentillesse avec laquelle vous avez bien voulu accepter de juger ce travail.

Permettez-nous, cher Madame, de vous exprimer notre profond respect et notre sincère gratitude.

DÉDICACES

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyée et encouragée à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

À ma très chère maman, Mme Farida BEZZOUZA

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et avoir réalisé aujourd'hui l'un de vos rêves.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon amour infini.

Vous résumez si bien le mot « maman » qu'il serait superflu d'y ajouter quelque chose.

Que dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant mon chemin.

Je t'aime maman...

À mon très cher mari, Amor

Merci d'avoir donné un sens à ma vie...

*Merci pour ton amour, ton soutien et tes encouragements qui ont toujours été
pour moi d'un grand réconfort.*

Merci pour ta gentillesse et ton sens du sacrifice.

*Je te dédie ce travail qui est aussi le tien, en implorant DIEU le tout puissant de
nous accorder une longue vie de bonheur, de prospérité et de réussite, en te
souhaitant le brillant avenir que tu mérites et de nous réunir dans l'au-delà
inchALLAH.*

Je t'aime... tout simplement.

À toute ma chère famille,

À ma chère belle-famille,

À tous ceux que j'aime,

À tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin,

Et à tous ceux pour qui ma réussite leur tient à cœur,

Je dédie ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS

DÉDICACES

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

SECTION I : LES LIGNANES ET LA DÉSOXYPODOPHYLLOTOXINE

1. Lignanes	3
2. Désoxypodophyllotoxine.....	4
2.1. Histoire de la recherche sur la podophyllotoxine	4
2.2. Effets pharmacologiques de la DPT	5
2.2.1. La DPT: Un agent antitumoral, anti-microtubule et modulateur des protéines de régulation du cycle cellulaire	5
2.2.2. L'effet inhibiteur de la DPT sur la migration	7
2.2.3. L'effet de la DPT sur les propriétés électrophysiologiques des neurones de mammifères et la régulation du Ca ²⁺ signalisation	8
2.2.4. Autres effets pharmacologiques de la DPT	10
2.3. La DPT, un précurseur de la biosynthèse des lignanes de haute valeur.....	11
2.4. Solubilité de la DPT dans l'eau et validation de son activité <i>in vivo</i>	11
3. VP-16 et docétaxel.....	13
4. <i>Dyosma versipellis</i>	14
4.1. Rhizome de <i>D.versipellis</i>	14
4.1.1. Composés chimiques actifs	14
4.1.2. Effets biologiques.....	15

SECTION II : RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE ET DE L'APOPTOSE

1. Cycle cellulaire des cellules eucaryotes : mitose et régulation	18
1.1. La mitose	18
1.1.1. Les phases du cycle cellulaire	18
1.2. Régulation du cycle cellulaire	19
1.2.1. La phosphorylation des protéines.....	19
1.2.2. Kinases cycline-dépendantes.....	20
1.2.3. Inhibiteurs des protéines kinases	23
1.1.4. Stratégie d'utilisation des inhibitrices des protéines kinases : perspectives	

en oncologie	24
2. Microtubules et agents anti-microtubules	25
2.1. Dynamique des microtubules et formation du fuseau mitotique.....	25
2.1.1. Structure	25
2.1.2. Propriétés dynamiques et régulation	26
2.1.3. Rôle crucial des microtubules dans la mitose	29
2.2. Agent anti-microtubules	29
2.2.1. Classification	29
2.2.2. Mécanisme d'action et activités pharmacologiques.....	30
3. Mort cellulaire	31
3.1. Apoptose : mort cellulaire programmée.....	32
3.1.1. Voies de l'apoptose	32
3.1.2. Régulateurs de l'apoptose	35

SECTION III : LES MODÈLES ANIMAUX DE CANCER DU SEIN

1. Les modèles murins.....	38
1.1. Les modèles Nude (nu) et severe combined immunodeficiency (SCID).....	38
1.2. Beige (bg).....	39
1.3. Nog	39
2. Modèles de cancer des murins classiquement utilisés.....	39
2.1. Modèles des xéno greffes de tumeurs humaines	39
2.1.1. Modèle ectopique de xéno greffes tumorales.....	40
2.1.2. Modèle orthotopique de xéno greffes tumorales	40
2.1.3. Modèle de cancer métastatique	42
2.1.4. Modèle des tumeurs dérivées de patient (PDX)	42
2.2. Modèle des souris génétiquement manipulées	43

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels.....	44
1.1. Lignées cellulaires	44
1.2. Médicaments et réactifs divers	44
1.3. Animaux	45
1.4. Appareils et logiciels	45
2. Méthodes	46
2.1. Culture cellulaire	46
2.2. Mesure de viabilité par colorimétrie (Calcul de la CI_{50}).....	46
2.2.1. Principe du test au CCK-8.....	46
2.2.2. Procédure.....	47
2.3. Cytométrie de flux.....	48
2.3.1. Analyse du cycle cellulaire.....	48
2.3.2. Le test à double coloration d'Annexine-V/PI	49
2.4. Évaluation morphologique des cellules.....	50

2.5. Test de coloration par immunofluorescence	50
2.6. Test du potentiel de membrane mitochondriale	51
2.7. Test d'inhibition des caspases.....	52
2.8. Le Western Blot.....	53
2.8.1. Préparation des échantillons de protéines	53
2.8.2. Électrophorèse SDS-PAGE	56
2.9. Étude de l'essai de la DPT <i>in vivo</i>	59
2.9.1. Inoculation de xélogreffe tumorale	59
2.9.2. Traitement des souris	60
2.9.3. Évaluation de la croissance tumorale	62
2.10. Analyses statistiques.....	62

CHAPITRE III : RÉSULTATS

1. La DPT exerce des effets antiprolifératifs sur les cultures des lignées cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231	63
2. La DPT induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231	65
3. La DPT induit des changements dans l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire dans les cellules tumorales	71
4. La DPT induit des changements morphologiques dans les cellules cancéreuses.....	72
5. La DPT inhibe la polymérisation des tubulines	74
6. La DPT déclenche l'apoptose des cellules MCF-7	77
7. Dépolarisation de la membrane mitochondriale par la DPT	82
8. La DPT induit l'activation des caspases dans les cellules MCF-7	84
9. Effet de la DPT sur l'expression de protéines liées à l'apoptose dans les cellules MCF-7	85
10. La DPT inhibe la croissance tumorale des xélogreffes de cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle des souris Nudes BALB/c	86

CHAPITRE IV : DISCUSSION

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

ANNEXE 1 : FORMULES DES TAMPONS ET DES RÉACTIFS

ANNEXE 2 : PUBLICATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
APs : ammonium persulfate
APC : anaphylaxie cutanée passive
ARN : acide ribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
ATM : ataxia telangiectasia mutated
ATP : adénosine triphosphate
β-CD : β-cyclodextrine
Bad : Bcl-2-associated death promoter
Bak : Bcl-2 omologous Antagonist Killer
BALB/c : souche de souris endémiques
Bax : Bcl-2-associated X
BCA : bichoninic acid
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-w : Bcl nommé par Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research
bg : Beige
BHE : barrière hémato-encéphalique
Bid : BH3-interacting domain death agonist
BRCA-1 : breast cancer 1
BSA : bovin serum albumin
CAK : CDK activating kinase
Caspase : Cystein-ASpartate protease
CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules
CPPC : cancer du poumon à petites cellules
CCCP : carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone
CCK-8 : cell counting kit-8
Cdc : cell division cycle
CDK : kinases cycline-dépendantes
Chk2 : checkpoint kinase 2
CI₅₀ : concentrations inhibitrices à 50%
CML : cellules musculaires lisses
CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires
COX : cyclooxygénase
CSTN : cancer du sein triple négatif
CT : computerized tomography
Cyt-c : cytochrome c
D.versipellis : *Dysosma versipellis*
DCTD : division of cancer treatment and diagnosis
DD : death domain
DED : death effector domain

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNP : dinitrophényle
DO : densité optique
DPT : désoxypodophyllotoxine
DTP : developmental therapeutics program
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinases 1/2
FADD : Fas-associated death domain
Fas : apoptosis stimulating fragment
FBS : fetal bovine serum
FDA : Food and Drug Administration
FITC : fluorescein isothiocyanate
xg : fois la gravité
G1 : gap 1
G2/M : gap 2/mitose
GDP : *guanosine diphosphate*
GEMM : Genetically Engineered Mouse Model
GRD : ganglion de la racine dorsale
GTP : *guanosine triphosphate*
h : heure
HeLa : Henrietta Lacks
HER2/neu : human epidermal growth factor receptor-2.
HP-β-CD : 2-hydroxylpropyl-β-cyclodextrine
I3C : indole-3-carbinol
IAP : inhibitor of apoptosis protein
IgG : immunoglobuline G
IgE : immunoglobuline E
INCa : Institut National du Cancer
INK4 : **IN**hibitors of **CDK4**
iNOS : inducible nitric oxide synthase
IRM : imagerie par résonance magnétique
JC-1 : 1^{er} colorant cationique formant des agrégats J identifiés par Jelly
JNK : c-Jun N-terminal kinases
kDa : *kilodalton*
KIP : kinase inhibitor protein
KO : knock-out
L15 : Leibovitz's medium
LANL : leucémie aiguë non lymphoblastique
LOX : lipoxigénase
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocyte T
M : mitose
M : mol/L

mM : mmol/L
MAD : median absolute deviation
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCF-7 : Michigan Cancer Foundation -7
MDA-MB-231 : M.D.Anderson Hospital, Metastatic Breast
MEC : matrice extracellulaire
1-Métoxy PMS : 1-méthoxy-5-méthylphénazinium méthylsulfate
μM : μmol/L
min : minutes
MMP: métalloprotéinases matricielles
NCCD : Nomenclature Committee on Cell Death
NK : natural killer
NKT : natural killer T
nM : nmol/L
nm : nanomètres
NO : oxyde d'azote
Nog : NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ ^{null}
nu : nude
P1 : position 1
P53 : protéine cellulaire de 53kDa
PAMs : protéines associées aux microtubules
PARP : poly (ADP-ribose) polymérase
PBS : phosphate buffered saline
PDGFR : platelet-derived growth factor receptor
PDTX : patient-derived tumor xenograft
pb : paires de bases
PI : propidium iodide
PKI : protein kinase inhibitor
PM : poids moléculaire
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
 $\Delta\Psi_m$: potentiel transmembranaire de mitochondrie
PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondriale
PVDF : polyvinylidène difluoride
RE : récepteur d'estrogène
RE⁺ : RE-positif
RE⁻ : RE-négatif
RP : récepteur de la progestérone
rpm : revolutions per minute
RTV : relative tumor volume
S : synthèse
SBE- β -CD : sulfobutyléther- β -cyclodextrine
sc. : sous-cutanée
SCID : severe combined immunodeficiency
SEM : standard error of the mean

SN : saline normale
SNC : système nerveux central
tBid : truncated Bid
TBST : Tris-Buffered Saline-Tween
TBSTX : Tris-Buffered Saline-Triton X
TEP : tomographie par émission de positons
Thr 14 : thréonine 14
TI : taux d'inhibition
TEMED : tétraméthyléthylènediamine
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TNBC: triple-negative breast cancer
TNFR : tumor necrosis factor receptor
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TTX-S Na⁺: *tetrodotoxin-sensitive sodium channels*
TTX-R Na⁺: *tetrodotoxin-resistant sodium channels*
Tyr 15 : tyrosine 15
UV : ultraviolet
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
VT : volume tumoral
Wee1 : le terme « **wee** » signifie petit
Myt1 : Membrane associated, tyrosine (Y)- and threonine (T)-specific, cdc2 inhibitory kinase
WST-8 : water soluble tetrazolium-8

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique de la podophyllotoxine.....	03
Figure 2. Structure chimique de la DPT	04
Figure 3. Effets pharmacologiques de la DPT.....	10
Figure 4. Structures chimiques de VP-16 (A) et de docétaxel (B).....	13
Figure 5. Rhizome <i>Dyosma versipellis</i> (racine), à Shennong jia.....	15
Figure 6. Phases et événements majeurs du cycle cellulaire.....	19
Figure 7. Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire.....	20
Figure 8. Potentiel anti-mitogène de l'I3C.....	22
Figure 9. Intérêts thérapeutiques potentiels des inhibiteurs des CDKs.....	23
Figure 10. Dynamique des microtubules.....	26
Figure 11. Représentation schématique des différentes étapes du cycle cellulaire dans une cellule somatique.....	27
Figure 12. Microtubules: les bases.....	28
Figure 13. Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.....	33
Figure 14. Substrats en aval des caspases exécutrices de l'apoptose.....	34
Figure 15. Implication des caspases dans la mort cellulaire.....	35
Figure 16. Modèles des xénogreffes de tumeurs humaines.....	41
Figure 17. Mécanisme du test basé sur le WST-8.....	46
Figure 18. Inoculation de xénogreffe tumorale et traitement des souris Nudes BALB/c.....	61
Figure 19. Analyse de la prolifération cellulaire des cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) par la méthode CCK-8 après traitement par la DPT.....	64
Figure 20. Effet dose et temps dépendants de la DPT sur la progression du cycle cellulaire des lignées cellulaires de cancer du sein.....	68
Figure 21. Analyse des données recueillies à partir de l'étude de l'action de la DPT sur la progression du cycle cellulaire des cellules MCF-7 (A et C) et MDA-MB-231 (B et D).....	70
Figure 22. Effet temps-dépendant de la DPT sur l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses du sein humain.....	71

Figure 23. Modifications morphologiques des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 après traitement avec la DPT.....	73
Figure 24. Effet de la DPT sur la polymérisation des tubulines.....	76
Figure 25. Analyse en cytométrie de flux de la double coloration Annexine V-FITC/PI...	81
Figure 26. Evaluation du potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ par la coloration au JC-1.....	83
Figure 27. Effet du z-VAD-fmk sur l'inhibition de la croissance cellulaire des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 par la DPT.....	85
Figure 28. Effet temps-dépendant de la DPT sur l'expression des gènes liés à l'apoptose dans les cellules tumorales MCF-7.....	86
Figure 29. Effet de la DPT <i>in vivo</i> sur les xénogreffes du cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle des souris Nudes BALB/c.....	91
Figure 30. Taille typique et apparence macroscopique des nodules du cancer du sein humain MDA-MB-231 au 21 ^{ème} jour chez les souris Nudes non-traitées et traitées par des médicaments.....	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des médicaments ciblant les tubulines.....	30
Tableau 2. Apoptose, nécrose et autophagie.....	31
Tableau 3. Protocole d'administration des médicaments et des réactifs.....	60
Tableau 4. Les valeurs CI_{50} obtenues dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain après traitement par la DPT et le VP-16.....	63
Tableau 5. Test de l'Annexine V/PI après 48h de traitement des MCF-7 et MDA-MB-231 par la DPT.....	81
Tableau 6. Test de l'Annexine V/PI après 12 – 48h de traitement des MCF-7 par la DPT (20 nM).....	82
Tableau 7. Effet expérimental de la DPT sur les xénogreffes de cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle des souris Nudes BALB/c.....	87

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

Le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde après le cancer du poumon, la cinquième cause la plus fréquente de décès par cancer, et la première cause de décès par cancer chez la femme. Le cancer du sein est un problème de santé publique et son incidence augmente régulièrement [1]. Le terme «cancer du sein» représente un continuum de maladies, allant du carcinome non-invasif au carcinome invasif [2]. Il s'agit d'une prolifération de cellules malignes au niveau du tissu mammaire. Ces cellules peuvent exprimer ou non trois récepteurs importants: le récepteur d'œstrogène (RE), le récepteur de la progestérone (RP), et le récepteur des facteurs de croissance épidermiques humains (HER2/neu). Plus de 60% des cancers du sein se sont révélés contenir des niveaux mesurables du RE. Les cancers du sein positifs pour le RE sont potentiellement sensibles aux effets des œstrogènes, favorisant leur croissance. Par la suite, le développement et l'application clinique d'un certain nombre de modulateurs différents des récepteurs stéroïdes a fourni une excellente opportunité pour gérer efficacement les cancers du sein RE-positif (RE⁺). En général, les patientes qui sont RE⁺ ont une survie sans récurrence plus longue et peuvent survivre plus longtemps que celles atteintes d'un cancer RE-négatif (RE⁻) [3, 4]. Malheureusement, les cancers du sein RE-négatifs sont plus agressifs par un mécanisme encore mal connu [5]. Le cancer du sein triple négatif (TNBC) n'exprime pas de RE, de RP et de HER-2 [6]. Il a, généralement, un pronostic plus mauvais que les autres cancers du sein exprimant ces récepteurs. Alors que les tumeurs RE⁺ et RP⁺ bénéficiant d'une thérapie hormonale et que les tumeurs qui amplifient le gène HER-2/Neu, sont traitées avec des anticorps monoclonaux ciblant le récepteur HER-2 en plus de la chimiothérapie, le TNBC est traité uniquement par la chimiothérapie [7].

Plusieurs thérapies anti-cancéreuses ont été développées au cours des dernières décennies, visant toutes à s'attaquer à une ou plusieurs des caractéristiques connues du cancer « *Cancer Hallmarks* » [8], qui sont : le maintien d'une signalisation proliférative, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, la résistance à l'apoptose, l'immortalité répliquative, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion et de la métastase, le dérèglement du métabolisme énergétique de la cellule, l'échappement au système immunitaire, ainsi que les facteurs facilitateurs : l'instabilité génétique et l'inflammation. Les plantes sont considérées parmi les principales sources de produits naturels biologiquement actifs. Dans le monde entier, plus de 50 000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicinales [9]. Au cours des dernières années, les apports des phytoestrogènes étaient d'un grand intérêt, car ils jouent un rôle important dans la prévention du cancer. Les phytoestrogènes sont un groupe de composés non

stéroïdiens largement distribués dans les plantes. Il existe diverses classes structurales de phytoestrogènes où ils sont classifiés selon leur structure chimique. Les phytoestrogènes sont structurellement ou fonctionnellement semblables aux œstrogènes mammifères. Par conséquent, les phytoestrogènes peuvent se lier faiblement aux récepteurs des œstrogènes et par la suite promouvoir ou inhiber les effets des œstrogènes [10]. Ainsi, ils jouent un rôle important dans la prévention des cancers [11]. Comme agonistes d'œstrogènes, les phytoestrogènes imitent les œstrogènes endogènes et provoquent des effets oestrogéniques. D'un autre côté, ils peuvent empêcher une activité oestrogénique et agir comme antagonistes d'œstrogènes, par inhibition ou modification des RE provoquant des effets anti-oestrogéniques [12]. Les principaux phytoestrogènes sont les isoflavones et les lignanes [13, 14].

Le but du présent travail de thèse est d'étudier, pour la première fois, les effets de la désoxypodophyllotoxine, une substance structurellement liée au lignane podophyllotoxine, sur des lignées de cancer du sein *in vitro* et *in vivo*, afin de fournir une référence pour la recherche clinique. La désoxypodophyllotoxine utilisée dans ce travail est le produit d'un processus semi-synthétique utilisant la podophyllotoxine (extrait de *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng) comme matériau de départ. A cet effet, deux lignées du cancer du sein sont testées : la lignée MCF-7 dérivant d'un cancer du sein ER⁺ et la lignée MDB-MB-231 dérivant d'un TNBC.

En même temps que notre étude était en cours, une étude canadienne venait d'être publiée montrant que la DPT dans sa forme brute, dérivé de *Juniperus communis*, présente un effet antiprolifératif et antitumoral puissant sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 du cancer du sein humain, *in vitro* [15]. Etant entrés ainsi dans la compétitivité même, ces résultats nous ont poussés à nous hâter pour démontrer les effets de la forme semi-synthétique de la DPT, dérivé de *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying (Berberidaceae), à la fois *in vitro* et surtout *in vivo* (ce qui ferait la nouveauté) sur nos lignées cellulaires. Nous avons comparé les activités de la DPT à celles de l'étoposide (VP-16) et du docétaxel, deux médicaments bien connus et utilisés dans le traitement du cancer du sein.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

SECTION I

LES LIGNANES

ET LA

**DÉSOXYPODOPHYLLO-
TOXINE**

1. Lignanes

Les lignanes sont une famille de composés phénoliques qui sont très répandus dans le règne végétal. Les lignanes sont contenus dans plus de 55 familles de plantes [16] et qui sont obtenus par voie de l'acide shikimique. Les lignanes sont formés par l'union de deux unités phénylpropanes.

La podophyllotoxine ($C_{22}H_{22}O_8$) (**Figure 1**) est un lignane aryltétraline d'origine naturelle. Il a été trouvé que la podophyllotoxine se lie à la tubuline, la sous-unité monomérique fondamentale des microtubules, provoquant l'inhibition de l'assemblage des microtubules et, par conséquent, l'arrêt du cycle cellulaire en métaphase [17]. Il est important de noter que la podophyllotoxine est le lignane le plus abondant dans la podophylline, une résine produite par des espèces du genre *Podophyllum* (Berberidaceae) [18].

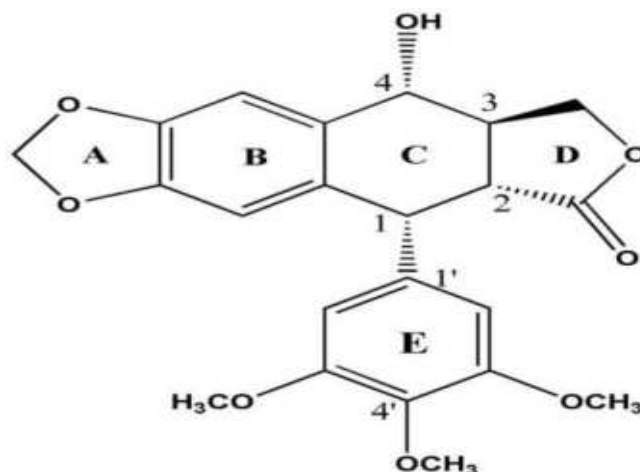


Figure 1. Structure chimique de la podophyllotoxine [19].

Malheureusement, la podophyllotoxine est responsable d'une irritation et d'une toxicité gastro-intestinale. En outre, la collecte des plantes, connues pour être des sources naturelles de la podophyllotoxine, est limitée à cause de la rareté et l'insuffisance de fournir la demande croissante de ce composé utilisé comme matière première pour la synthèse de VP-16 et de nouveaux dérivés [20, 21]. Pour ces raisons et d'autres, d'éventuelles sources de la podophyllotoxine et de nouvelles approches pour sa synthèse ont été nécessaires. Un nouveau procédé biotechnologique intéressant et constituant une alternative pour la production des lignanes spécifiques, est la conversion de la désoxypodophyllotoxine isolée à partir des

rhizomes d'*Anthriscus sylvestris* (une plante commune en Europe de l'Ouest) en épipodophyllotoxine, le diastéréoisomère de podophyllotoxine [22].

2. Désoxypodophyllotoxine

La désoxypodophyllotoxine (DPT) ($C_{22}H_{22}O_7$) (**Figure 2**) est un composé phytochimique structurellement très lié à la podophyllotoxine. Elle est considérée comme le lignane principal d'*Anthriscus sylvestris* L. Hoffm [23]. Elle possède plusieurs propriétés pharmacologiques, notamment antiprolifératives, antitumorales, antivirales, anti-inflammatoires, antiagrégantes plaquettaires et antiallergiques [24-32]. Le nombre d'études de son mécanisme d'action sur les cellules cancéreuses [33] et d'autres propriétés pharmacologiques sont en croissance [34-38].

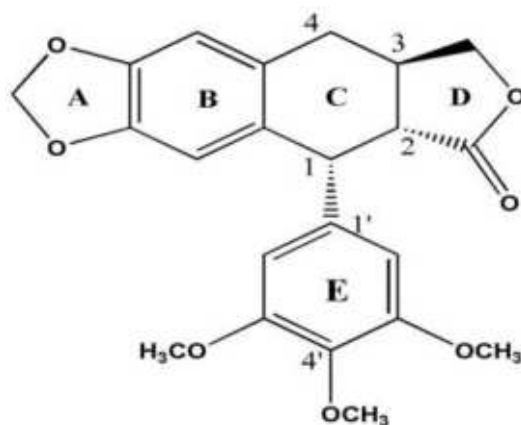


Figure 2. Structure chimique de la DPT [19].

Dans plusieurs espèces végétales, l'aryltétraline lignane, la DPT, est considéré comme un constituant très intéressant car il est utilisé comme un précurseur dans la production de la podophyllotoxine [23]. En plus des rhizomes d'*Anthriscus sylvestris* (*A.sylvestris*), la DPT peut également être isolée à partir de *Pulsatilla koreana* (Yabe ex Nakai) Nakai ex T. Mori, les espèces de *Podophyllum*, de *Dysosma* et d'autres espèces végétales.

2.1. Histoire de la recherche sur la podophyllotoxine

La podophyllotoxine, un aryltétraline lignane d'origine naturelle, a été isolé pour la première fois en 1880 par Podwysstzki à partir de la plante nord-américaine *Podophyllum peltatum* L. (*Podophyllum* Américain), communément appelée la mandragore américaine ou la pomme de Mai. La podophyllotoxine, un lignane bioactif non-alcaloïde, a également été

isolé à partir du *Podophyllum emodi* Wall. ex Royle (Podophyllum Indien, syn. *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying) et *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying (Podophyllum Taïwanais, syn. *Dysosma pleiantha* (Hance) Woodson) [39].

La Podophyllotoxine est un composé pentacyclique (Les noyaux A, B, C, D et E) (**Figure 1**). En général, toutes les substitutions en position C-4 sur l'anneau C sont acceptables et permettent à la fois d'intensifier l'activité anticancéreuse et l'activité topoisomérase [40]. Toutefois, une simple modification de la structure peut conduire à la formation de composés ayant différents mécanismes d'action, interférant avec une variété de cibles biomoléculaires.

La classe des podophyllotoxines comprend plusieurs structures chimiques étroitement apparentées en particulier la résine qui se compose principalement de podophyllotoxine, de DPT, de 4'-déméthylpodophyllotoxine et de α -, β -peltatines [41]. Cette classe comprend également d'autres agents cytostatiques tels que le VP-16 et le téniposide, agents semi-synthétiques de la podophyllotoxine, utilisés pour le traitement du cancer du poumon et des testicules, du sarcome d'Ewing, des lymphomes, du glioblastome et de la leucémie aiguë non lymphoblastique [18]. La podophyllotoxine se lie à la tubuline ce qui provoque l'inhibition de l'assemblage des microtubules et, par conséquent, conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en métaphase [17]. Elle se lie également au site colchicine de la tubuline [42]. Malheureusement, la podophyllotoxine a échoué dans le contexte clinique. En outre, elle peut être extrêmement dangereuse en cas de surdosage. La toxicité de l'extrait du *Podophyllum* pour les surfaces muqueuses a été démontrée en 1872 [41]. Plus tard, en raison de l'irritation et de la toxicité gastro-intestinale et afin d'obtenir des agents antitumoraux plus puissants et moins toxiques comme le VP-16 [43] et le téniposide [44], d'importantes modifications structurales ont été effectuées.

2.2. Effets pharmacologiques de la DPT

2.2.1. La DPT : un agent antitumoral, anti-microtubule et modulateur des protéines de régulation du cycle cellulaire

Les deux classes de cyclines et des protéines kinases cycline-dépendantes (CDK), sont étroitement impliquées dans la progression des cellules au cours du processus du cycle cellulaire [45]. La combinaison du Cdk4 ou Cdk6 avec les cyclines de type D (D1, D2 et D3) assure la progression du cycle cellulaire à travers la phase G1. A la fin de la phase G1, les

complexes Cdk2 et cyclines type E (E1 et E2) sont nécessaires pour l'entrée en phase S. Tandis que, les complexes Cdk2 et cyclines type A (A1 et A2) jouent un rôle important dans la progression de la phase S. Durant la phase G2, les complexes Cdk1 cyclines type B (B1 et B2) sont formés pour déclencher la transition G2/M et la progression de phase M. L'activité du complexe Cdk1/cycline B dépend principalement du niveau de la cycline B et de l'état de phosphorylation de Cdk1 [46]. Tandis que *cdc25c* (cell division cycle 25c) régit l'activation du complexe Cdk1/cycline B par le biais de la déphosphorylation de Cdk1, cette dernière peut être phosphorylée et inhibée par *Wee1/Myt1* [47]. Ainsi, l'activation du Cdk1 et l'accumulation de la cycline B dans le noyau sont nécessaires pour la progression à travers la phase G2/M du cycle cellulaire [48]. L'inhibition de la synthèse des protéines au cours de cette phase prévient la cellule de subir une mitose. La phase G2 se poursuit jusqu'à ce que la cellule entre dans la mitose pendant laquelle une biosynthèse importante se produit. Elle implique principalement la production de microtubules, qui sont nécessaires au cours de la mitose.

Des études récentes ont étudié l'effet de la DPT, isolée à partir des racines d'*A.sylvestris* (produit en Jeonnam Gurye, Corée), sur les cellules HeLa (Henrietta Lacks) du carcinome du col utérin. Contrairement au Taxol (contrôle positif) qui augmente la polymérisation de la tubuline, la DPT se lie directement à la tubuline, empêche l'assemblage des microtubules et induit la perte du réseau de microtubules après un traitement par 0.25 μ M de DPT pendant 24h. Etant donné que toute inhibition de la polymérisation de la tubuline a été impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans diverses lignées de cellules cancéreuses, le traitement par la DPT provoque une accumulation, temps-dépendant, des cellules dans la phase G2/M avec une diminution concomitante de la population des cellules de la phase G1, et ceci probablement en raison de son affinité pour la tubuline [49]. L'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M, induit par la DPT, est associé à sa capacité de modifier l'expression des cyclines A et B1. En outre, les effets antiprolifératifs de la DPT sur les cellules HeLa du carcinome du col utérin ont été accompagnés par une augmentation de la population cellulaire sub-G1, une caractéristique de la mort cellulaire apoptotique, ce qui confirme l'implication de la DPT dans l'effet apoptotique.

De nombreux effets antitumoraux des agents anticancéreux sont associés à l'activation des voies apoptotiques [50]. La DPT a également été rapportée comme étant capable de promouvoir le clivage à la fois de la caspase-3 et de la caspase-7, accompagné par le clivage

de l'enzyme de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), ce qui révèle que le mécanisme d'apoptose induit par la DPT implique l'activation de la voie des caspases [33]. De plus, le traitement par la DPT induit l'accumulation du gène suppresseur de tumeurs p53 [33] conduisant à la translocation mitochondriale de la protéine Bcl-2-associated X (Bax) qui favorise la libération mitochondriale de la cytochrome-c (cyt-c) dans le cytosol et l'activation de l'apoptose [51]. L'augmentation de l'expression de p53 et de Bax est mise en parallèle avec l'activation des agents de phosphorylation du p53, y compris les senseurs des lésions de l'ADN, ATM et Chk2 [52-54], aboutissant à l'activation de la cascade des caspase-3 et 7 et de l'apoptose.

2.2.2. L'effet inhibiteur de la DPT sur la migration

Les MMP-9 et MMP-2, protéines de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMPs), sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans les processus physiologiques normaux tels que le développement embryonnaire, la reproduction et le remodelage des tissus, ainsi que dans les processus pathologiques, y compris l'arthrite et l'hémorragie intracérébrale [55]. Ils possèdent également un rôle important dans la migration des cellules musculaires lisses (CML) vers l'intima des vaisseaux sanguins [35]. Exprimée dans la phase initiale de la migration des CML dans le modèle des lésions artérielles chez le rat, la protéine MMP-9 joue un rôle important dans la régulation de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Avec la MMP-2, la MMP-9 joue également un rôle essentiel dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), une des principales causes de l'athérosclérose [56]. Au cours de ce processus pathologique, le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) est sécrété par les CMLV [57] et induit l'activation de l'ERK1/2, ce qui favorise la croissance et le mouvement cellulaire [58-61]. Une étude antérieure a révélé que, après le traitement par la DPT *in vitro*, les activités enzymatiques des MMP-9/2 et le TNF- α induisant la production de la MMP-9 ont été tous les deux inhibés en raison d'une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1/2*), p38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), ce qui suggère le rôle majeur de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dans l'expression du MMP-9 et l'invasion des CML de l'aorte humaine. Contrairement à la MMP-9 pour laquelle l'expression de son gène a été inhibée par la DPT, l'expression du gène de la MMP-2 n'a pas

été modulée [35]. En conclusion, la DPT présentait un double-effet inhibiteur : sur les activités enzymatiques des MMP-2 et -9 d'une part, et sur l'expression du gène de la MMP-9 d'autre part. Et par conséquent, ce composé peut être d'une grande efficacité dans le traitement des maladies inflammatoires sévères, en particulier l'athérosclérose.

2.2.3. L'effet de la DPT sur les propriétés électrophysiologiques des neurones de mammifères et la régulation de la signalisation Ca^{2+} dépendante

Les neurones des ganglions spinaux expriment divers types de canaux ioniques et de récepteurs qui ont au moins trois fonctions: 1) Transduction (par exemple, certains récepteurs traduisant des stimuli nocifs en impulsions électriques), 2) Conduction (par exemple, les canaux de sodium et de potassium qui sont impliqués dans la propagation des potentiels d'action), et 3) Modulation de la transmission synaptique (par exemple, les canaux calciques voltage-dépendants et les récepteurs du glutamate, exprimés sur les terminaisons présynaptiques des afférences primaires dans la corne dorsale, régulant la libération de neurotransmetteurs). En outre, les canaux sodiques voltage-dépendants jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la propagation des potentiels d'action dans les neurones et d'autres cellules électriquement excitables, telles que les myocytes et les cellules endocrines [62]. Lorsque la membrane cellulaire est dépolarisée par quelques millivolts, les canaux sodiques s'activent et s'inactivent en quelques millisecondes. L'afflux d'ions de sodium, par l'intermédiaire des protéines membranaires intégrales y compris les canaux, dépolarise la membrane supplémentaire et déclenche la phase ascendante du potentiel d'action. L'inhibition de la fonction du canal de sodium réduit la capacité fonctionnelle de la communication des neurones. Cette inhibition affecte principalement deux types de canaux sodiques voltage-dépendants présents chez l'homme: le canal sodique voltage-dépendant sensible à la tétrodotoxine (les canaux TTX-S Na^+), responsable du courant de sodium qui conduit la phase de dépolarisation des potentiels d'action des neurones [63] et le canal sodique voltage-dépendant résistant à la tétrodotoxine (les canaux TTX-R Na^+) largement trouvés dans les axones de petit diamètre tels que ceux des neurones nociceptifs [63].

Dans des études antérieures, lorsque les activités insecticides de la DPT ont été étudiées, les symptômes d'intoxication ont été observés chez les blattes américaines injectées avec une dose toxique de la DPT. À des doses faibles, l'effet de la DPT a été accompagné par des

symptômes excitateurs, tandis que des symptômes paralysants et une absence de réponse ont été observés à des doses élevées, ce qui indique une neurotoxicité par le traitement à la DPT [64, 65]. Pour confirmer la neurotoxicité de la DPT, surtout que son analogue « VP-16 » présente une neurotoxicité dans les neurones hippocampiques et des effets antimitotiques, des études ultérieures ont été explorées sur les neurones du ganglion de la racine dorsale (GRD) extrait des rats Sprague-Dawley âgés de cinq semaines. Les résultats ont montré que la DPT (A partir de *Juniperus sabina* L. dans la partie nord-ouest de la Chine) a supprimé à la fois les courants de sodium voltage-dépendants TTX-S et TTX-R dans les neurones du GRD du rat de manière dose-dépendante. Cet effet réduit la sensibilité des canaux sodiques et diminue l'excitabilité membranaire [65]. Par ailleurs, les effets de la DPT sur les canaux sodiques des neurones du GRD du rat sont complètement différents de ceux d'autres insecticides tels que les pyréthroïdes, insecticides largement utilisés et également connus de pouvoir d'affecter les canaux sodiques voltage-dépendants [66]. Les autres insecticides maintiennent les canaux sodiques ouverts par hyperexcitation, alors que la DPT inhibe les canaux sodiques en les maintenant à l'état fermé. Par conséquent, le mécanisme par lequel la DPT affecte les neurones et présente une neurotoxicité, est complètement différent de celui induit par les insecticides courants.

Pour fonctionner correctement, les cellules sont totalement dépendantes de l'action du Ca^{2+} , un messager secondaire. Les cellules sont également chargées de contrôler l'homéostasie du Ca^{2+} et de garder sa concentration intérieure libre à un faible niveau approprié, toute défaillance peut conduire à ce qui a été appelé la catastrophe du calcium [67]. Dans le système nerveux, le Ca^{2+} joue un rôle important dans la régulation de plusieurs variétés de processus, y compris l'excitation, la libération des neurotransmetteurs et la régulation des gènes dans les neurones [68]. La DPT a pu déclencher et augmenter la libération du Ca^{2+} interne de manière dose-dépendante, par la mobilisation du Ca^{2+} externe après l'interaction avec des cibles intracellulaires [65].

Enfin, les effets supprimeurs de la DPT sur la cinétique des courants de sodium en termes d'excitabilité des neurones de la GRD peuvent fortement contribuer à ses activités antitumorales et anti-inflammatoires. En outre, la DPT a augmenté les concentrations intracellulaires du Ca^{2+} dans les neurones de la DRG, ce qui peut conduire à la cytotoxicité neuronale.

2.2.4. Autres effets pharmacologiques de la DPT

Il a été démontré que la DPT possède une activité antiallergique [69]. Après avoir été administré par voie intrapéritonéale (1,0 à 10 mg/kg) et par voie intraveineuse (0,25 à 1,0 mg/kg) à des rats, la DPT a montré une inhibition dose-dépendante de la réaction de l'anaphylaxie cutanée passive (ACP) induite par l'anticorps anti-dinitrophényle (DNP), une immunoglobuline E (IgE). De plus, l'activité de l'inhibition de l'ACP induite par la DPT est plus puissante que celle de la prednisolone et de l'indométacine, deux médicaments couramment utilisés comme témoins positifs.

En plus d'être un précurseur efficace de la podophyllotoxine antitumorale, la DPT elle-même a un effet potentiel sur les tumeurs. La DPT possède des activités antiprolifératives [32], antitumorales [70] et antivirales remarquables [31] (**Figure 3**). Il a été précédemment rapporté que la DPT présente une activité antiagrégante plaquettaire [28] et un effet anti-inflammatoire par inhibition de l'activité de la cyclooxygénase (COX)-2 sélective / 5-lipoxygénase (LOX) [30] (**Figure 3**). Cette molécule possède également une activité insecticide [71]. Par ailleurs, la DPT est un inhibiteur puissant de l'expression de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) dans les lignées des macrophages murins stimulés par un lipopolysaccharide bactérien (LPS), Raw 264.7 [26], la DPT inhibe la production de monoxyde d'azote (NO) induite par le LPS dans les cellules Raw 264.7 via la modulation de l'expression de l'iNOS. Enfin, la DPT est largement utilisée dans le traitement de l'hyperpigmentation provoquée par un rayonnement ultraviolet UV ou par les pigments [36]. Basé sur les propriétés pharmacologiques de la DPT, les investigations cliniques sont nécessaires pour mieux comprendre les potentiels thérapeutiques de cet agent actif émergent.

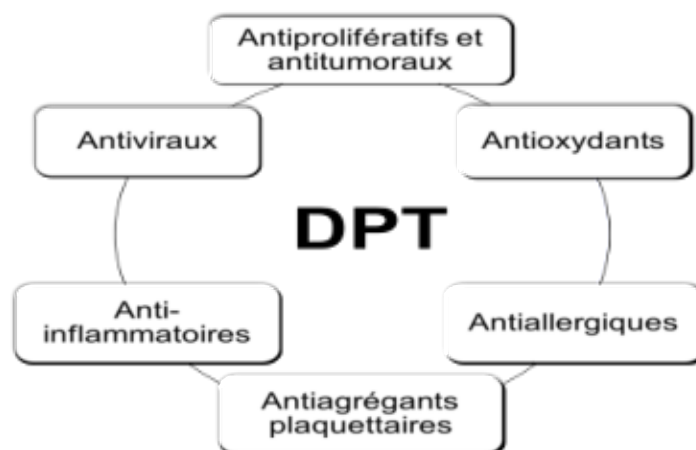


Figure 3. Effets pharmacologiques de la DPT [19].

2.3. La DPT, un précurseur de la biosynthèse des lignanes de haute valeur

Traditionnellement, la podophyllotoxine a servi de précurseur pour la production de médicaments antitumoraux hautement efficaces tels que le VP-16 et le téniposide, qui ont été largement utilisés dans le traitement du cancer et des verrues vénériennes. La synthèse complète de la podophyllotoxine est difficile en raison de la présence de quatre centres chiraux, d'un trans- γ -lactone rigide et d'un 7'-aryl substituant axial [20]. De plus, les plantes sources de podophyllotoxine sont rares et leur récolte ne suffit pas aux besoins de synthèse du VP-16 et de semi-synthèse de nouveaux dérivés. Cela semble devenir un goulot d'étranglement majeur car les espèces *Podophyllum* ont été inscrites sur la liste des espèces menacées. Pour ces raisons et d'autres, d'autres sources de podophyllotoxine et de nouvelles approches pour la synthèse sont nécessaires. Les chercheurs visent à explorer de nouvelles sources de podophyllotoxine, y compris la culture, la culture *in vitro* de cellules et de tissus végétaux et la synthèse chimique. La biosynthèse semble être une option prometteuse et peut aider à développer de nouvelles sources et à fournir une production durable de podophyllotoxine d'une façon économique. En effet, la compréhension de la biosynthèse de la podophyllotoxine est l'une des étapes de base nécessaires pour la culture classique des plantes médicinales et de l'ingénierie de métabolite. La DPT semble être le matériau de départ approprié pour accomplir cette biosynthèse.

2.4. Solubilité de la DPT dans l'eau et validation de son activité *in vivo*

Depuis plus de dix ans, les investigations de l'activité de la DPT ont été basées uniquement sur des expériences *in vitro* qui ont révélé ses effets antitumoraux et anti-inflammatoires puissants. Malheureusement, les études *in vivo* sur cette molécule ont été entravées par sa solubilité dans l'eau, ce qui a rendu la préparation de l'injection intraveineuse impossible [19]. La podophyllotoxine peut être utilisée pour préparer des dérivés glycosidiques en agissant sur le groupe hydroxyle en position 4 conduisant à la synthèse du VP-16 et du téniposide qui sont appliqués avec succès en clinique. Toutefois, l'absence d'un groupe hydroxyle en position 4 sur la DPT a empêché la synthèse des dérivés glycosidiques et a ainsi limité son utilisation clinique [19]. Aujourd'hui, les efforts sont concentrés, d'une part, sur une façon d'utiliser la DPT pour la préparation des injections souhaitées et, d'autre part, sur la validation de son activité anticancéreuse *in vivo* chez les animaux et donc son application dans les pratiques cliniques [19].

Récemment, en Chine, les chercheurs ont réussi à préparer un complexe d'inclusion de la DPT avec des dérivés de la β -cyclodextrine (β -CD), le sulfobutyl éther- β -cyclodextrine (SBE- β -CD) et 2-hydroxylpropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD) [19, 72]. Le SBE- β -CD (Captisol) et le HP- β -CD sont des dérivés polyanioniques utilisés en complexe avec divers médicaments pour faciliter leur solubilité et leur stabilité chimique après administration parentérale. Approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), ces dérivés sont bien tolérés chez l'homme et dénuées d'effets indésirables [73, 74]. Le complexe d'inclusion fait de SBE- β -CD et de la DPT a augmenté la solubilité de la DPT dans l'eau de 0,5 mg/L (forme insoluble) à 5g/L (forme relativement soluble). Ce complexe d'inclusion solide a été testé dans les expériences *in vitro* et *in vivo*, et les résultats ont révélé que ce complexe présente une activité antitumorale significative sur diverses lignées de cellules cancéreuses [72].

In vitro, le complexe d'inclusion a démontré un effet inhibiteur significatif de la DPT sur plusieurs types de cellules tumorales. De plus, l'effet observé est plus important que celui du VP-16 (témoin positif). L'effet inhibiteur de la DPT pouvait enfin être testé *in vivo*. L'essai a été effectué par injection intraveineuse via la veine caudale sur des souris transplantées par les tumeurs S180 (sarcome murin) et HEPS (carcinome hépatocellulaire murin). Ainsi, après la dissolution du complexe d'inclusion de SBE- β -CD et de la DPT dans le sérum physiologique, les données ont indiqué des effets antitumoraux significatifs du complexe d'inclusion avec des taux d'inhibition de la tumeur d'environ 50% pour les deux types de cellules tumorales. Dans les xénogreffes S180, les taux d'inhibition étaient 54,53% et 41,67% après administration d'une dose de 10 et 5 mg/kg de DPT, successivement. Quant aux xénogreffes HepS, les taux d'inhibition de la tumeur étaient de 52,09% et 42,27% après l'administration des mêmes doses, respectivement. Lorsque le complexe d'inclusion SBE- β -CD et DPT est dissout dans de l'eau puis testé sur la croissance d'une xénogreffe de cellules de la lignée humaine de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) H460 par injection intraveineuse via la veine caudale dans des souris Nudes H460, les résultats ont montré que le taux de croissance tumorale a été 49,68%, tandis que le taux d'inhibition de la tumeur a été 43,08% après l'administration de 8 mg/kg de DPT. En outre, les effets inhibiteurs observés étaient significatifs et semblables à ceux des témoins positifs, le cyclophosphamide (20 mg/kg) et le VP-16 (20 mg/kg). De plus, les groupes de dosage de la DPT n'ont aucun effet inhibiteur significatif sur le poids corporel des animaux. Cependant, le poids corporel des animaux du groupe VP-16 est inhibé de manière significative, ce qui indique que la toxicité de la DPT est inférieure à celle du VP-16 [72].

De même, Le complexe d'inclusion solide de DPT et de β -CD a augmenté la solubilité de la DPT et a été testé *in vitro* et *in vivo*. Les résultats ont révélé que ce complexe présentait une activité antitumorale significative contre diverses lignées de cellules cancéreuses humaines telles que le cancer du poumon à petites cellules (CPPC), la leucémie, le cancer du col de l'utérus et le cancer gastrique [19].

3. VP-16 et docétaxel

La classe des podophyllotoxines comprend également certains agents cytostatiques tels que le VP-16 et le téniposide, agents semi-synthétiques de la podophyllotoxine, utilisés pour traiter des cancers multiples [19]. Le VP-16 (**Figure 4A**), inhibiteur de la topoisomérase II, est un médicament alcaloïde cytotoxique qui se lie et inhibe la fonction de la topoisomérase II et arrête le cycle cellulaire aux phases finales S et G2 [75]. Le VP-16 est efficace dans le traitement de plusieurs tumeurs, y compris le cancer du sein métastatique [76].

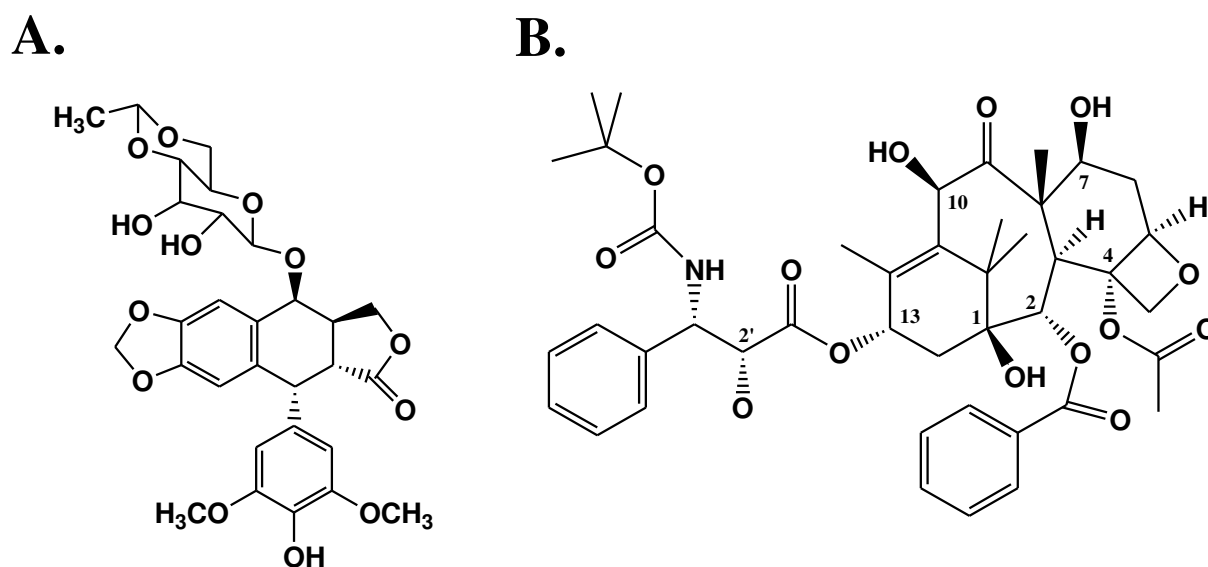


Figure 4. Structures chimiques du VP-16 (A) et du docétaxel (B) [77].

D'autre part, le docétaxel (**Figure 4B**), taxane semi-synthétique, est un composé cytotoxique actif avec un effet antitumoral puissant contre le cancer du sein [78, 79]. Il favorise la polymérisation de la tubuline et la stabilisation des microtubules en empêchant leur désassemblage [80]. Bien que ce médicament de chimiothérapie réduit le risque de récurrence du cancer et améliore le pronostic vital, il est associé à de nombreuses toxicités liées au

médicament et qui sont dues, en partie, aux doses élevées utilisées pour obtenir l'effet antitumoral souhaité [81]. Par conséquent, des doses et des taux de séquestration plus faibles dans les organes sains devraient améliorer l'efficacité des traitements et minimiser les effets indésirables.

4. *Dysosma versipellis*

Dysosma (Berberidaceae) est une famille endémique en Chine qui se compose de sept espèces vivaces, rares et vulnérables [82]. *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying est considérée comme l'une de ces espèces médicinales chinoises les plus importantes, endémique au sud de la Chine [83]. *Dysosma versipellis* (*D.versipellis*) est cultivée dans le sous-bois à feuillage persistant mixte et les forêts de feuillus de la Chine. Au cours des dernières années, les populations naturelles de cette espèce ont considérablement diminué en raison des activités anthropiques. Aussi, la détérioration ou la perte d'habitat et la surexploitation ont gravement affecté la conservation *in situ* de la plante et ont exposé cette dernière à un risque plus élevé d'extinction, ce qui nécessite une protection immédiate, la conservation *ex situ* et la culture commerciale [84, 85].

Dans les dernières décennies *D. versipellis* a suscité l'intérêt de l'industrie pharmaceutique en raison de la présence de la podophyllotoxine, le lignane leader de la synthèse des médicaments antitumoraux les plus importants [20, 86].

4.1. Rhizome de *D.versipellis*

Le rhizome de *D.versipellis*, nommé Rhizomadiphyllieiae, Diphyllieiasinensis Li, a été enregistré la première fois dans «Classique Herbale de Shennong» après le genre *Podophyllum*. Il pousse principalement dans les régions de la province du Zhejiang, la province du Jiangxi et de la province du Hubei [87].

4.1.1. Composés chimiques actifs

Les investigations phytochimiques antérieures ont montré que les lignanes, les flavonoïdes et les acides aminés sont les constituants majeurs de *D.versipellis* [88, 89]. Huit composés, la podophyllotoxine, la DPT, la 4'-déméthyl-désoxypodophyllotoxine, la 4'-déméthylpodophyllotoxine, la diphylline, le kaempférol, la quercétine et le bêta-sitostérol ont été isolés à partir du rhizome de *D.versipellis* [90] avec sept autres composés récemment

caractérisés [91]. Étant donné que les constituants chimiques des espèces *Dyosma* sont compliqués, et le principal constituant podophyllotoxine est cytotoxique, ils pourraient se révéler extrêmement dangereux en cas de surdosage [92].

4.1.2. Effets biologiques

4.1.2.1. Effets thérapeutiques

Dans certains remèdes populaires, en raison de son activité biologique, cette plante a longtemps été utilisée pour tuer les parasites et pour traiter les morsures de serpent, l'encéphalite épidémique B et la parotidite [93]. Des études ont montré que les constituants et les extraits de cette plante traditionnelle chinoise ont des activités inhibitrices de croissance sur diverses tumeurs *in vivo* ou *in vitro* [88, 90, 94].

Le rhizome de *D.versipellis* (**Figure 5**) est fréquemment utilisé individuellement par application externe pour traiter les fractures, la polyarthrite rhumatoïde et le lumbago mais il ne convient pas à l'usage par voie orale [92].



Figure 5. Rhizome *Dyosma versipellis* (racine), à Shennong jia [92].

4.1.2.2. Effets toxiques

Vu que la toxicité du rhizome de *D.versipellis* n'a pas été encore bien étudiée, on ignore toujours sa dose fatale, ses effets toxiques ainsi que ses effets secondaires, par conséquent, il est encore largement utilisé dans les vins médicinaux. Lorsqu'il est mal pris, une intoxication peut se manifester suite à un surdosage.

4.1.2.2.1. Effets sur la peau

Le rhizome de *D.versipellis* peut induire une dermatite de contact en raison de l'acrimonie, la mort peut survenir si une grande quantité est impliquée. Song et al. [95] et Gong et al. [96] ont rapporté que les patients qui appliquent la podophyllotoxine (constituant majeur du rhizome de *D.versipellis*) pour guérir un condylome sévère (*acuminata condylomes*) sont morts empoisonnés.

4.1.2.2.2. Effets sur le système nerveux central

Le rhizome de *D.versipellis* induit une excitation suivie par un effet inhibiteur sur le système nerveux central (SNC). Les dommages cérébraux se produisent en particulier dans le cortex cérébral, les ganglions de la base et la moelle épinière [92]. Jin et Yuan ont rapporté un cas d'encéphalopathie toxique causé par une consommation, par erreur, d'un vin médicinal contenant le rhizome de *Dysosma* [97]. La raison est que la podophyllotoxine est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) en raison de sa forte liposolubilité.

4.1.2.2.3. Effets sur le système digestif

Le rhizome de *D.versipellis* peut provoquer des symptômes gastro-intestinaux sévères au cours de la phase précoce de l'intoxication. Le péristaltisme du tractus gastro-intestinal est fortement stimulé et la fonction d'absorption est dérégulée. Les symptômes cliniques observés sont les nausées, les vomissements, les maux d'estomac et la diarrhée [98, 99].

4.1.2.2.4. Effets sur le système cardiovasculaire

Les muscles cardiaques peuvent être gravement endommagés par le rhizome de *D.versipellis* et conduire à une myocardite toxique. Les symptômes cliniques incluent des palpitations, une douleur thoracique, une tachycardie et une élévation des enzymes cardiaques. Chen a rapporté un cas de décès par fibrillation auriculaire et coagulopathie impliquant l'intoxication par le rhizome de *D.versipellis* [100]. Les présentations cliniques du défunt étaient clairement liées à la toxicité cardiaque, dont une fibrillation auriculaire rapide, une insuffisance cardiaque aiguë gauche suivies d'un arrêt cardiaque. De plus, un engagement cérébral et une hyperkaliémie ont été responsables de ces signes et symptômes [100].

4.1.2.2.5. Cytotoxicité

Le mécanisme toxique principal de la podophyllotoxine est la cytotoxicité: (1) La podophyllotoxine inhibe la polymérisation des microtubules cellulaires, ce qui peut avoir une incidence sur l'ensemble des microtubules. Cela peut conduire à la cessation de la division cellulaire à la métaphase et l'arrêt de la mitose. (2) La podophyllotoxine, qui est un agent toxique spécifique du cycle cellulaire, inhibe l'activité de la topoisomérase II à la phase G2 et la phase S du cycle cellulaire. Ce qui crée une molécule « ADN- Topoisomérase II » stable et induit la rupture du double brin ou du simple brin de la molécule d'ADN, qui à la fin conduit à une recombinaison illégitime de l'ADN. (3) Elle inhibe l'absorption cellulaire des bases tels que la thymine, l'uracile, l'adénine et la guanine, et par conséquent, elle inhibe la synthèse de l'ADN, de l'acide ribonucléique (ARN) et des protéines [41, 101, 102].

Dans notre expérience, la DPT est le produit d'un processus semi-synthétique utilisant la podophyllotoxine (extrait de *Dyosma versipellis* (Hance) M. Cheng) comme matériau de départ. L'inclusion faite de DPT et de HP- β -CD n'a pas montré de signes de toxicité notable chez les animaux, ces derniers étaient même inférieurs à ceux du VP-16 [72].

SECTION II

RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE ET DE L'APOPTOSE

1. Cycle cellulaire des cellules eucaryotes : mitose et régulation

1.1. La mitose

La mitose est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent [103]. La période de la vie de la cellule mère qui s'écoule jusqu'à ce qu'elle donne deux cellules filles s'appelle le cycle cellulaire.

La mitose est un mécanisme extrêmement complexe qui est régulé par un grand nombre de protéines intervenant très transitoirement et dans un ordre défini, permettant ainsi la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire. Toute anomalie de régulation de ce processus peut être à l'origine de développement tumoral. La cellule défectueuse devient alors cancéreuse puis, par métastase, migre et se propage dans tout l'organisme, entraînant des conséquences dramatiques pour tout l'organisme. D'où l'intérêt d'étudier les régulateurs du cycle cellulaire dont les anomalies sont souvent à l'origine des cancers [104]. De plus, une bonne compréhension de ces mécanismes régulateurs permettrait la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

1.1.1. Les phases du cycle cellulaire

Les étapes du cycle cellulaire sont définies par deux événements majeurs : l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules-filles [105, 106]. Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites en quiescence ou phase G₀.

Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules entament la division qui peut être répartie en quatre phases : G₁ (Gap 1 : gap = pause), S (Synthèse), G₂ (Gap 2) et M (mitose) (**Figure 6**) [107].

Au cours de la phase G₁, les cellules passent par un point de restriction, point de non-retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé et l'entrée en division ne dépend plus de la présence des facteurs mitogènes. La phase G₁ est préparatrice à la phase S au cours de laquelle l'ADN est répliqué. La phase G₂ précède la phase M, ou mitose (proprement dite), au cours de laquelle les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules filles, grâce au fuseau de division. Cette phase M peut être découpée en cinq périodes: la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La cytokinèse (ou cytotérièse)

achève la division de la cellule. Lorsque les cellules cessent toute prolifération, sous l'effet de signaux antimitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire et retournent en phase de quiescence. Les quatre phases s'enchaînent de façon coordonnées, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. De nombreux mécanismes de contrôle (checkpoints) assurent un « contrôle qualité » à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie est détectée (endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique, ...) (**Figure 6**) [107-109].

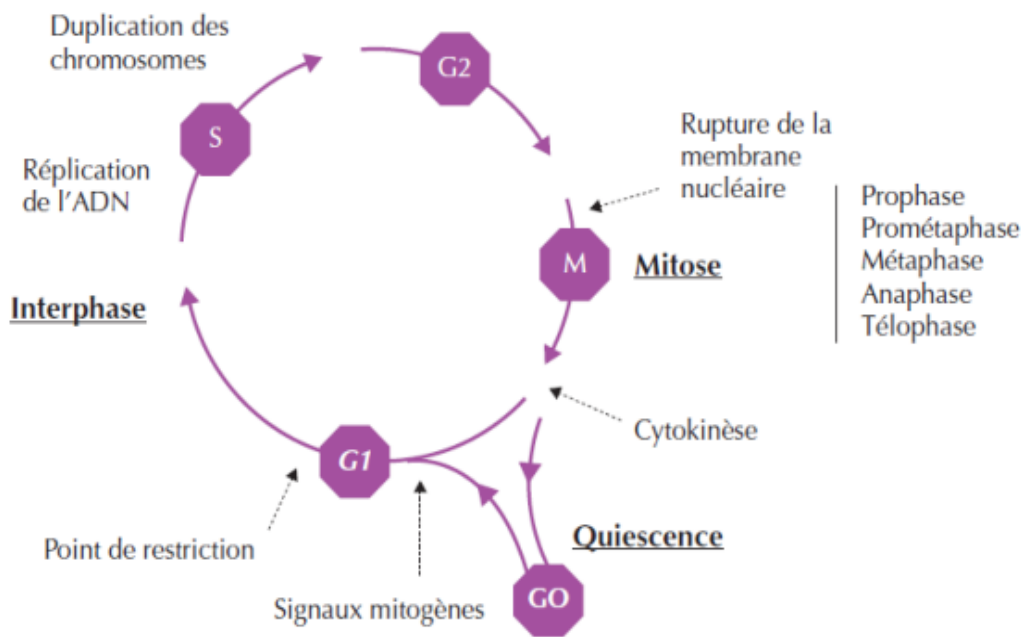


Figure 6. Phases et événements majeurs du cycle cellulaire [107].

1.2. Régulation du cycle cellulaire

1.2.1. La phosphorylation des protéines

La phosphorylation réversible des protéines par les protéines kinases a été découverte dans les années 1950 par Edwin G. Krebs et Edmond H. Fischer récompensés en 1992 par le prix Nobel de médecine [110]. Elle consiste en l'estérification de la chaîne latérale de la sérine, de la thréonine ou de la tyrosine (chez les eucaryotes), par addition d'un ou plusieurs groupements phosphates. Cette modification post-traductionnelle intervient dans un très grand nombre de processus cellulaires fondamentaux et variés (du métabolisme à l'apoptose) par le biais de cascades de signalisation. Elle induit des modifications fonctionnelles de la protéine

cible : amplification ou l'inhibition d'une activité enzymatique, changement de localisation intracellulaire ou changement de structure permettant l'association avec d'autres protéines.

1.2.2. Kinases cycline-dépendantes

Les kinases cycline-dépendantes (CDK pour cyclin-dependent kinases) sont à l'origine de phosphorylation permettant l'activation de protéines régulatrices de la division cellulaire. La recherche d'inhibiteurs de ces protéines kinases est en plein essor avec des bénéfices thérapeutiques attendus dans de très nombreux domaines et en particulier en oncologie [13]. Ainsi, la progression dans le cycle est sous la dépendance des CDK et de leur régulation par les cyclines. Les isoformes de la cycline D (D1-3) lient CDK2, 4, 6 et conduisent la progression en G1. Puis le complexe CDK2-cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par le complexe CDK2-cycline A qui assure le contrôle de la phase S. Le complexe CDK1-cycline A intervient en G2, et le complexe CDK1-cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (**Figure 7**).

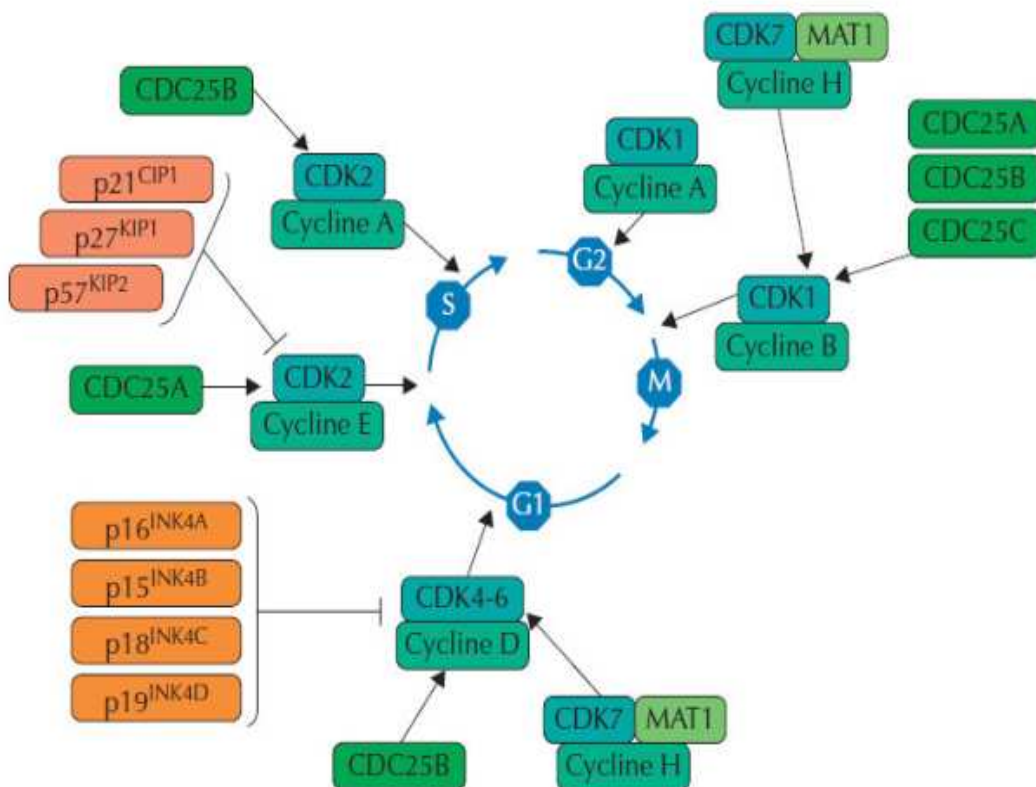


Figure 7. Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire [107].

Au moins quatre niveaux de régulation contribuent à l'activité transitoire de ces CDKs:

– **L'assemblage transitoire des complexes CDK-cyclines, lié à une durée de vie des cyclines généralement courte, la protéolyse jouant un rôle prépondérant dans le contrôle du cycle cellulaire.** Une trop grande affinité du complexe CDK-cycline peut déstabiliser le cycle. Par exemple, parmi les autres acteurs de la phase G1, la cycline E est un composé de 50 kilodaltons (kDa) hyperexprimée dans 25 % des cancers du sein. L'élastase de cellules tumorales de plusieurs types de cancer (sein, ovaire, gastrique, colorectal ou mélanome) est capable de cliver la cycline E en isoformes de « bas poids moléculaire » de 33 et 44 kDa. L'hyper-expression de la cycline E et la formation post-traductionnelle des isoformes de bas poids moléculaire dans le cancer du sein est associée à un phénotype agressif de la maladie au pronostic défavorable, tant en survie sans progression qu'en survie globale et indépendamment du statut ganglionnaire ou hormonal de ces tumeurs [111]. La transfection de ces isoformes « bas poids moléculaires » dans des lignées de cellules épithéliales mammaires aboutit à la perte du contrôle du cycle cellulaire et induit des clones tumoraux. Des analyses de liaison montrent que les isoformes tronqués de la cycline E ont une plus grande affinité pour CDK 2 que la cycline E « entière » [112]. L'indole-3-carbinol (I3C), composé actif issu d'un glucosinolate (renfermé dans le chou-rave et d'autres crucifères comme le brocoli, les choux et les choux de Bruxelles) induit un arrêt du cycle en G1 et induit l'apoptose dans plusieurs types de tumeurs (sein, prostate, endomètre, colon, leucémie) [113]. Des études *in vitro* montrent que l'I3C empêche le clivage de la cycline E en inhibant de façon non compétitive l'élastase neutrophile humaine [114] (**Figure 8**);

– **Des modifications post-traductionnelles**, de type phosphorylations et déphosphorylations, conduisant à l'activation ou à l'inactivation des CDK. Les deux mécanismes peuvent coexister sur le même complexe CDK-cycline pour activer l'entrée en mitose. Ainsi, plusieurs mécanismes conduisent à l'activation de CDK1-cycline B lorsque la cellule est prête à entrer en phase M : d'une part, les phosphorylations inhibitrices des résidus thréonine 14 (Thr14) et tyrosine 15 (Tyr15) situés au bord de la poche de fixation de l'ATP sont levées par les phosphatases cdc25 a, b ou c. D'autre part, la phosphorylation activatrice du résidu Thr161 de CDK1 est réalisée par le complexe CDK7-cycline H-Mat 1, aussi appelé CAK pour CDK activating kinase [115] ;

– **Une association transitoire avec des inhibiteurs protéiques**, dont il existe deux familles. La famille INK4, comprenant p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D} interfèrent avec les

monomères de CDK 4 ou 6 et empêchent la fixation de la cycline de type D bloquant la progression en G1. La famille kinase inhibitor protein (KIP), comprenant $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ et $p57^{KIP2}$ fixent les complexes CDK-cyclines et les inactivent [116]. Pour exemple, $p21^{CIP1}$ et $p27^{KIP1}$ en fixant le complexe CDK 4-cycline D pourrait être nécessaire à son assemblage et sa translocation dans le noyau sans en inhiber l'activité kinase. Ces deux protéines sont, par ailleurs, des inhibiteurs du complexe CDK 2-cycline E. Ainsi, l'apparition de $p21^{CIP1}$ et $p27^{KIP1}$ permet donc la formation des complexes CDK 4-cyclines D, tout en retardant l'activation des complexes CDK 2-cycline E. En fin de G1, la phosphorylation de $p27^{KIP1}$ par CDK 2-cycline E conduit à son ubiquitinylation par Skp1/Skp2 et à sa destruction par le protéasome [117]. Cette élimination de $p27^{KIP1}$ contribue à l'entrée en phase S ;

– **Des changements de localisation intracellulaire** qui est en général également régulée par des phosphorylations et des déphosphorylations.

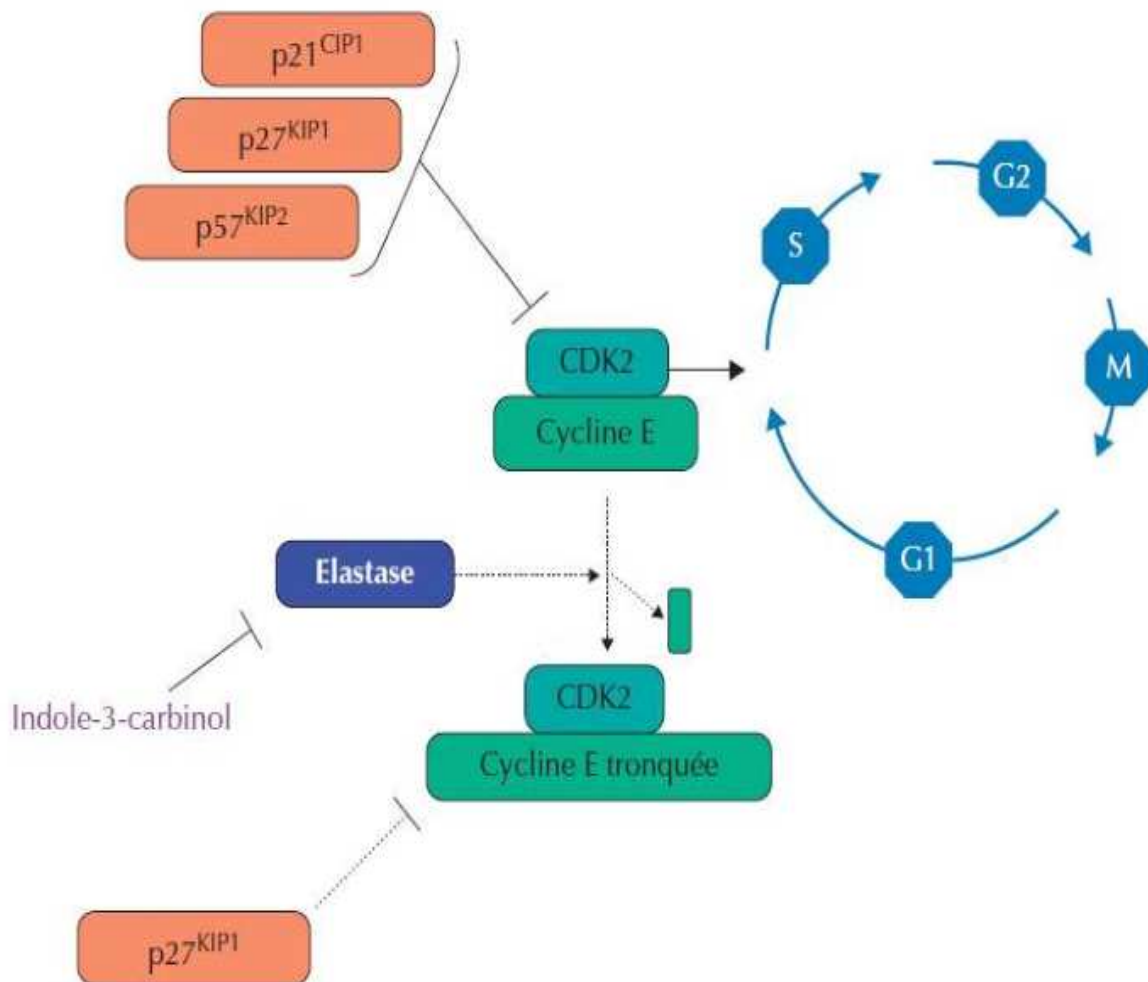


Figure 8. Potentiel anti-mitogène de l'I3C [107].

1.2.3. Inhibiteurs des protéines kinases

Un grand nombre de pathologies humaines sont la conséquence d'une rupture de l'équilibre entre kinases et phosphatases. Concernant le cycle cellulaire et les CDK, la recherche d'inhibiteurs couvre un champ thérapeutique large (de la pathologie cancéreuse à la neurologie, mais également la virologie ou les pathologies rénales [17], expliquant l'intérêt grandissant des laboratoires pour la découverte, l'optimisation et l'évaluation thérapeutique de petites molécules inhibitrices des protéines kinases (PKI) [118]. Actuellement plus d'une centaine d'inhibiteurs de kinases sont en évaluation à des degrés divers de développement (Figure 9).

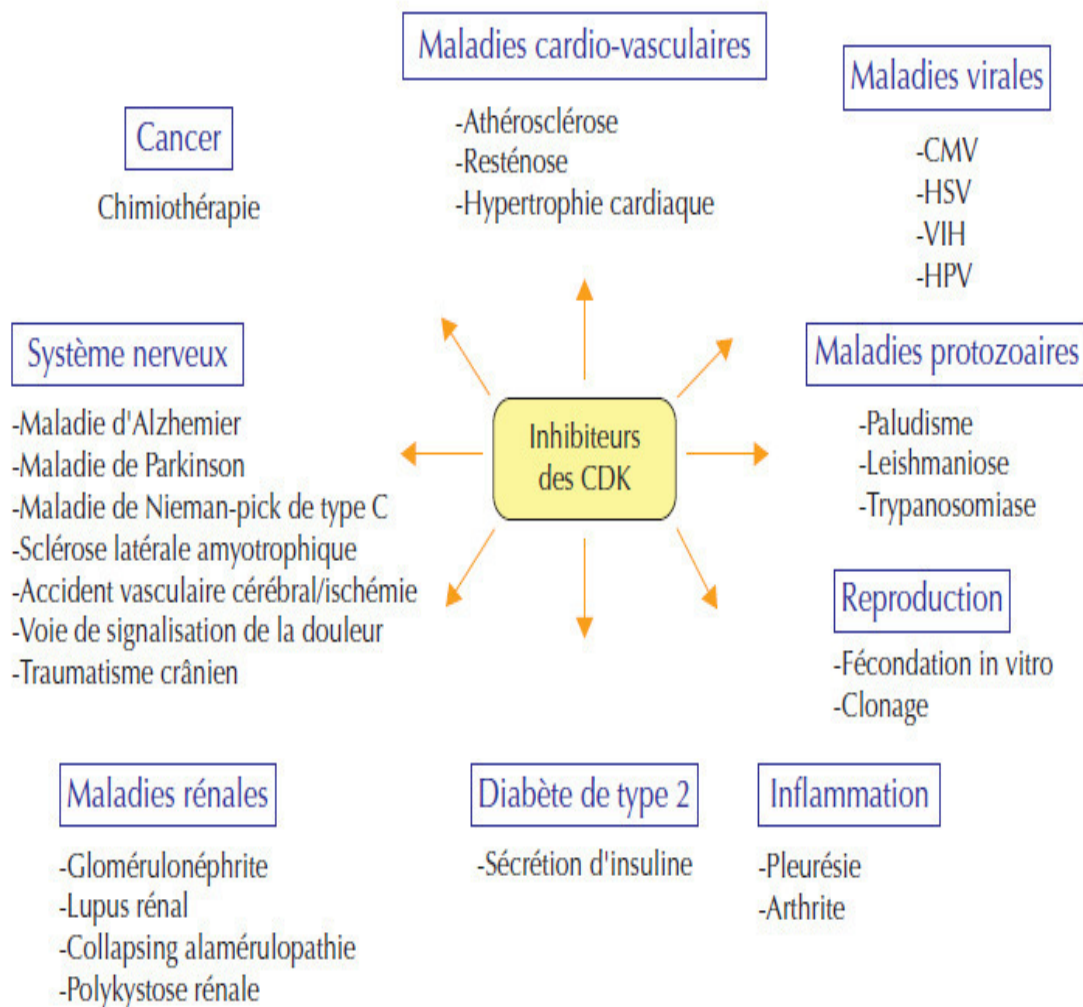


Figure 9. Intérêts thérapeutiques potentiels des inhibiteurs des CDKs [107].

Le site catalytique d'une kinase constitue la cible principale [118]. Ces molécules ont en commun : un faible poids moléculaire, un hétérocycle hydrophobe plan, un mécanisme d'action compétitif avec l'ATP au niveau de sa poche de liaison et une interaction avec la kinase par liaisons hydrophobes et ponts hydrogènes.

Certains inhibiteurs de CDK sont approuvés par la FDA et commercialisés, mais certains sont encore dans les phases de développement clinique I et II. Les inhibiteurs peuvent être classés en fonction de leur profil d'inhibition des CDK et du kinome en général :

- Les « cdk pan-inhibiteurs » comme le flavopiridol (ciblant CDK1, 2, 4,6) ;
- Les inhibiteurs plus spécifiques : la roscovitine inhibant CDK1, 2 ou le PD 0332991 (Palbociclib) inhibant CDK4, 6 [119]; ce dernier fut très récemment approuvé pour le traitement du cancer du sein métastatique [120, 121].
- Les inhibiteurs de CDK mais aussi d'autres récepteurs: par exemple, le ZK 304709 co-inhibant VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) et PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptor*) [122].

Les modèles animaux de souris knock-out (KO) mettent l'accent sur les rôles multiples des CDK, malmenant parfois le concept du rôle unique et séquentiel des CDK dans le cycle cellulaire : les souris mutées sur CDK2 sont viables [123] suggérant une activité compensatrice des kinases de l'interphase (CDK2, 4, 6). À l'inverse, les délétions de CDK1 dans les cellules germinales de souris entraînent une létalité embryonnaire précoce [124].

De plus, il existerait une sensibilité tissulaire différente à l'inhibition des CDKs [125]. Par ailleurs, si les PKI induisent l'apoptose dans les cellules en division, ils protègent les cellules normales de l'apoptose quand elles sont exposées à certains cytotoxiques. Grâce à cet effet différentiel, les PKI ont été utilisés pour la protection des cellules normales des effets indésirables des agents cytotoxiques « classiques », comme par exemple dans la prévention de l'alopécie [126] ou pour la prévention de la néphrotoxicité du cisplatine par la roscovitine [127]. Ainsi, les études précliniques fondées sur des concepts purement génétiques de gène KO ou knock-in sont à interpréter prudemment.

1.2.4. Stratégie d'utilisation des PKI : perspectives en oncologie

Le rationnel d'utilisation des PKI repose une augmentation d'activité des CDK dans la cellule cancéreuse en rapport avec la surexpression de cycline ou la fréquente inactivation des

inhibiteurs de CDK [46]. Plusieurs études préclinique montrent une synergie des PKI combinées aux drogues cytotoxiques « classiques » (cisplatine, 5 fluoro-uracile « 5FU », doxorubicine, paclitaxel) et en particulier quand ils sont utilisés avant les PKI [128], ouvrant un large champ d'investigation concernant la chronothérapie de ces molécules. En effet les PKI pourraient être plus efficaces sur des cellules « synchronisées » ou bloquées à certains moment du cycle. Ainsi, et très récemment, les inhibiteurs de CDK4/6 ont constitué de nouvelles thérapies orales approuvées par la FDA dans le cancer du sein métastatique [120, 121].

2. Microtubules et agents anti-microtubules

2.1. Dynamique des microtubules et formation du fuseau mitotique

2.1.1. Structure

Les microtubules sont des cylindres creux d'environ 24 nanomètres (nm) de diamètre et plusieurs micromètres de long [129], résultant de l'assemblage non covalents d'hétérodimères de tubuline « l'élément structurel de base », constitués de deux sous-unités α et β présentant 40 à 50 % d'homologie (**Figure 10**) [130, 131]. Six gènes codent pour la tubuline α et sept pour la tubuline β . Il s'agit donc d'une protéine hétérodimérique globulaire de 110 kDa. A côté des sous-unités α et β , d'autres sous-unités de la tubuline ont été découvertes. Parmi elles, on trouve la tubuline γ découverte en 1989 par Oakley et qui présente environ 30% d'homologie avec les deux tubulines précédentes [132]. Elle joue un rôle important dans la nucléation, permettant la croissance des microtubules [133]. D'autres tubulines ont aussi été identifiées comme les tubulines δ , ϵ , ζ et η mais elles ne sont pas présentes chez tous les organismes eucaryotes [134].

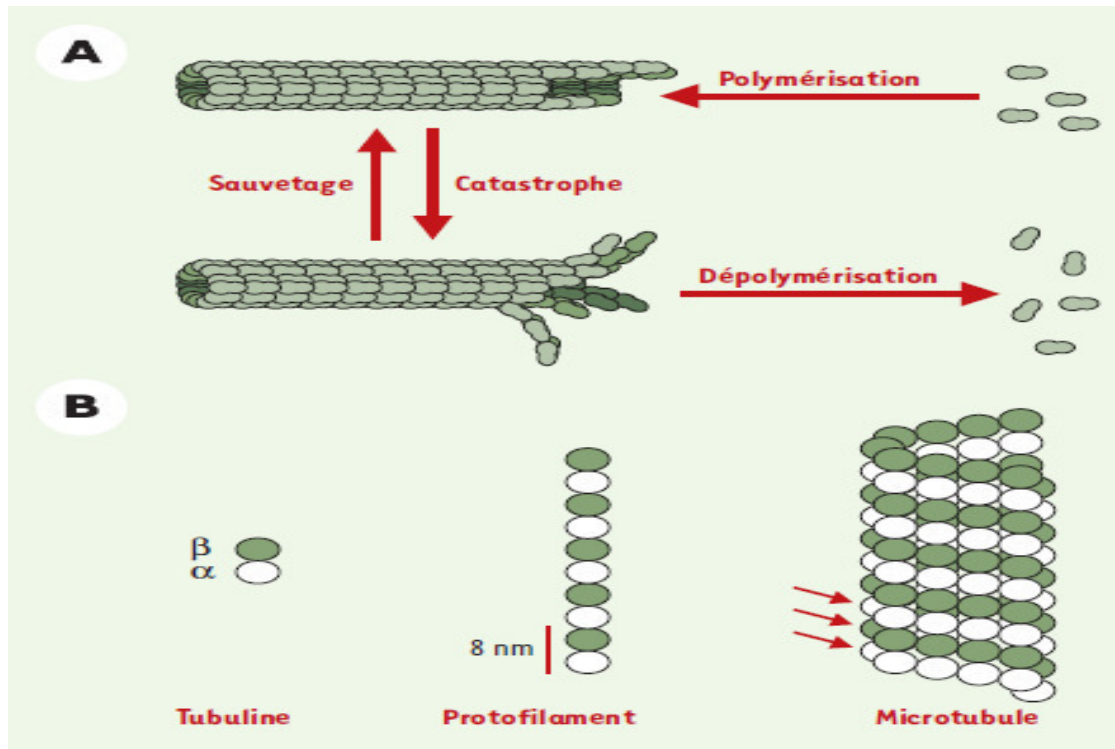


Figure 10. Dynamique des microtubules [135].

2.1.2. Propriétés dynamiques et régulation

Les microtubules sont, avec les chromosomes, les constituants de base du fuseau mitotique. Ils sont essentiels à la division cellulaire au cours de laquelle ils forment une structure bipolaire, complexe et dynamique, nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes pendant la mitose : le fuseau mitotique (**Figure 11**). Ce sont des polymères dynamiques de tubuline qui oscillent constamment entre des cycles de polymérisation et de dépolymérisation (**Figure 10**) [136]. La transition entre polymérisation et dépolymérisation est appelée « catastrophe », la transition inverse est le « sauvetage ». Cette propriété de polymérisation hors équilibre, baptisée instabilité dynamique (**Figure 10**) [137, 138], est décrite par quatre paramètres : les vitesses de croissance et de décroissance et les fréquences de « catastrophe » et de « sauvetage ». Ce processus permet de moduler l'organisation spatiale des microtubules dans la cellule, par exemple lors de la croissance cellulaire, de la polarisation de la cellule ou encore de la formation du fuseau mitotique.

Ces hétérodimères sont arrangés en protofilaments parallèles, tous orientés dans la même direction, conférant au microtubule sa polarité.

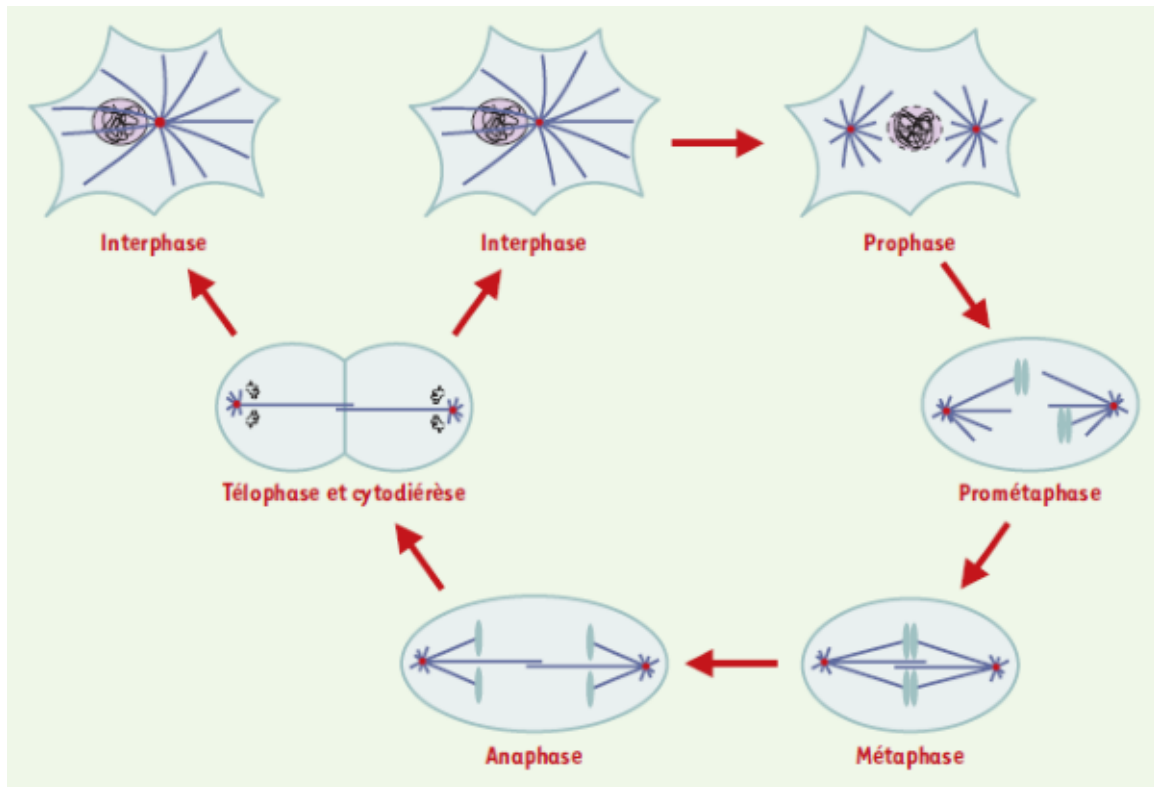


Figure 11. Représentation schématique des différentes étapes du cycle cellulaire dans une cellule somatique [135].

Ainsi, dans les cellules animales, les extrémités « négatives », peu dynamiques, sont ancrées au niveau d'un centre nucléateur et organisateur des microtubules, le centrosome, tandis que les extrémités « positives » participent très activement à la dynamique spatiale de polymérisation / dépolymérisation (**Figure 12**).

Au cours de la polymérisation de la tubuline en microtubules, l'une des deux molécules de guanosine triphosphate (GTP) associée au dimère de tubuline est hydrolysée [139]. L'énergie provenant de cette hydrolyse n'est pas nécessaire à la polymérisation de la tubuline mais à la capacité des microtubules de se dépolymériser [140]. L'un des modèles actuels pour expliquer l'instabilité dynamique est celui de la coiffe de GTP, fondé sur deux états conformationnels de la tubuline : (1) un état guanosine diphosphate (GDP) instable constituant l'essentiel de la paroi du microtubule ; (2) un état GTP stable coiffant l'extrémité du microtubule et permettant la polymérisation par ajout de nouvelles sous-unités de tubuline [136]. C'est la perte aléatoire de cette coiffe GTP qui entraînerait les catastrophes. Plus récemment, des résultats obtenus par microscopie électronique ont montré que la régulation de la dynamique des microtubules implique des changements structuraux à leurs extrémités [140].

Ces résultats ont conduit à un modèle expliquant l'instabilité dynamique grâce aux propriétés élastiques des microtubules (**Figure 12**).

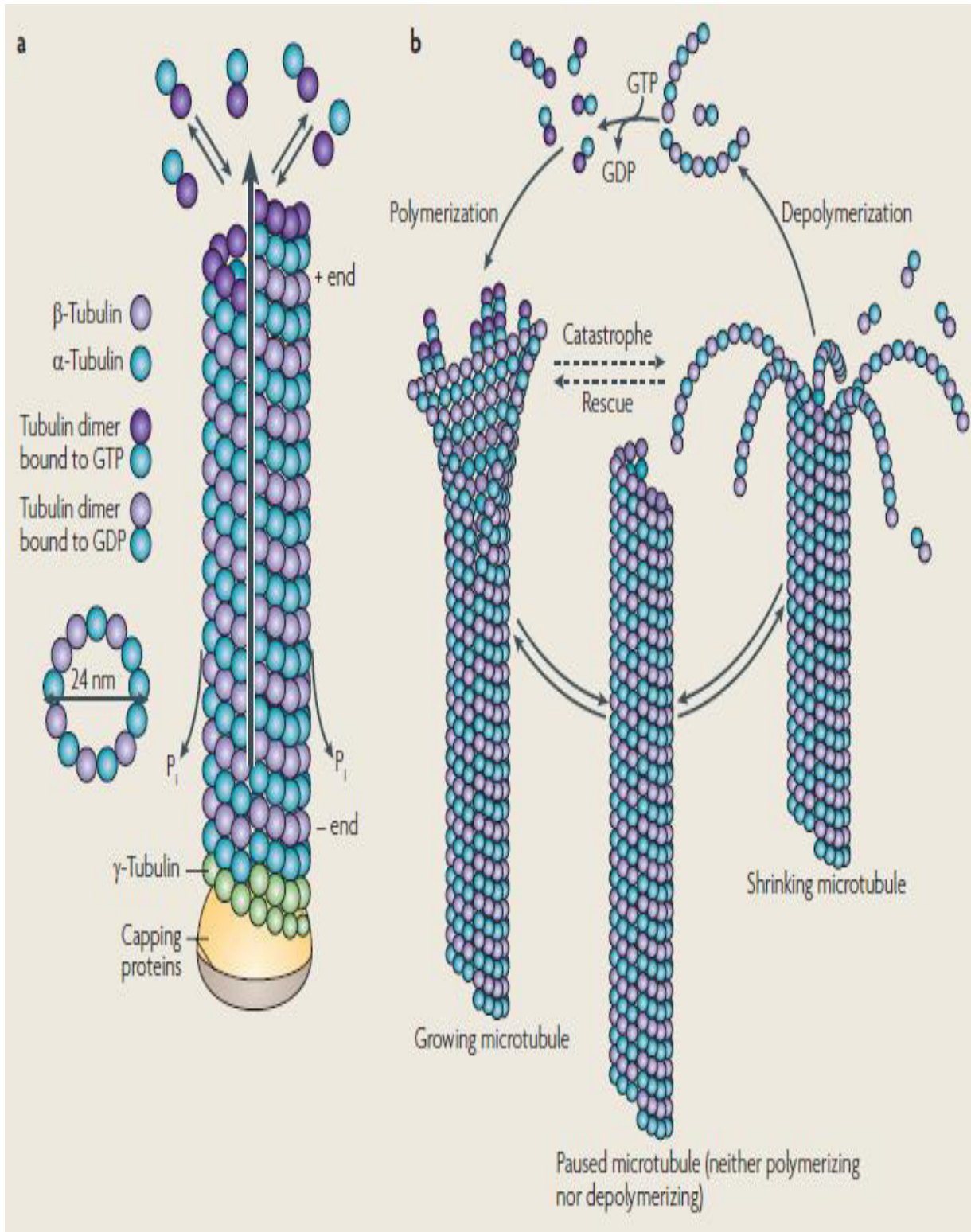


Figure 12. Microtubules: les bases [129].

2.1.3. Rôle crucial des microtubules dans la mitose

A côté de son rôle important dans le processus de migration cellulaire [141] et dans le maintien de l'architecture cellulaire, le réseau microtubulaire joue un rôle très important dans la mitose. En effet, dans les fuseaux mitotiques, les microtubules possèdent une dynamique unique rapide et cruciale pour une mitose réussie. Au cours de l'interphase, les microtubules subissent un *turnover* (échantent leurs tubuline avec le pool de tubuline soluble) relativement lent, avec des demi-vies allant de quelques minutes à plusieurs heures [142, 143].

La mitose dans la plupart des cellules progresse rapidement et les microtubules hautement dynamiques dans le fuseau mitotique sont nécessaires à tous les stades de la mitose. Premièrement, pour la fixation opportune et correcte des chromosomes à leurs kinétochore sur le fuseau pendant la prométaphase après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Deuxièmement, pour les mouvements complexes des chromosomes qui les amènent à leurs positions correctement alignées sur la plaque en métaphase, appelée équatoriale. Enfin, pour la séparation synchrone des chromosomes en anaphase et en télophase après la fin de la métaphase -anaphase. Au cours de la prométaphase, les microtubules émanant de chacun des deux pôles du fuseau font de grandes excursions de croissance et de raccourcissement, sondant essentiellement le cytoplasme jusqu'à ce qu'ils trouvent et s'attachent aux chromosomes à leurs kinétochores [144].

La présence d'un seul chromosome qui est incapable d'atteindre une fixation bipolaire au fuseau est suffisante pour empêcher une cellule de passer à l'anaphase; la cellule reste alors bloquée dans un état de type prométaphase / métaphase et subit finalement une apoptose [145].

2.2. Agents anti-microtubules

2.2.1. Classification

Les médicaments ciblant les microtubules sont une collection diversifiée de composés qui partagent la propriété de perturber la fonction des microtubules par interaction avec la tubuline [146]. Ces médicaments agissent, soit en stabilisant, soit en déstabilisant la polymérisation des microtubules (**Tableau 1**) [147]. Les médicaments qui lient la tubuline et favorisent la polymérisation comprennent les taxanes, les épothilones, le discodermolide et les composés éléuthérobine et les sarcodictyines (famille des éléuthésides) [148-150]. Les médicaments qui lient et inhibent la polymérisation de la tubuline comprennent les vinca-

alcaloïdes, la colchicine et les dolstatines [148-151]. L'estrामustine est un agent anti-microtubule qui se lie aux protéines associées aux microtubules (PAMs) et favorise la dépolymérisation [152].

Tableau 1. Classification des médicaments ciblant les tubulines [153].

Médicaments inhibant la polymérisation des tubulines	Médicaments favorisant la polymérisation des tubulines
Substances classiques	
Vincristine	Paclitaxel
Vinblastine	Docétaxel
Vindésine	
Vinorélbine	
Nouvelles substances	
Dolstatines	Éleuthérobine
Cryptophycine	Épothilone B
	Discodermolide
	BMS-247550

2.2.2. Mécanisme d'action et activités pharmacologiques

Les agents anti-microtubules sont appelés « médicaments antimitotiques » car ils interfèrent avec l'équilibre dynamique normale des microtubules, ce qui perturbe le fonctionnement de l'appareil mitotique. En outre, ces médicaments peuvent affecter les microtubules au cours de l'interphase cellulaire et inhiber la motilité cellulaire et l'organisation subcellulaire normale. Le résultat de ces interactions est l'échec de la cellule de subir une mitose normale. Cela conduit à la mort cellulaire médiée par des voies appropriées.

Les deux principales classes de médicaments antimitotiques utilisées pour traiter le cancer sont les vinca-alcaloïdes (alcaloïdes de la pervenche) et les taxanes. Les vinca-alcaloïdes, dont la vincristine, la vinblastine [154] et la vinorelbine [155], se lient aux microtubules dépolymérisés et inhibent leur assemblage. La vincristine est plus efficace contre le lymphome non-hodgkinien, la maladie de Hodgkin, les tumeurs solides pédiatriques et puis les tumeurs solides de l'adulte [156]. La vinorelbine, en revanche, est plus efficace contre les cancers du sein et du poumon [157]. La vinblastine est utilisée dans le traitement du cancer de la prostate, le lymphome non-hodgkinien ainsi que le cancer du sein [158].

Les taxanes, paclitaxel et docétaxel, se lient aux microtubules polymérisées et inhibent leur dispersion. Ainsi, ces taxanes désactivent l'appareil mitotique en perturbant le fonctionnement normal des microtubules [159]. Comme les vinca-alcaloïdes, le mécanisme d'action des taxanes est dose-dépendant [160]. Le paclitaxel (connu sous le nom commercial Taxol[®]) et le docétaxel partagent un large spectre d'activité antitumorale, y compris le cancer du sein, du poumon, de l'ovaire, de la vessie et de la prostate [161]. Les deux médicaments ont également une action sur les l'adénocarcinome gastrique et le sarcome de Kaposi lié au SIDA [161].

Un troisième médicament, l'estrามustine, qui se lie aux microtubules et aux PAMs est utilisé dans le traitement du cancer de la prostate [152].

3. Mort cellulaire

Dans la littérature, plusieurs formes de mort cellulaire programmée ont été décrites dans la classification de Schweichel et Merker en fonction des caractéristiques morphologiques des cellules [162]. Cette classification (**Tableau 2**) distingue l'existence de deux formes principales de mort cellulaire programmée soit l'apoptose (type I: où les débris sont éliminés par les lysosomes des cellules phagocytaires) soit l'autophagie (type II: où l'élimination procède par l'action des lysosomes propres à la cellule).

Tableau 2. Apoptose, nécrose et autophagie [162].

	<i>Accidentelle</i>		<i>Programmées</i>	
	Nécrose		Apoptose	Autophagie
Type de mort	Irréversible		+/- Réversible	Réversible
Mode d'induction	Choc physique		Signal physiologique	Carence nutritive
Morphologie	Dégradation anarchique		Corps apoptotiques	Vacuolisation
Résultats tissulaires	Inflammation		Morphogenèse Homéostasie	Développement Homéostasie

3.1. Apoptose : mort cellulaire programmée

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée de type I) est un processus important dans une grande variété de systèmes biologiques différents, y compris le renouvellement normal des cellules, le système immunitaire, le développement embryonnaire, la métamorphose et l'atrophie hormono-dépendante, ainsi que dans la mort cellulaire induite par des produits chimiques [163-165].

L'apoptose se caractérise par le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau, la dégradation de l'ADN nucléaire avec des fragments correspondant à des multiples de 180-200 paires de bases (pb) et la formation de vésicules contenant les débris cellulaires [166]. De plus, les cellules en apoptose possèdent des organelles bien préservées alors que leur cytosquelette est dégradé [167]. Ce type de mort cellulaire n'induit aucune réponse inflammatoire et n'affecte en rien les cellules voisines. Elle est exécutée dans des voies intrinsèques ou extrinsèques en réponse à divers stimuli de mort cellulaire et est régulée par une classe spécifique de composés tels que la cascade de caspase [168].

3.1.1. Voies de l'apoptose

On reconnaît principalement deux voies qui conduisent à la mort cellulaire programmée : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Ces deux voies ont en commun de conduire à l'activation des caspases, ce qui constitue le point de non-retour pour la cellule. Si les caspases sont activées, la mort est inévitable. Ces deux voies sont complexes et font intervenir un réseau d'interactions protéiques incluant des récepteurs, des protéines régulatrices et des caspases (**Figure 13**). La voie extrinsèque est induite par les récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR) situés dans la membrane plasmique. L'activation de ces récepteurs induit la cascade des caspases ce qui conduit la cellule à l'apoptose. La voie intrinsèque est dirigée par les membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) tels que Bax, qui induit le relargage du cyt-c et la cascade des caspases ce qui conduit aussi la cellule à l'apoptose [169].

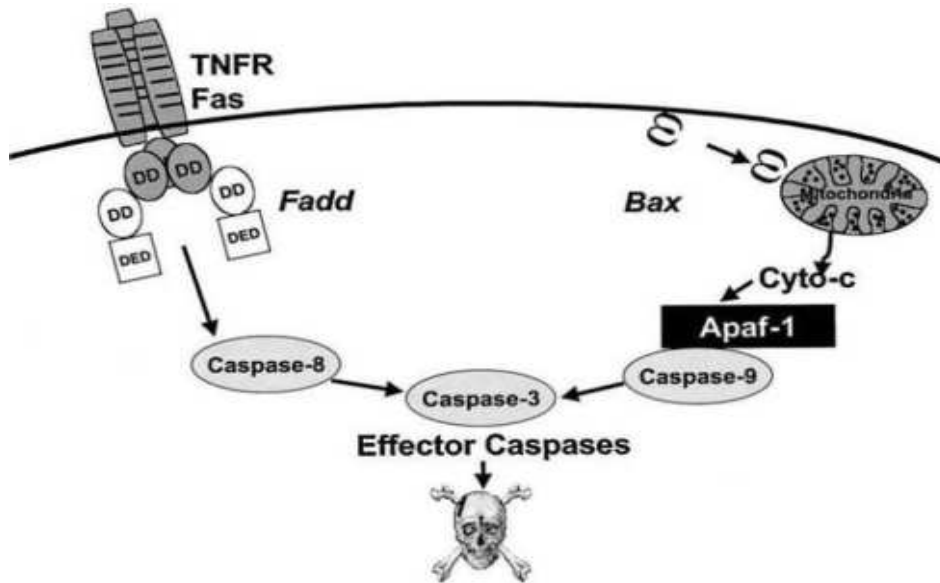


Figure 13. Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose [169].

3.1.1.1. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque d'apoptose est médiée par l'activation de récepteurs dits "récepteurs de mort", des récepteurs de surface cellulaire qui transmettent des signaux apoptotiques après liaison avec des ligands spécifiques. Plusieurs récepteurs connus appartiennent à la famille des récepteurs TNF tels que Fas (Apoptosis Stimulating Fragment), TNF-R1 ou TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). La signalisation subséquente est médiée par la partie cytoplasmique du récepteur de la mort qui contient une séquence conservée appelée domaine de mort, DD (Death Domain). Des molécules adaptatrices comme FADD (*Fas-associated death domain*) possèdent elles-mêmes leurs propres DDs par lesquelles elles sont recrutées vers les DD du récepteur de la mort activé, formant ainsi le soi-disant complexe inducteur de mort, DISC (death-inducing signaling complex). En plus de son DD, l'adaptateur FADD contient également un domaine effecteur de la mort, DED (Death Effector Domain) qui, par l'intermédiaire de l'interaction homotypique DED-DED, séquestre la procaspase-8 au DISC (**Figure 14**) [170].

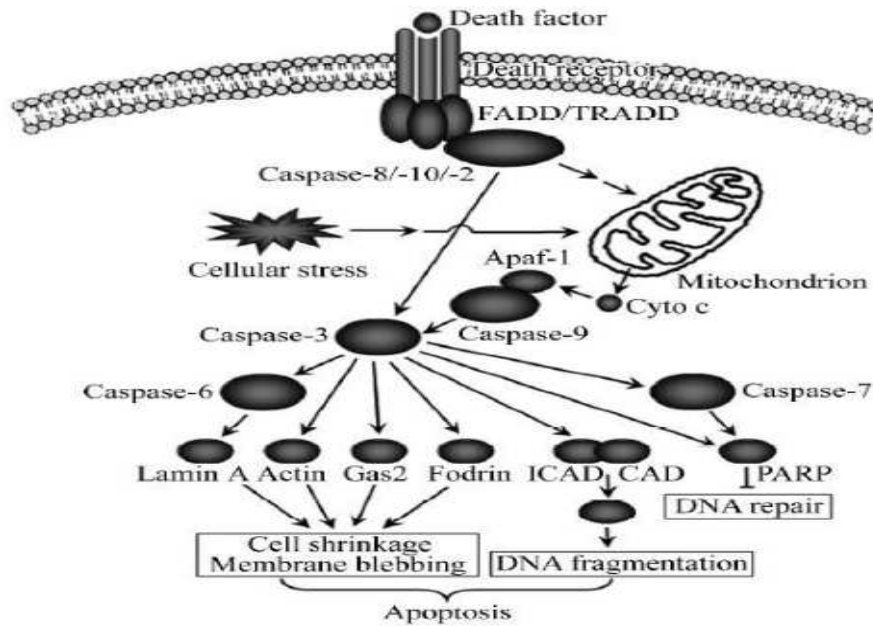


Figure 14. Substrats en aval des caspases exécutrices de l'apoptose [170].

La concentration locale de plusieurs procaspase-8 molécules au DISC conduit à leur activation autocatalytique et la libération de la caspase-8 active. La caspase-8 active traite ensuite les caspases effectrices en aval qui clivent ensuite des substrats spécifiques conduisant à la mort cellulaire. Les cellules ayant la capacité d'induire de telles voies d'apoptose directes et principalement des caspases dépendantes ont été classées comme appartenant aux cellules dites de type I [171].

3.1.1.2. Voie intrinsèque

Dans les cellules dites de type II, le signal provenant du récepteur activé ne génère pas une cascade de signalisation de caspase suffisamment forte pour exécuter la mort cellulaire seule. Dans ce cas, le signal doit être amplifié *via* des voies apoptotiques dépendantes des mitochondries. Le lien entre la cascade de signalisation des caspases et les mitochondries est fourni par le membre de la famille Bcl-2, Bid (*BH3-interacting domain death agonist*). Bid est clivé par la caspase-8 à sa forme tronquée, tBid (*truncated Bid*), qui passe vers les mitochondries où elle agit conjointement avec les membres pro-apoptotiques Bcl-2 Bax et Bak (*Bcl-2 Homologous Antagonist Killer*) pour induire la libération du cyt-c et d'autres facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux dans le cytosol [172]. Le cyt-c se lie à l'Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) monomère qui, lors d'un changement de conformation dépendant de l'ATP, s'oligomérisse pour assembler l'apoptosome (**Figure 15**),

un complexe protéique cytoplasmique, qui déclenche l'activation de l'initiateur procaspase-9 [173]. La caspase-9 activée initie ensuite une cascade de caspase impliquant des caspases effectrices en aval telles que la caspase-3, la caspase-7 et la caspase-6, conduisant finalement à la mort cellulaire (**Figure 15**) [174].

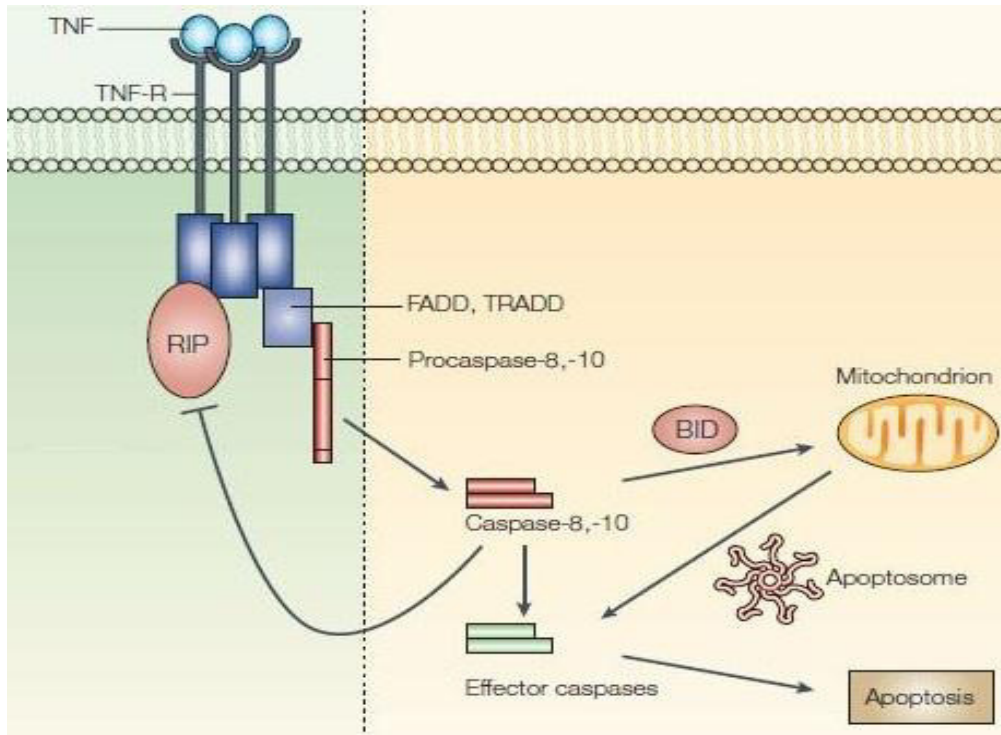


Figure 15. Implication des caspases dans la mort cellulaire [175].

3.1.2. Régulateurs de l'apoptose

3.1.2.1. Famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle important en activant ou en supprimant la mort cellulaire programmée. On note alors les membres pro-apoptotiques (qui induisent la mort des cellules) et les membres anti-apoptotiques (qui favorisent la survie des cellules) en fonction de leurs effets respectifs d'activateurs et de répresseurs. Le gène *Bcl-2* a été le premier régulateur de l'apoptose à être identifié chez l'humain. La surexpression de Bcl-2 empêche les cellules de mourir normalement ce qui explique la prolifération excessive des cellules et la formation d'une tumeur [176]. Quelques années plus tard, la protéine Bax a été isolée grâce à sa capacité de former un hétérodimère avec la protéine Bcl-2 [177]. Quand elle est surexprimée, la protéine Bax accélère l'apoptose et inhibe l'effet protecteur conféré par la surexpression de Bcl-2.

La plupart des membres anti-apoptotiques possèdent les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 alors que les pro-apoptotiques ne possèdent que les domaines BH1, BH2 et BH3. De plus, il existe d'autres protéines telles que, Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), Bcl-w, qui possèdent tous les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4. Ainsi, les membres de la famille Bcl-2 peuvent être divisés en trois groupes : les anti-apoptotiques multidomains comme Bcl-2 et Bcl-XL, les pro-apoptotiques multidomains, comme Bax et Bak, et les pro-apoptotiques qui ne possèdent que le domaine BH3, comme Bad (*Bcl-2-associated death promoter*) et Bid. La plupart des membres de cette famille peuvent former des homo- ou hétérodimères entre eux par le domaine BH3. L'équilibre entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques via leurs interactions mutuelles permet donc de déterminer le sort de la cellule [178].

Les membres pro-apoptotiques sont antagonisés par des protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-2. En réponse à un stimulus apoptotique, les BH3-protéines sont activées et peuvent empêcher les membres anti-apoptotiques Bcl-2 d'inhiber l'action des protéines pro-apoptotiques. En outre, ils peuvent induire directement un changement conformationnel de Bax et de Bak qui s'oligomérisent et s'insèrent dans la membrane mitochondriale où ils forment des pores soit par eux-mêmes soit en s'associant avec le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm). En conséquence, les facteurs pro-apoptotiques sont libérés à partir de la membrane mitochondriale interne dans le cytosol, comme le cyt-c, qui contribue à la formation de l'apoptosome et l'activation ultérieure de la cascade des caspases.

3.1.2.2.Caspases

Le terme « caspase » fait référence à une famille de protéases, extrêmement conservées au cours de l'évolution, possédant une cystéine dans leur site actif et clivant leurs substrats après un résidu acide aspartique, d'où le terme caspase, **C**ystein-**A**Spartate **P**rote**A**SE. Elles sont d'une importance centrale dans le réseau de signalisation apoptotique et sont activées dans la plupart des cas dans la mort cellulaire apoptotique [179].

Dans la cellule, les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, les procaspases. Lors de la maturation, les procaspases sont clivées protéolytiquement pour former les caspases actives. En effet, strictement définie, la mort cellulaire ne peut être classée comme suivant un mode apoptotique classique que si l'exécution de la mort cellulaire est dépendante de l'activité caspase [171].

Nous pouvons compter jusqu'à maintenant plus de quatorze membres de cette famille qui ont été identifiés et séparés en deux groupes : les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) et les caspases effectrices (3, 6, 7) [180]. Les caspases initiatrices activent les effectrices, et les effectrices ont comme rôle de cliver des protéines bien précises, résultant soit en leur activation soit en leur inactivation. Le mécanisme d'activation diffère pour les deux groupes de caspases. L'activation des caspases initiatrices se fait par deux mécanismes : la proximité induite et l'association avec une sous unité régulatrice. Pour la proximité induite, l'activation requiert un recrutement massif de procaspases dans un microenvironnement de la cellule, un récepteur de la mort par exemple, et c'est cette proximité qui permet à la faible activité protéolytique intrinsèque des procaspases de s'autocliver entre elles, et ainsi de s'activer. Pour le mécanisme d'activation par liaison : l'association avec une ou des sous unités régulatrices active la procaspase [181]. Une fois activée par un clivage protéolytique, la caspase initiatrice activera les caspases effectrices qui cliveront leurs substrats et mèneront ainsi la cellule à sa mort.

L'activation et l'activité des caspases sont soumises à une inhibition directe par les protéines de la famille des IAP (*Inhibitor of apoptosis protein*). Celles-ci sont capables d'inhiber les caspases en se liant à leur domaine catalytique ou encore en empêchant leur dimérisation [182].

SECTION III

LES MODÈLES ANIMAUX DE CANCER DU SEIN

Des modèles animaux ont été utilisés comme première ligne dans la prédiction de l'efficacité et la recherche de toxicités pour les agents chimiothérapeutiques contre le cancer avant d'entrer dans la clinique. Cela a entraîné le développement de nombreux modèles animaux différents pour l'étude de la maladie maligne. Ils jouent un rôle important dans le développement de médicaments et l'étude de mécanismes biologiques moléculaires.

1. Les modèles murins

De nombreux modèles murins ont été développés pour étudier le cancer humain. Ces modèles sont utilisés pour étudier les facteurs impliqués dans la transformation maligne, l'invasion et la métastase, ainsi que pour examiner la réponse au traitement.

1.1. Les modèles Nude (nu) et severe combined immunodeficiency (SCID)

Le phénotype Nude (nu) correspond au phénotype le plus couramment employé comme modèle murin immunodéficient. Les souris homozygotes (nu/nu), mutées sur le chromosome 11, sont athymiques [183] et présentent donc une réponse antigénique T-dépendante faible [184]. On retrouve également une maturation des cellules B défectueuse même si les formes précoces semblent normales [185].

Actuellement, le modèle SCID est devenu l'un des modèles les plus utilisés comme modèle murin immunodéficient. Mutées (scid/scid) sur le chromosome 16, ces souris présentent un phénotype d'immunodépression beaucoup plus sévère que les autres modèles. Elles présentent des organes lymphoïdes sous-développés et une différenciation et maturation des lymphocytes B et T défectueuses dues à un défaut de formation des immunoglobulines [186].

La découverte des souris athymiques Nudes (nu/nu) qui étaient déficitaires en lymphocytes T [187], et plus tard des souris avec immunodéficiences combinées sévères (scid/scid) déficitaires en cellules T et B [188], a permis la transplantation et la propagation courantes et efficaces de tissus tumoraux humains (xénogreffes) chez la souris. Ces souches de souris permettent, à des lignées cellulaires humaines établies *in vitro*, de se propager par voie sous-cutanée (*sc.*), reconstituant des tumeurs solides. Des explants de tissu tumoral humain obtenus par biopsie ou autopsie peuvent également être transplantés directement dans ces souches de souris.

1.2.Beige (bg)

D'autres modèles murins peuvent également être utilisés, tel que les souris Beige (bg) homozygotes caractérisées par des altérations des fonctions des lymphocytes T, des macrophages et des granulocytes ainsi qu'un dysfonctionnement de l'agrégation plaquettaire [189]. Suite à ces anomalies, le modèle Nude serait préféré comparé à ce second modèle.

1.3.Nog

On retrouve également le modèle Nog (NOD/Shi-scid/IL-2R γ ^{null}), qui est un autre modèle de souris immunodéficientes, Il est issu d'un croisement de 2 modèles murins. Le premier modèle est le modèle NOD (Non-Obese Diabetic) auquel on surajoute un KO pour la chaîne γ de IL2-R [190]. Le deuxième modèle est le modèle murin SCID donnant naissance à des souris NOD/Shi-scid/IL-2R γ ^{null} [191]. Ces souris présentent une déficience combinée des cellules B, T et NK (*natural killer*) et NKT (*natural killer T*).

2. Modèles de cancer des murins classiquement utilisés

Des modèles de cancer de souris ont été systématiquement utilisés pour déterminer l'activité *in vivo* de nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux avant le développement clinique et les tests chez l'homme. Les modèles les plus courants sont les xéno greffes de tumeurs humaines et les lignées cellulaires cultivées par voie *sc.* chez des souris immunodéficientes telles que les souris athymiques Nude ou les souris SCID.

L'essentiel de ces modèles peut être séparé en deux groupes: Le premier, les greffes de tumeur (syngénique ou xénogénique) dans des animaux immunocompétents ou immunodéprimés, respectivement. Et le second, des souris génétiquement modifiées qui récapitulent un génotype de cancer spécifique [192].

2.1.Modèles des xéno greffes de tumeurs humaines

Dans le modèle de xéno greffe de tumeur humaine, des cellules tumorales humaines sont transplantées, soit sous la peau, soit dans l'organe dans lequel le type de la tumeur est né, dans des souris immunodéprimées qui ne rejettent pas les cellules humaines. Par exemple, la xéno greffe sera facilement acceptée par des souris Nudes athymiques, des souris immunodéficientes sévèrement déprimées, SCID, ou d'autres souris immunodéprimés [192].

Selon le nombre de cellules injectées ou la taille de la tumeur transplantée, la tumeur se développera en 1 à 8 semaines (ou dans certains cas 1 à 4 mois, voire plus), et ainsi, la réponse aux régimes thérapeutiques appropriés peut être étudiée *in vivo*. En outre, diverses méthodes de génération de modèles de souris ont été établies pour l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité de nouveaux médicaments.

Les types et les caractéristiques des modèles de xénogreffe de tumeur sont focalisés sur l'utilisation dans le développement de médicaments anticancéreux :

2.1.1. Modèle ectopique de xénogreffes tumorales

Généralement, les cellules cancéreuses humaines sont injectées par voie *sc.* dans la patte postérieure ou le dos de la souris (**Figure 16A**). Dans ce modèle, le site transplanté est différent de l'origine des cellules cultivées. Le modèle ectopique est le modèle de cancer standard utilisé pour la validation et l'évaluation dans les études en oncologie. Après l'établissement de lignées cellulaires cancéreuses pour le dépistage anticancéreux dans l'Institut National du Cancer (INCa) (États-Unis), des modèles de xénogreffe dérivés de ces lignées cellulaires ont été développés [193].

2.1.2. Modèle orthotopique de xénogreffes tumorales

Des modèles alternatifs d'évaluation de la sensibilité tumorale ont été développés. Le modèle orthotopique de xénogreffe tumorale est un outil avancé qui se repose sur un microenvironnement immunosuppresseur murin. Dans le modèle orthotopique, les cellules cancéreuses humaines sont transplantées dans le même site d'origine de la tumeur. Par exemple, des cellules de cancer du poumon ont été directement injectées dans le poumon de la souris pour le modèle orthotopique (**Figure 16B**) [193].

Le taux de tumorigénicité est difficile à calculer car presque toutes les tumeurs, à l'exception du mélanome, sont invisibles à l'œil nu. De plus, les modèles orthotopiques se limitent à la mesure de la croissance tumorale sans sacrifice, contrairement aux modèles ectopiques sous-cutanés. À ce jour, l'imagerie est la méthode choisie pour surveiller la progression des tumeurs en croissance dans les modèles orthotopiques. Actuellement, des modèles orthotopiques avec des lignées de cellules cancéreuses exprimant la fluorescence ou la luciférase sont observés par imagerie optique, une tomographie informatisée (*CT : computerized tomography*) ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) [194]. Pour

évaluer la carcinogénèse et déterminer la croissance de la tumeur sans sacrifice, un équipement coûteux est nécessaire. Ainsi, la disponibilité de ce modèle est limitée.

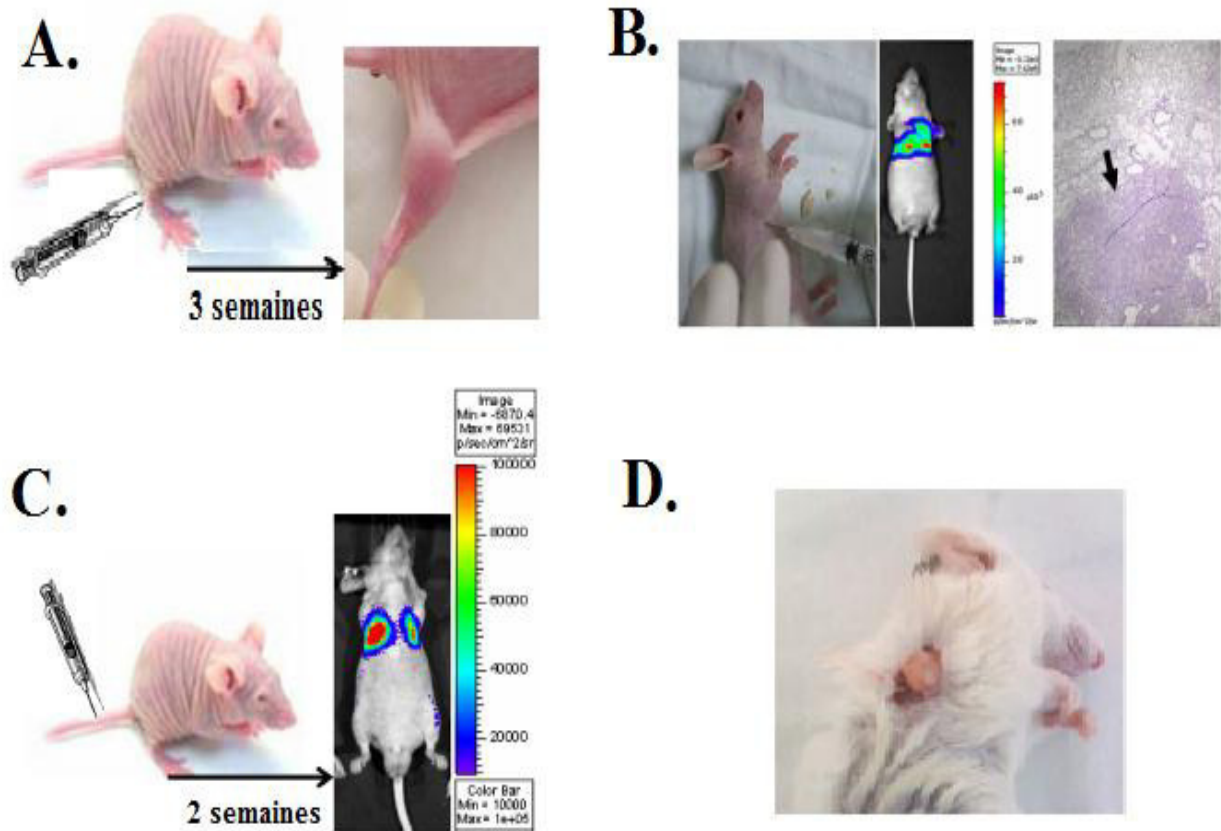


Figure 16. Modèles des xénogreffes de tumeurs humaines [193]. **A.** Modèle de xénogreffe ectopique : Les cellules cancéreuses ont été injectées par voie *sc.* dans des souris Nudes BALB/c. Après environ deux semaines, la tumeur a été observée. **B.** Modèle de xénogreffe orthotopique : Des cellules de CBNPC (cellules A549) ont été injectées dans la cavité thoracique de la souris BALB/c Nude. La tumeur a été observée par imagerie optique *in vivo*. Le tissu pulmonaire isolé a été coloré et observé par microscopie. **C.** Modèle de métastase : Des cellules cancéreuses exprimant la luciférase ont été injectées dans la veine de la queue. La tumeur a été observée par imagerie optique *in vivo*. **D.** Modèle PDTX : Les tissus tumoraux dérivés du patient ont été transplantés dans une souris SCID.

2.1.3. Modèle de cancer métastatique

Les tumeurs qui se forment localement par exposition aux ultraviolets, aux rayonnements ionisants et aux carcinogènes circulent à l'intérieur des vaisseaux et des ganglions lymphatiques par invasion, provoquant des métastases (cancer secondaire) sur des sites susceptibles d'être envahis. Selon l'hypothèse de Paget, la cellule cancéreuse primaire (semence) initie la métastase dans un environnement approprié (le sol) tel que le poumon, le foie, l'os, la lymphe et le cerveau [195].

Pour l'établissement d'un modèle de métastase, différentes méthodes ont été développées et il existe deux types de modèles de xénogreffe humaine. Tout d'abord, dans la transplantation orthotopique, les cellules tumorales transplantées donnent naissance à la tumeur primaire, la tumeur est enlevée, puis une métastase est observée. Dans le deuxième type, les cellules cancéreuses sont injectées par voie intraveineuse dans des souris Nudes (**Figure 16C**) ou SCID, où elles circulent comme des cellules souches cancéreuses et déclenchent des métastases [193, 196]. Généralement, ce modèle est appliqué pour le diagnostic qui implique l'imagerie par IRM ou la tomographie par émission de positons (TEP) [197].

2.1.4. Modèle des tumeurs dérivées de patient (PDTX)

Les modèles de xénogreffe, malgré leurs avantages, sont limités dans leur capacité à démontrer comment est-ce qu'un patient atteint de cancer pourrait répondre à un traitement particulier. Afin de remédier aux lacunes de ces modèles, une xénogreffe tumorale dérivée du patient (PDTX) a été développée et utilisée [198, 199].

Le PDTX consiste à transplanter le tissu cancéreux du patient directement dans des tissus immunodéprimés (**Figure 16D**) [193], l'information génétique et les marqueurs immunohistologiques sont corrélatifs au patient et peuvent être appliqués pour évaluer de nouveaux médicaments anticancéreux [200] et des traitements personnalisés contre le cancer. Cependant, le modèle PDTX présente des contraintes techniques : il coûte cher et consomme du temps. L'établissement de PDTX prend environ trois mois au premier passage. Comme pour la transplantation de xénogreffes, la première transplantation chez les souris SCID est nécessaire pour échapper au rejet immunitaire aigu, ce qui est coûteux. En outre, le volume de tissu tumoral dérivé du patient est très limité, de sorte que le nombre de population de PDTX devrait être augmenté par le passage de tissu de tumeur. Simultanément, chaque passage des

tissus tumoraux doit être analysé histopathologiquement et comparé avec le tissu d'origine. A partir du second passage, des souris Nudes peuvent être utilisées.

2.2.Modèle des souris génétiquement manipulées

A côté du modèle de xénogreffes tumorales, se trouve le modèle des souris génétiquement manipulées (*Genetically Engineered Mouse Model* : GEMM), qui est une méthode avancée pour évaluer les mécanismes de la carcinogenèse et de la résistance aux médicaments [201]. Les souris immunocompétentes sont utilisées pour le modèle GEMM, comme dans un modèle syngénique. Ainsi, ce modèle permet l'application du développement d'adjuvant immunitaire pour le cancer. De plus, ce modèle est utile pour élucider les processus biologiques et étudier les cellules tumorales et leur microenvironnement. Cependant, il est très coûteux, hétérogène et compliqué.

CHAPITRE II

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

1. Matériels

1.1. Lignées cellulaires

Des lignées de cellules humaines d'adénocarcinome de sein, MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7, lignée de cancer du sein hormono-dépendant ER⁺) et MDA-MB-231 (M.D. Anderson Hospital-Metastatic Breast, lignée de TNBC), ont été achetées de l'institut des Sciences Biologiques de Shanghai, Académie Chinoise des Sciences (Shanghai, Chine).

1.2. Médicaments et réactifs divers

La DPT (Poids moléculaire (PM) 398 g/mol), une poudre blanche semi-synthétique de pureté élevée (> 98%), est fournie par l'Institut de Recherche de Chimie Pharmaceutique, China Pharmaceutical University. Une solution mère de DPT d'une concentration de 10⁻² mol/L (M) a été préparée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma, USA). Les provenances des autres réactifs sont les suivantes : VP-16 (pureté > 98%) (Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques et Biologiques, Chine), Taxol (30mg/5ml) (Shenzhen Main Luck Pharmaceuticals Inc., China). Tous les médicaments ont été dilués dans des milieux de culture sans sérum. Le VP-16 et le docétaxel (solutions pour injection) ont été achetés chez Qilu Pharmaceutical Co., Ltd. Chine.

Les milieux Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, USA) et Leibovitz's medium (L15) (Hyclone, USA), le sérum bovin fœtal (FBS) (Gibco, USA) et la pénicilline-streptomycine (Beyotime Biotechnology, China). Le tampon phosphate salin (PBS) et un mélange 0.25% Trypsine/acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) (préparés au laboratoire). L'albumine de sérum bovin (BSA) (Sunshine, China).

Les kits suivants ont été utilisés : le kit de comptage des cellules (CCK-8) acheté du laboratoire Dojindo (Kumamoto, Japon) ; le Kit du cycle cellulaire et de détection de l'apoptose (Beyotime Biotechnology, Nanjing, China) ; le Kit de détection de l'apoptose Annexine V-FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) a été fourni par BD Biosciences (CA, USA); le Kit du colorant 5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodure (JC-1) (Beyotime Biotechnology, Nanjing, China); le Kit de l'inhibiteur pan-caspase z-VAD-fmk acheté chez Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale) (NY, USA); le Kit d'extraction des protéines totales (KeyGEN, China) et le Kit d'acide bicinchoninique (BCA) (Thermo, USA);

Les anticorps suivants ont été également utilisés : Anticorps monoclonal des souris anti- α -tubuline (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); Anticorps secondaires de chèvre anti-souris : Immunoglobuline G (IgG) Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, CA, USA) ; Anticorps du Western Blot: β -actine a été acheté chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA); Cyclin B1, cdc25c, CDK1, Bax, PARP et Bcl-2 ont été fournis par Signalisation Cellulaire Technologie (CST), Inc. (Danvers, USA).

Le colorant Hoechst 33258 (Invitrogen CA, USA); la solution de montage anti-décoloration (Beyotime Biotechnology, Nanjing, China); les membranes de polyvinylidene difluoride (PVDF) fournies par les laboratoires BioRad (Hercules, USA). Une injection de chlorure de sodium à 0,9% (solution saline normale, SSN) a été achetée chez Nanjing Xiaoying Pharmaceutical Holdings Limited, Chine.

1.3.Animaux

Les femelles des souris Nudes BALB/c nu/nu (âgées de 6 - 8 semaines, pesant 18-24 g) ont été utilisées pour établir le modèle de xénogreffe de tumeur MDA-MB-231. Elles étaient fournies par le laboratoire des animaux de Shanghai, SIPPR-BK Co., Ltd (Shanghai, Chine). Les souris ont été élevées dans les cages de laboratoires sous des conditions stériles spécifiques exemptes d'agents pathogènes dans une pièce ayant une température et une humidité constantes. Tous les tests sur les animaux et les procédures expérimentales ont été approuvés par le Comité d'Éthique de l'Université Pharmaceutique de Chine, Nanjing, Chine.

1.4.Appareils et logiciels

Là où il était nécessaire dans l'étude (voir Méthodes), les appareils et les logiciels suivants ont été utilisés : un microscope inversé à fluorescence IX-71 (Olympus, Japon), un lecteur de microplaques 680- BioRad (Laboratoires BioRad, Hercules, CA, USA), un bain-Marie (Sigma, USA), des hottes stériles à flux laminaire (AIRTECH, USA), des incubateurs (Thermo, USA), des centrifugeuses (BECKMAN COULTER, USA), un densitomètre d'imagerie ChemiDoc XRS, le cytomètre de flux BD FACSCalibur™ de Becton Dickinson (Invitrogen, CA, USA), les instruments du Western Blot fournis par les laboratoires BioRad (CA, USA), des balances électroniques (Sartorius, Allemagne), pied à coulisse (SF2000, Guangxi, Chine), le logiciel Origin Labs OriginPro version 8.0, le logiciel CellQuest version

6.0 (BD Biosciences, USA), le logiciel ModFit LT version 3.2 (BD Biosciences, USA) et le programme informatique Quantity One, Laboratoires BioRad (CA, USA).

2. Méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 ont été cultivées dans les milieux DMEM et L15, respectivement, additionnées de FBS à 10% qui a été inactivé par la chaleur et 1% de pénicilline-streptomycine. La culture s'est déroulée à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ pour les cellules MCF-7 mais sans CO₂ pour les cellules MDA-MB-231, selon les recommandations de l'American Type Culture Collection (ATCC).

2.2. Mesure de viabilité par colorimétrie (Calcul de la CI₅₀)

2.2.1. Principe du test au CCK-8

Le test au CCK-8 permet un dosage colorimétrique sensible pour la détermination de la viabilité cellulaire et leur prolifération. Il permet des dosages très commodes en employant un nouveau sel de tétrazolium : le WST-8 (2-(2-méthoxy-4-nitrophényl) -3- (4-nitrophényl) -5-(2,4-disulfophényl) -2H-tétrazolium, sel monosodique), qui produit un colorant orange de formazan hydrosoluble par réduction en présence d'un médiateur d'électrons, 1-Méthoxy-5-méthylphénazinium méthylsulfate (1-Méthoxy PMS) (**Figure 17**).

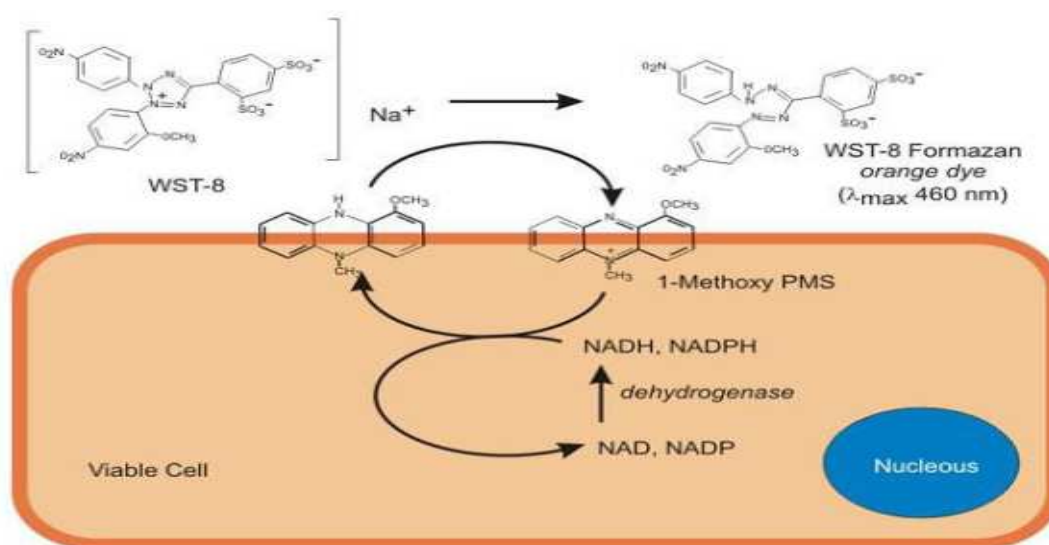


Figure 17. Mécanisme du test basé sur le WST-8 [202].

Le test au CCK-8, non radioactif, permet des analyses colorimétriques sensibles pour la détermination du nombre de cellules viables dans les tests de prolifération cellulaire et de cytotoxicité. Le WST-8 est réduit par des déshydrogénases dans les cellules donnant un formazan orange, qui est soluble dans le milieu de culture tissulaire. La quantité de colorant de formazan générée par les déshydrogénases dans les cellules est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

L'effet de la DPT sur l'inhibition de la croissance cellulaire a été évalué en tant que pourcentage de viabilité cellulaire, où les cellules traitées avec le véhicule étaient considérées comme à 100% viables. La densité optique (DO) des puits témoins et des puits traités a été mesurée à 450 nm avec le lecteur de microplaques 680-BioRad.

La cytotoxicité vis-à-vis des cellules cancéreuses a été exprimée en concentration inhibitrice médiane : CI_{50} (concentration requise pour une inhibition de croissance de 50% *in vitro*) et le pourcentage d'inhibition de la croissance des cellules traitées a été calculé par la formule:

$$\text{Taux d'inhibition cellulaire} = 100 \times (\text{DO Puits témoin} - \text{DO Puits traité}) / \text{DO Puits témoin}$$

La valeur CI_{50} a été calculée à partir de l'équation graphique.

2.2.2. Procédure

La prolifération cellulaire des cellules du cancer du sein humain, MCF-7 et MDA-MB-231, a été évaluée colorimétriquement par le CCK-8. Les cellules MCF-7 (1×10^4) et MDA-MB-231 (1.5×10^4) à croissance exponentielle ont étéensemencées sur des microplaques à 96 puits dans un volume de 180 μ l du milieu de culture par puits. Après 24 heures (h) d'incubation, et après avoir atteint une confluence d'environ 70 à 80%, les cellules ont été exposées à une série de concentrations de DPT de 1 nmol/l (nM) à 1 mmol/l (mM) et de VP-16 (témoin positif), en parallèle pour comparaison, avec trois puits pour chaque concentration. Après 72 h d'exposition aux médicaments, la solution de CCK-8 a été ajoutée à chaque puits et les cellules ont été incubées pendant 1 – 4 h supplémentaires à 37 °C. L'intensité d'absorbance de chaque puits a été mesurée avec un lecteur de microplaques 680-BioRad à 450 nm. L'absorbance des puits traités avec les médicaments a été comparée avec les puits non traités (témoin négatif : puits avec PBS).

Les CI_{50} ont été calculées en utilisant les courbes dose – réponse ajustées (en utilisant le logiciel Origin Labs OriginPro 8.0).

2.3. Cytométrie de flux

2.3.1. Analyse du cycle cellulaire

La distribution du cycle cellulaire a été déterminée en déterminant la teneur en ADN.

- Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de culture de Pétri (60 mm) à une densité de 1×10^6 cellules/boîte et incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 (cellules MCF-7) et sans CO_2 (cellules MDA-MB-231).
- Après 24 h d'incubation, pour assurer une fixation complète des cellules à la matrice de culture, les cellules étaient soit non traitées (témoin), soit traitées avec des concentrations croissantes de DPT (5, 10 et 20 nM) pendant différentes durées (12, 24, 36 et 48 h).
- Après traitement par la DPT, toutes les cellules adhérentes et flottantes ont été récoltées en utilisant de la trypsine 0.25% (sans EDTA) et transférées dans des tubes de centrifugation stériles de 2 ml.
- Les cellules ont été centrifugées à $1000 \times g$ pendant 5 minutes (min) (prolonger le temps de centrifugation ou augmenter légèrement la force centrifugation en cas de culot cellulaire inadéquat).
- Le surnageant a été soigneusement aspiré (environ 50 μ l du surnageant a été conservé pour éviter l'aspiration des cellules), puis le culot cellulaire a été lavé et remis en suspension dans 1 ml de PBS froid. Les cellules ont été centrifugées de nouveau comme décrit ci-dessus. Après centrifugation, le surnageant a été délicatement jeté.
- De l'éthanol à 70% refroidi dans la glace (1 ml) a été ajouté à la suspension cellulaire et incubé à 4 °C pendant 12 – 24 h. Après fixation par l'éthanol, les cellules ont été recueillies par centrifugation et lavées une fois avec du PBS froid.
- Après centrifugation, les cellules ont été traitées avec un tampon de coloration (pH 7,4) contenant de la ARNase A ($\times 50$) et colorées avec de l'iodure de propidium (PI).
- La quantité de solution de coloration PI a été préparée selon le nombre d'échantillons comme indiqué dans le Tableau ci-dessous :

Réactifs du kit	Volume/échantillon
Tampon de coloration	500 µl
Solution de coloration PI (20×)	25 µl
ARNase A (50×)	10 µl
Volume final	535 µl

- Ensuite, les échantillons ont été incubés pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Pour chaque échantillon, au moins 2×10^4 événements ont été enregistrés.
- La répartition de l'ADN et les profils du cycle cellulaire ont été déterminés par cytométrie de flux en utilisant un cytomètre de flux BD FACSCalibur™.
- Les pourcentages de répartition des cellules dans les phases G1, S et G2/M ont été mesurés. Le cycle cellulaire a été traité par le logiciel ModFit LT version 3.2 et les données ont été acquises à l'aide du logiciel CellQuest 6.0 (l'expérience a été répétée trois fois).

2.3.2. Le test à double coloration d'Annexine-V/PI

- La mort cellulaire médiée par l'apoptose, des cellules MCF-7 et MDA-MB-231, a été examinée à l'aide d'un Kit de détection d'apoptose : Annexine V/PI marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, selon le protocole du fabricant.
- Les cellules ont été étalées dans des boîtes de culture de 60 mm (1×10^6 cellules/boîte) et incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ (cellules MCF-7) ou sans CO₂ (cellules MDA-MB-231).
- Après une nuit d'incubation, les cellules traitées sans (témoin négatif) ou avec 5, 10 et 20 nM de DPT et de taxol (témoin positif) pendant différentes durées ont été trypsinées et collectées par centrifugation à 1000×g pendant 5 min à température ambiante (comme décrit ci-dessus).
- Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS froid (le surnageant a été éliminé à chaque fois) et remises en suspension dans 500 µl de tampon de liaison, avec 5 µl d'Annexine V et 5 µl de PI ont été ajoutés.

- Les cellules ont été soumises à un léger vortex et incubées pendant 5 – 15 min dans l'obscurité à température ambiante.
- Ensuite, et dans moins d'une heure, les échantillons ont été analysés en utilisant un cytomètre de flux BD FACSCalibur™.

2.4.Évaluation morphologique des cellules

Pour obtenir un aperçu initial des effets de la DPT sur la morphologie cellulaire, les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des microplaques de culture tissulaire à 6 puits et cultivées dans les conditions indiquées ci-dessus. Lorsque la densité des cellules a atteint environ 80% de confluence, les cellules ont été traitées avec 20 nM de DPT et incubées pendant 12 – 48 h. Les modifications morphologiques ont été observées avec un microscope à fluorescence inversé.

2.5.Test de coloration par immunofluorescence

⇒ Culture des lignées cellulaires

- Les cellules tumorales ont été cultivées sur des lamelles en verre stériles déjà placées dans les chambre des microplaques 24 puits jusqu'à avoir atteint une confluence de 70 – 80%, puis traitées avec 20 nM de DPT et 60 nM de Taxol (témoin positif) pendant 12, 24, 36 et 48 h.
- Après incubation, le milieu de la culture cellulaire a été aspiré et les cellules ont été rincées une fois avec du PBS froid et fixées avec le paraformaldéhyde à 4% (solution de fixation) pendant 30 min à température ambiante.
- Les cellules ont été rincées 3 fois avec le TBST (Tris-Buffered Saline-Tween), pendant 5 min chacune, puis perméabilisées avec le TBS-Triton X (Tris-Buffered Saline-Triton X) à 0,05% pendant 10 min.
- Les cellules ont été à nouveau rincées 3 fois avec TBST (pendant 5 min chacune) afin de procéder à l'immunocoloration.

⇒ **Immunocoloration**

- Les cellules ont été bloquées dans de la BSA à 5% pendant 1 h à température ambiante.
- *Anticorps primaire*: Après l'étape de blocage, les coupes ont été incubées avec l'anticorps anti- α -tubuline, colorant des microtubules (sc-5286), à la dilution appropriée (1:300) dans la solution de dilution d'anticorps primaire (5% de BSA dans TBST) pendant 1 heure à température ambiante ou pendant une nuit à 4 °C.
- Les cellules ont été rincées à nouveau 3 fois avec le TBST (pendant 5 min chacune).
- *Anticorps secondaire*: Les sections ont été rincées puis incubées avec un anticorps secondaire, anticorps de chèvre anti-souris : IgG Alexa-Fluor 488 (A-11001) (1:300) et Hoechst 33258 pentahydrate (bisbenzimidazole) (1:1000) (utilisé pour visualiser le changement nucléaire et la formation d'un corps apoptotique) pendant 30 min dans l'obscurité et à température ambiante.

⇒ **Détection**

- Après coloration pendant 1h, les cellules ont été lavées avec le TBST 3 fois (pendant 15 min à chaque fois) et une fois avec l'eau distillée puis les lamelles ont été séchées à l'air libre.
- Les lamelles ont été enlevées de la plaque de puits et montées avec 10 μ l de solution de montage anti-décoloration et observées avec un microscope à fluorescence inversé.

2.6. Test du potentiel de membrane mitochondriale

Récemment, un nouveau colorant cationique cytofluorimétrique lipophile, JC-1, été développé pour signaler la perte du $\Delta\Psi_m$ [203]. Le JC-1 présente des avantages par rapport aux autres colorants cationiques car il peut rentrer de façon sélective dans les mitochondries et changer de couleur de manière réversible du rouge au vert lorsque le potentiel de membrane diminue, ce qui est indiqué par une diminution de l'intensité de fluorescence du rapport rouge/vert.

Dans les cellules saines à $\Delta\Psi_m$ élevé, JC-1 forme spontanément des complexes connus sous le nom d'agrégats J et colore les mitochondries avec un rouge vif [204]. La charge

négative établie par le $\Delta\Psi_m$ intact permet au colorant lipophile JC-1, portant une charge positive délocalisée, d'entrer dans la matrice mitochondriale où il s'accumule. Lorsque la concentration critique est dépassée, des agrégats J se forment et deviennent rouge fluorescent. D'autre part, dans les cellules apoptotiques ou lésées à faible $\Delta\Psi_m$, le $\Delta\Psi_m$ s'effondre et le JC-1 ne peut s'accumuler dans les mitochondries, il reste sous la forme monomère, qui n'émet que la fluorescence verte.

- Les cellules cancéreuses ont étéensemencées sur des microplaques à 6 puits. Après 24 h, les cellules ont été traitées avec 20 nM de DPT en tant que concentration finale pour différentes durées de temps (12, 24, 36 et 48 h).
- Le contrôle positif, le CCCP (carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone), a été utilisé pour confirmer que la réponse de JC-1 est sensible aux changements du $\Delta\Psi_m$ en induisant le déclin du $\Delta\Psi_m$. Avant la fin du temps indiqué, le CCCP (10 mM) a été ajouté et dilué jusqu'à 10 μ M (1:1000) pendant 20 min à 37 °C. D'autre part, une population de cellules témoins négatives a été également préparée.
- Après 48 h, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées une seule fois avec 1 ml de PBS par puits. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 1 ml de solution de coloration JC-1 (contenant 0,8 ml d'eau ultrapure, 0,2 ml de tampon de coloration JC-1 ($\times 5$) et 5 μ l de la solution mère JC-1 ($\times 200$)) pendant 20 min à 37 °C.
- Après l'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec le tampon de coloration JC-1 dilué avec de l'eau distillée puis 2 ml du milieu de culture cellulaire ont été ajoutés.
- Les images fluorescentes ont été visualisées par un microscope fluorescent et les images fluorescentes ont été capturées par un appareil photo numérique.

2.7. Test d'inhibition des caspases

Les membres de la famille des caspases jouent un rôle important dans l'apoptose et l'inflammation. Le N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluorométhylkétone (z-VAD-fmk) est un inhibiteur pan-caspase perméable aux cellules qui se lie irréversiblement au site catalytique des caspases [205] et inhibe l'apoptose médiée par les caspases en empêchant la transformation des procaspases en leurs formes actives. Le peptide est O-méthylé sur la position-1 (P1) de l'acide aspartique fournissant ainsi une stabilité améliorée et une

perméabilité cellulaire accrue. Le z-VAD-fmk est utilisé dans les études d'apoptose et aussi dans les études sur l'inflammasome.

- Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des microplaques à 96 puits et incubées pendant 24 h à 37 °C avec ou sans CO₂, respectivement. Après 24 h de culture, les cellules étaient soit non traitées soit prétraitées avec 50 µM de l'inhibiteur pancaspase, z-VAD-fmk, pendant 4 h avant l'addition de la DPT. Ensuite, les cellules ont été traitées avec ou sans DPT pour atteindre une concentration finale de 20 nM pendant 48 h et 72 h (Des répliques de trois puits pour chaque traitement).
- Après traitement, 10 µl de CCK-8 (5 mg/ml) ont été ajoutés à chaque puits et les cellules ont été incubées pendant 1 – 4 h supplémentaires à 37 °C. La quantité du produit de formazan, qui est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans la culture, a été mesurée en termes d'absorbance à 450 nm avec un lecteur de microplaques à 96 puits.
- Le pourcentage de viabilité des cellules traitées a été calculé par la formule citée au-dessus (voir chapitre II section 2.2.1).
- Les résultats ont été obtenus en triple.

2.8.Le Western Blot

2.8.1. Préparation des échantillons de protéines

⇒ Extraction des protéines

L'extraction des protéines est une étape importante pour le Western Blot dans les études de recherche sur le cancer. Les protéines des échantillons (lignées cellulaires cancéreuses) doivent être extraites efficacement sans dégradation.

- Les cellules de cancer du sein ont été cultivées dans un milieu complet et laissées se fixer pendant 24h, puis traitées avec 20 nM de DPT et incubées pendant 12, 24, 30, 36 et 48h. Les cellules témoins ont été incubées en parallèle et dans les mêmes conditions. Après l'incubation, l'extraction des protéines a été réalisée selon les étapes suivantes :

- i. Le surnageant a été retiré, 4 ml de PBS ont été ajoutés et les cellules ont été rincées tout en secouant soigneusement les boîtes de cultures pour éliminer toute trace du milieu de culture.
- ii. Le PBS a été enlevé et 200 µl de tampon de lyse froid contenant du PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle : inhibiteur des protéases et des phosphatases) ont été ajoutés (selon le protocole du fabricant) et les boîtes de culture ont été gardées sur la glace pendant 30 min. Pendant le processus de la lyse, il est nécessaire de secouer constamment les boîtes de culture afin d'assurer une lyse suffisante des cellules.
- iii. Ensuite, le tapis cellulaire a été détaché et la suspension cellulaire a été récoltée des boîtes de culture à l'aide d'un grattoir stérile. Les lysats et cellules totales ont été recueillis dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 14.000 – 16.000 rpm (*revolutions per minute*) pendant 15 min à 4 °C pour éliminer toute matière insoluble restante.
- iv. Après la centrifugation, le surnageant a été transféré (extrait cytoplasmique contenant des protéines solubles) dans un nouveau tube Eppendorf et gardé sur la glace jusqu'à utilisation.
- v. Ensuite, la quantité de protéines a été déterminée dans chaque échantillon (méthode BCA : *BiCinchoninic acid Assay*).

N.B

Durant l'incubation avec le traitement, et en raison de l'influence du médicament, certaines cellules se détachent du tapis cellulaire, ce qui est le cas avec les cellules MCF-7. Ainsi et avant l'étape (i) décrite ci-dessus, il est nécessaire de recueillir les cellules dans le milieu de culture et selon la méthode suivante:

- Récupérer le milieu de culture dans un tube de centrifugation de 15 ml, puis centrifuger à 2500 rpm pendant 5 min.
- Retirer le surnageant, ajouter 4 ml de PBS et pipeter doucement les cellules. Encore une fois, centrifuger à 2500 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé en utilisant la pipette pour aspirer toutes les traces du milieu puis procéder comme décrit précédemment.

⇒ *Détermination de la concentration en protéines dans l'échantillon*

Après l'extraction des protéines, la quantité des protéines dans chaque échantillon a été quantifiée (en utilisant *la méthode BCA*) selon les instructions du protocole du fabricant.

- *Méthode BCA*

- Dans une microplaque à 96 puits, des solutions différentes ont été ajoutées, comme indiqué dans le Tableau suivant :

	BSA (μ l)	PBS (μ l)	Échantillon de protéine (μ l)	BCA (μ l)
Courbe standard	0	20	-	200
	2	18	-	
	4	16	-	
	6	14	-	
	8	12	-	
	10	10	-	
	12	8	-	
	14	6	-	
	16	4	-	
	18	2	-	
	20	0	-	
Échantillon	-	19	1	

- Après avoir ajouté le réactif BCA à tous les puits, la microplaque a été incubée à la température ambiante pendant 15 – 20 min puis l'absorbance a été lue à 520 nm.
- La courbe standard a été utilisée pour mesurer la quantité de protéine dans chaque échantillon.

⇒ *Conservation des échantillons*

- Après avoir mesuré la teneur en protéines et pour obtenir la même concentration dans chaque échantillon, l'eau distillée est ajoutée (pour dilution) si nécessaire.
- Ensuite, le tampon de charge a été ajouté comme suit:

Protéine : Tampon de charge à raison de 4: 1 (Tampon de charge = Tampon d'échantillon + Tampon de réduction à raison de 19: 1).

- Pour chaque échantillon, le volume nécessaire correspondant à 40 µg (30-80 µg de protéine /puits) a été calculé (il doit être inférieur à 25 µl).
- Par la suite, les échantillons ont été chauffés une seule fois à 100 °C pendant 5 min.
- Enfin, les échantillons ont été conservés à – 20 °C pour un stockage court ou à – 70 °C pour un stockage à long terme.

2.8.2. Électrophorèse SDS-PAGE

⇒ *Nettoyage des plaques de verre*

Une main a été utilisée pour fixer les deux côtés de la plaque de verre et l'autre main pour nettoyer la plaque à l'aide d'une brosse douce déjà immergée dans le détergent. Après le nettoyage des deux côtés de la plaque, l'eau de robinet a été d'abord utilisé puis l'eau distillée pour la rincer. Ensuite, la plaque a été mise dans un petit panier et laissée sécher pendant un certain temps.

⇒ *Préparation du gel*

La préparation du gel de concentration (gel supérieur) et du gel de résolution/séparation (gel inférieur) est effectuée en fonction du poids moléculaire des protéines désirées, comme suit:

SDS-PAGE (Concentration du gel de séparation)	Rangée de séparation optimale
6% gel	50 ~ 150kDa
8% gel	30 ~ 90kDa
10% gel	20 ~ 80kDa
12% gel	12 ~ 60kDa
15% gel	10 ~ 40kDa

🧪 Dans notre expérience, le gel supérieur est préparé à 4%. Pour le gel inférieur, on a utilisé un gel à 12% (le plus couramment utilisé).

Formulation des gels

Gel (%)	Eau distillée (ml)	30% Acrylamide (ml)	Tris-HCl (ml)	10% SDS (ml)
Gel de concentration (3 ml) (4%)	2.1	0.5	0.38 (pH 6.8)	0.03
Gel de séparation (10 ml) (12%)	4.1	3.3	2.5 (pH 8.8)	0.1

⇒ *Insertion du gel et chargement de l'échantillon*

- Les plaques de verre, nettoyées et séchées, ont été alignées de façon étanche. Ensuite, elles ont été insérées verticalement dans l'étagère BioRad pour préparer le drainage du gel dans la cassette de gel (Pendant cette opération, il faut s'assurer que les deux plaques de verre sont alignées dans le bon ordre, de sorte que le gel ne fuit pas).
- La formulation précédemment décrite a été suivie pour préparer le gel inférieur (gel de séparation), puis 100 µl de 10% de PAs (Ammonium Persulfate) et 10 µl de TEMED (Tétraméthyléthylènediamine) ont été ajoutés. Le tout a été bien mélangé par secousses et le gel a été immédiatement transféré sur la cassette (cette opération doit être effectuée rapidement pour éviter la coagulation du gel à l'intérieur du tube). Ensuite, 3.5 – 4 ml du gel ont été versés doucement dans la cassette jusqu'au milieu du ruban vert indiquant un volume suffisant. Une couche d'eau a été ajoutée sur le dessus du gel, de sorte que le gel puisse se coaguler rapidement (Au moment où le gel est versé, cela peut se faire d'une manière plus rapide mais plus lentement lorsque le gel est proche d'atteindre le niveau souhaité). Pendant ce processus, le gel doit s'écouler le long de la cassette, afin d'éviter les bulles à l'intérieur du gel.
- Au moment où une ligne de réfraction apparaît entre l'eau et le gel, ce qui signifie que le gel s'est coagulé (attendre encore 3 min de plus pour assurer une coagulation suffisante du

gel), l'eau supérieure a été jetée et un papier absorbant a été utilisée pour sécher la partie supérieure du gel.

- La méthode précédemment décrite a été utilisée pour préparer le gel supérieur à 4%. Au moment de l'utilisation, 30 μ l de 10% PAs et 5 μ l de TEMED ont été ajoutés et transférés immédiatement dans la cassette après avoir bien mélangé le tout. Dans l'espace restant sur la cassette, le gel supérieur a été ajouté et le peigne à 10 puits a été immédiatement inséré à l'intérieur du gel supérieur (s'assurer de l'absence de bulles).
- Après solidification du gel, le peigne a été retiré et la cassette de gel a été transférée dans une chambre. La chambre est remplie de tampon d'électrophorèse jusqu'au sommet. Ensuite les échantillons ont été chargés: 2 – 5 μ l d'un marqueur chargés dans le 1^{er} puits alors que les autres échantillons ont été distribués sur les autres puits selon l'ordre souhaité.
- Un micro-injecteur a été utilisé pour charger les échantillons. Après addition de chaque échantillon, l'aiguille du micro-injecteur est lavée 3 fois dans le tampon d'électrophorèse de la chambre, loin de la cassette afin d'éviter toute contamination des protéines.

⇒ *Électrophorèse*

La chambre a été transférée dans un réservoir rempli de tampon d'électrophorèse et la tension a été réglée à 80 volts pendant 30 min (S1) puis à 120 volts pendant 1h (S2).

⇒ *Transfert de gel*

Le transfert de la membrane a été fait sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF).

○ *Réaction immunologique*

• **Blocage**

Après avoir déterminé la localisation des protéines d'intérêt, la membrane a été découpée et bloquée dans une solution de BSA à 2% (0,4 g de BSA dans 20 ml de TBST) pendant 1h30 à température ambiante sous un agitateur.

- **Incubation avec le 1^{er} anticorps**

La membrane a été enlevée de la solution de blocage et un papier absorbant a été utilisé pour aspirer toutes les traces du liquide. La membrane a été ensuite incubée avec l'anticorps primaire dans 5% de BSA pendant 1h à température ambiante ou pendant une nuit à 4 °C accompagné de secousses régulières et lentes (la concentration optimale en anticorps doit être déterminée expérimentalement, la dilution 1:1000 est un bon point de départ).

- **Incubation avec le 2^{ième} anticorps**

Après l'incubation avec le 1^{er} anticorps, la membrane a été lavée 3 fois dans le TBST (10 min à chaque fois) sous un agitateur ensuite incubée avec le second anticorps à température ambiante pendant 1 – 2h. De nouveau et après incubation, la membrane a été lavée 3 fois dans le TBST (10 min à chaque fois) sous un agitateur. Les résultats ont été ensuite développés par la réaction de chimioluminescence.

⇒ *Développement et révélation*

Après lavage dans le TBST, la membrane a été incubée dans la solution de développement pendant 5 min à température ambiante.

La membrane a été séchée et le transfert a été analysé avec le programme informatique Quantity One.

2.9.Étude de l'essai de la DPT *in vivo*

2.9.1. Inoculation de xénogreffe tumorale

Les cellules utilisées pour la xénogreffe de tumeur du sein humain proviennent de culture cellulaire. Les cellules MDA-MB-231, à croissance exponentielle, ont été récoltées par trypsination puis centrifugées. Le surnageant est aspiré avant la remise en suspension du culot cellulaire dans un volume approprié de milieu L-15 exempt de sérum pour obtenir la concentration de travail finale. La suspension cellulaire a été conservée sur glace pilée jusqu'à utilisation, pour assurer la survie cellulaire.

Le modèle de xénogreffe de cancer du sein a été établi par une injection *sc.*, de $3 \times 10^6/100\mu\text{l}$ de cellules MDA-MB-231 dans le flanc droit. Après 7-10 jours de croissance, les tissus tumoraux ont été coupés en morceaux de 1 à 3 mm³ et implantés en *sc.* dans le flanc droit de chaque souris en utilisant un trocart. Après dix jours de croissance, les souris Nudes avec la tumeur implantée ont été dépistées pour le volume tumoral. Les souris porteuses de tumeurs ayant atteint un volume de 180 à 280 mm³ ont été sélectionnées. La taille de la tumeur a été évaluée en mesurant deux diamètres perpendiculaires de la tumeur (a, longueur, b, largeur), trois fois par semaine avec un pied à coulisse et le volume tumoral (VT) a été calculé selon la méthode développée par le INCa : $V = (a \times b^2)/2$ [206] (**Figure 18**).

2.9.2. Traitement des souris

Les souris porteuses de tumeurs ont été randomisées en 7 groupes (n = 6). Chaque groupe a été étroitement apparié avant le traitement, qui a commencé dix jours après la transplantation cellulaire. Les animaux ont été injectés par voie intraveineuse (*iv.*) (Injection dans la veine de la queue) avec: (1) un témoin (SSN), (2) un complexe d'inclusion de DPT-HP- β -CD (contenant 3,06% de DPT), (4) le VP-16 et le docétaxel (témoins positifs) (**Figure 18**).

La dose maximale tolérée du DPT-HP- β -CD chez des souris Nudes était de 20 mg/kg [72]. Le VP-16 et le docétaxel ont été utilisés à la dose de 20 mg/kg chacun, comme a été décrit dans notre travail précédent [207]. Le protocole d'administration de médicaments et de réactifs est résumé dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Protocole d'administration des médicaments et des réactifs.

No.	Groupes	Nombre des animaux	Voie d'administration	Doses (mg/kg)	Volume injecté (ml/20g)	Posologie
1	SSN*	12	<i>iv.</i>	-	0.4	3 fois/semaine x 3 semaines
2	HP- β -CD	6	<i>iv.</i>	-	0.4	
3	DPT-HP- β -CD (5mg/kg)	6	<i>iv.</i>	5	0.4	
4	DPT-HP- β -CD (10mg/kg)	6	<i>iv.</i>	10	0.4	
5	DPT-HP- β -CD (20mg/kg)	6	<i>iv.</i>	20	0.4	
6	VP-16	6	<i>iv.</i>	20	0.4	1 fois/semaine x 3 semaines
7	Docétaxel	6	<i>iv.</i>	20	0.4	

* SSN: Solution Saline Normale (0.9% chlorure de sodium).

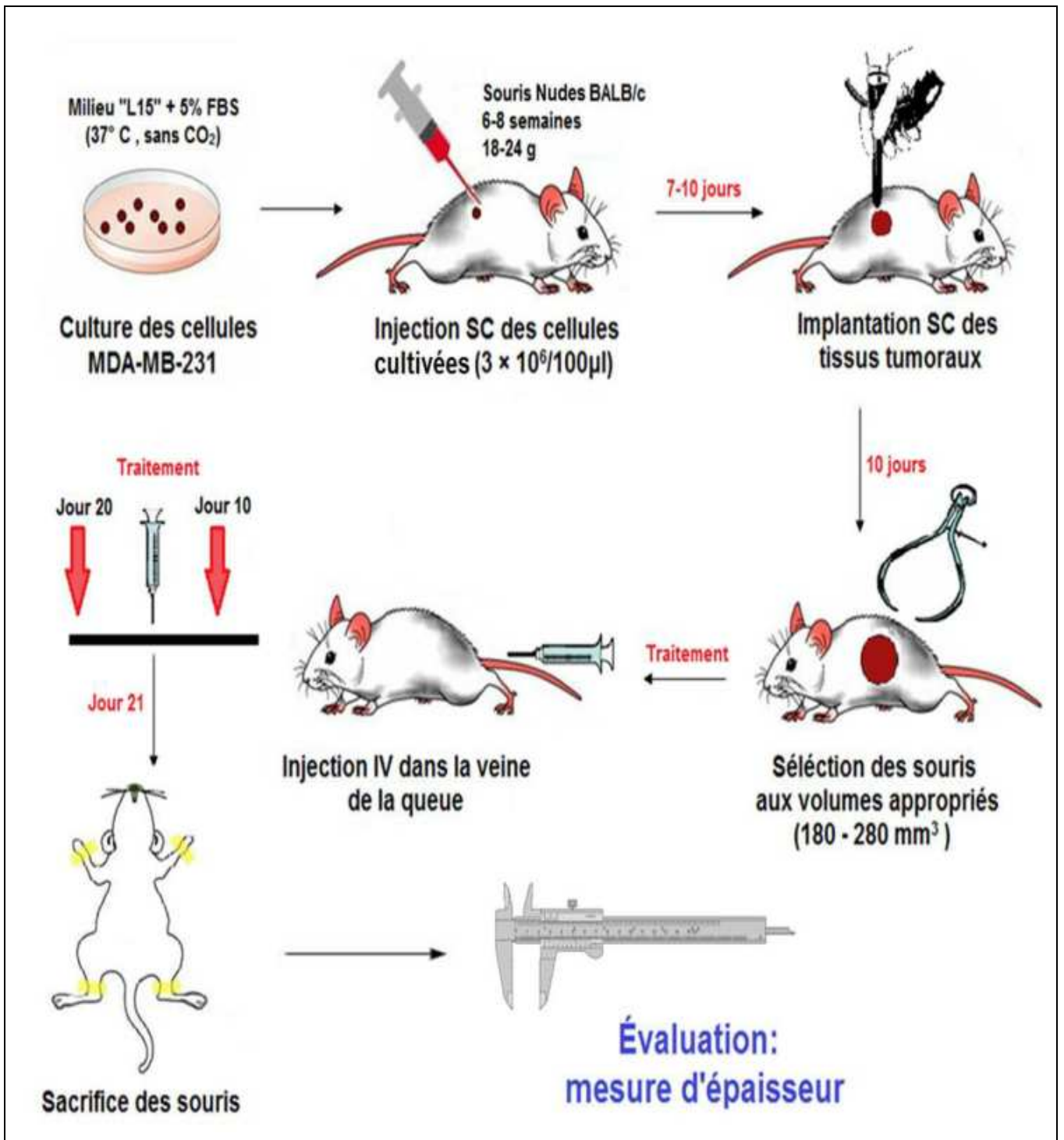


Figure 18. Inoculation de xénogreffe tumorale et traitement des souris Nudes BALB/c.

2.9.3. Évaluation de la croissance tumorale

Les effets de la DPT-HP- β -CD sur la courbe de croissance tumorale (T/C) ont été évalués en fonction de la valeur la plus faible de T/C (%) au cours de l'expérience, où T est la moyenne relative du poids de la tumeur du groupe traité et C, le poids tumoral relatif du groupe témoin à un moment donné. La croissance cinétique de l'activité antitumorale est considérée comme positive lorsque le T/C le plus faible est $\leq 40\%$ et la valeur $P < 0,05$, suivant les directives du Programme Thérapeutique pour le Développement (DTP) pour les tumeurs solides de la Division de Traitement et de Diagnostic du Cancer (DCTD) du INCa [208].

La T/C (%) est calculé selon la formule: $T/C (\%) = (T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100$ (T_{RTV} : volume tumoral relatif du groupe traité, C_{RTV} : volume tumoral relatif du groupe control). Le volume tumoral relatif (RTV) a été évalué en divisant le volume tumoral de différents jours d'observation par le volume tumoral de départ.

Les souris ont été sacrifiées le 21^{ème} jour après le traitement initial. Le taux d'inhibition de la croissance tumorale (TI) est également utilisé comme test de référence et calculé comme suit: $TI (\%) = (\text{Poids tumoral du groupe témoin} - \text{Poids tumoral du groupe traité}) / \text{Poids tumoral du groupe témoin} \times 100\%$. Les $TI \geq 60\%$ avec $P < 0,05$ sont considérés comme statistiquement significatifs.

2.10. Analyses statistiques

Pour les expériences *in vitro*, Les résultats ont été exprimés en médiane \pm déviation absolue médiane (MAD) de trois expériences distinctes. Les différences statistiques entre les groupes témoins et les groupes traités ont été déterminées par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis dans le cas de groupes inégaux ou par le test non-paramétrique de Friedman dans le cas des groupes appariés.

Pour les expériences *in vivo*, les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM). Les différences statistiquement significatives ont été évaluées par le test de Mann Whitney, un test non-paramétrique.

Dans toutes les expériences, le seuil de significativité était une valeur de $P < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

1. La DPT exerce des effets antiprolifératifs sur les cultures des lignées cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231

Durant le test au CCK-8, les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été exposées à différentes concentrations de DPT dans une plage de 1 nM à 1 mM pendant une période de 72 h. Ces concentrations ont été choisies après quelques expériences initiales de détermination du panel de concentration (résultats non représentés). Les résultats de ce test sont résumés dans le **Tableau 4**. Le taux d'inhibition de la croissance cellulaire a été défini par rapport au groupe témoin.

Tableau 4. Les valeurs CI_{50} obtenues dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain après traitement par la DPT et le VP-16.

Lignées cellulaires	CI_{50} DPT (nM) ^a	CI_{50} VP-16 (nM) ^a	CI_{50} VP-16 / CI_{50} DPT
MCF-7	10.91 ± 3.1	18580 ± 1900	1703.02
MDA-MB-231	20.02 ± 0.9	28680 ± 6300	1432.57

^a Les valeurs de CI_{50} , exprimées en nM, sont la médiane ± MAD de trois expériences indépendantes.

Comme le montre la **Figure 19**, avec les doses croissantes de la DPT, les taux d'inhibition de la prolifération des cellules traitées augmentent graduellement par rapport aux cellules non traitées (groupe PBS). Ainsi, nous avons observé que la DPT inhibait la croissance des cellules tumorales d'une manière dose-dépendante. De plus, la DPT a significativement réduit la prolifération des cellules MCF-7 (**Figure 19.A**) et MDA-MB-231 (**Figure 19.B**) à des concentrations très faibles de CI_{50} (10.91 nM et 20.02 nM, respectivement) comparativement à celle du témoin positif (18.58 μ mol/L (μ M) et 28.68 μ M, respectivement).

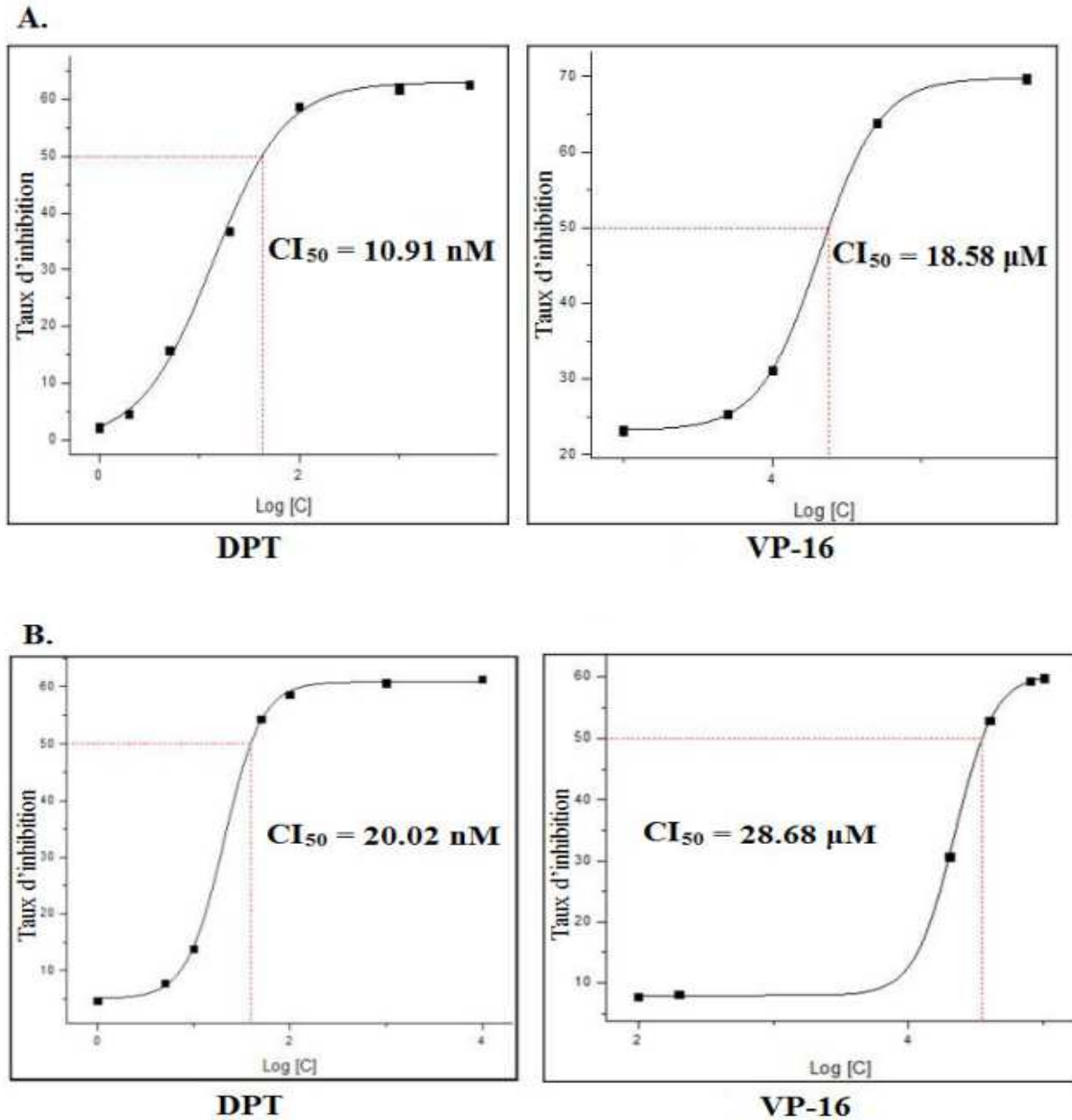


Figure 19. Analyse de la prolifération cellulaire des cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) par la méthode CCK-8 après traitement par la DPT: Ensuite, elles ont été soit laissées sans traitement (témoin) soit traitées avec différentes concentrations de la DPT (1 nM – 1 mM) et de VP-16 (témoin positif) pendant 72h. Après traitement, le CCK-8 a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 1 – 4h supplémentaires à 37 °C. La DO dans les puits témoins et les puits traités a été mesurée à 450 nm avec le lecteur de microplaques 680-BioRad. Chaque concentration a été utilisée en triple. Les courbes représentent la moyenne du taux d'inhibition de la croissance suivant le logarithme de la concentration du traitement. Le taux d'inhibition de la croissance représente le rapport de l'intensité d'absorbance des puits traités par des médicaments à l'intensité d'absorbance des puits non traités (témoin négatif).

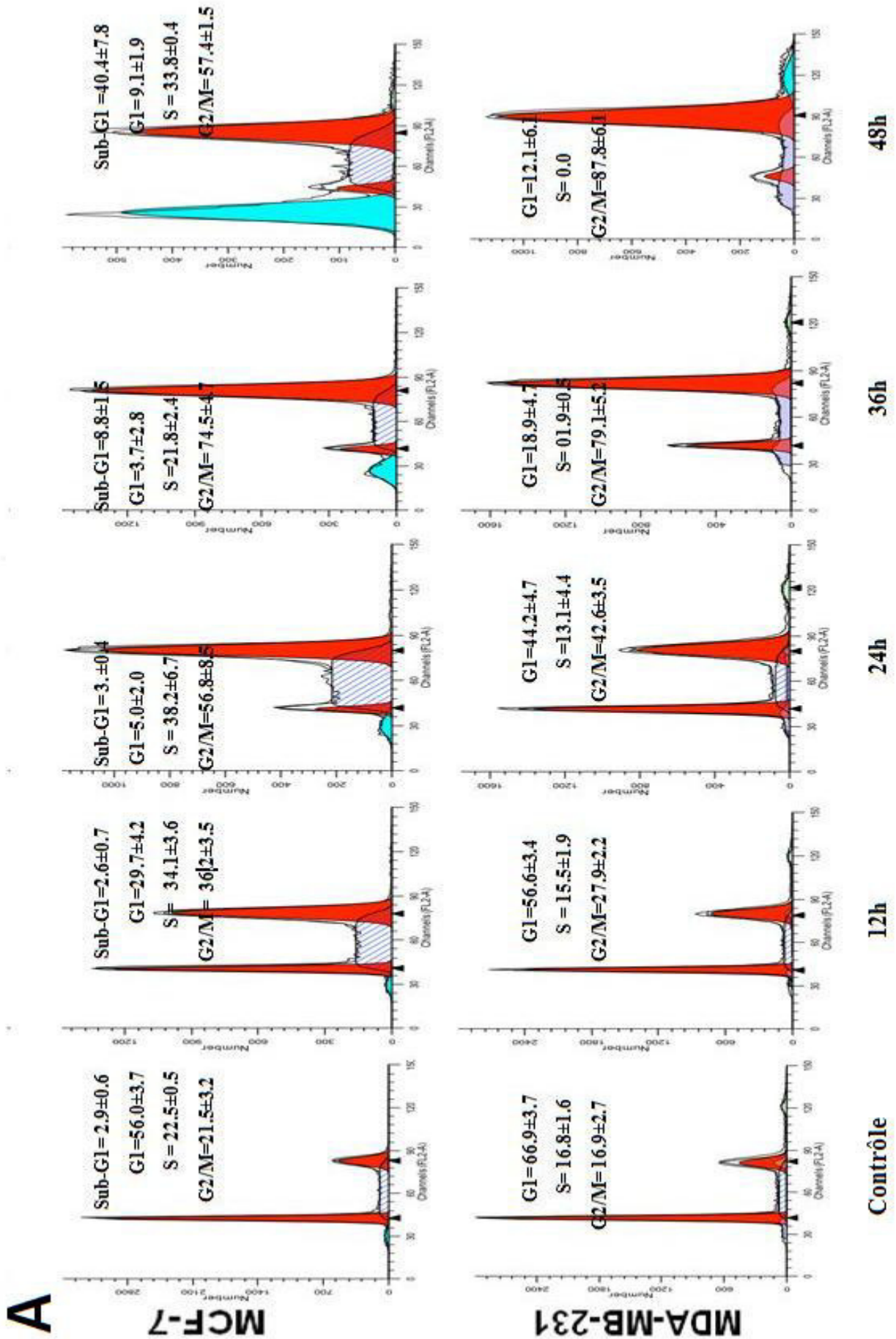
2. La DPT induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231

Dans le cancer, des altérations fondamentales dans le contrôle génétique de la division des cellules cancéreuses ont été observées, ce qui entraîne une prolifération cellulaire non réprimée [105]. Ainsi, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire a été considérée comme une cible importante pour le traitement du cancer [209]. Pour élucider si l'effet inhibiteur de la croissance par la DPT était dû à l'arrêt du cycle cellulaire, une analyse par cytométrie de flux a été réalisée.

L'exposition à 5, 10 et 20 nM de DPT pendant 12 – 48h était suffisante pour induire une interruption importante du cycle cellulaire de manière dose-dépendante et temps-dépendant dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (**Figure 20**).

Le traitement des cellules par la DPT a provoqué une inhibition de la progression du cycle cellulaire après 12h, ce qui a entraîné une augmentation du pourcentage de cellules à la phase G2/M accompagné d'une diminution concomitante de la population cellulaire en phase G1 par rapport aux cellules témoins non traitées, ce qui suggère que l'effet inhibiteur renforcé de la DPT sur les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 est le résultat d'un blocage au cours de la phase G2/M.

Après 48h d'exposition à 20 nM de DPT, le pourcentage de cellules MDA-MB-231 dans la fraction G2/M a augmenté de 5.2 fois contre 2.67 fois dans la lignée cellulaire MCF-7 en comparaison avec les cellules témoins, respectivement (**Figure 20**). La fraction des cellules MDA-MB-231 en phase G1 a diminué de 66.9% à 12.1% et de 16.8% à 0.0% en phase S tandis que la fraction en phase G2/M est passée de 16.9% à 87.8%. Dans les mêmes conditions, le nombre des cellules MCF-7 en phase G1 a diminué de 56% à 9.1%, de 22.5% à 33.8% en phase S et de 21.5% à 57.4% en phase G2/M. Basé sur les résultats présentés ci-dessus, d'autres investigations ont été effectuées pour obtenir plus de détails sur la relation concentration-effet de la DPT.



B

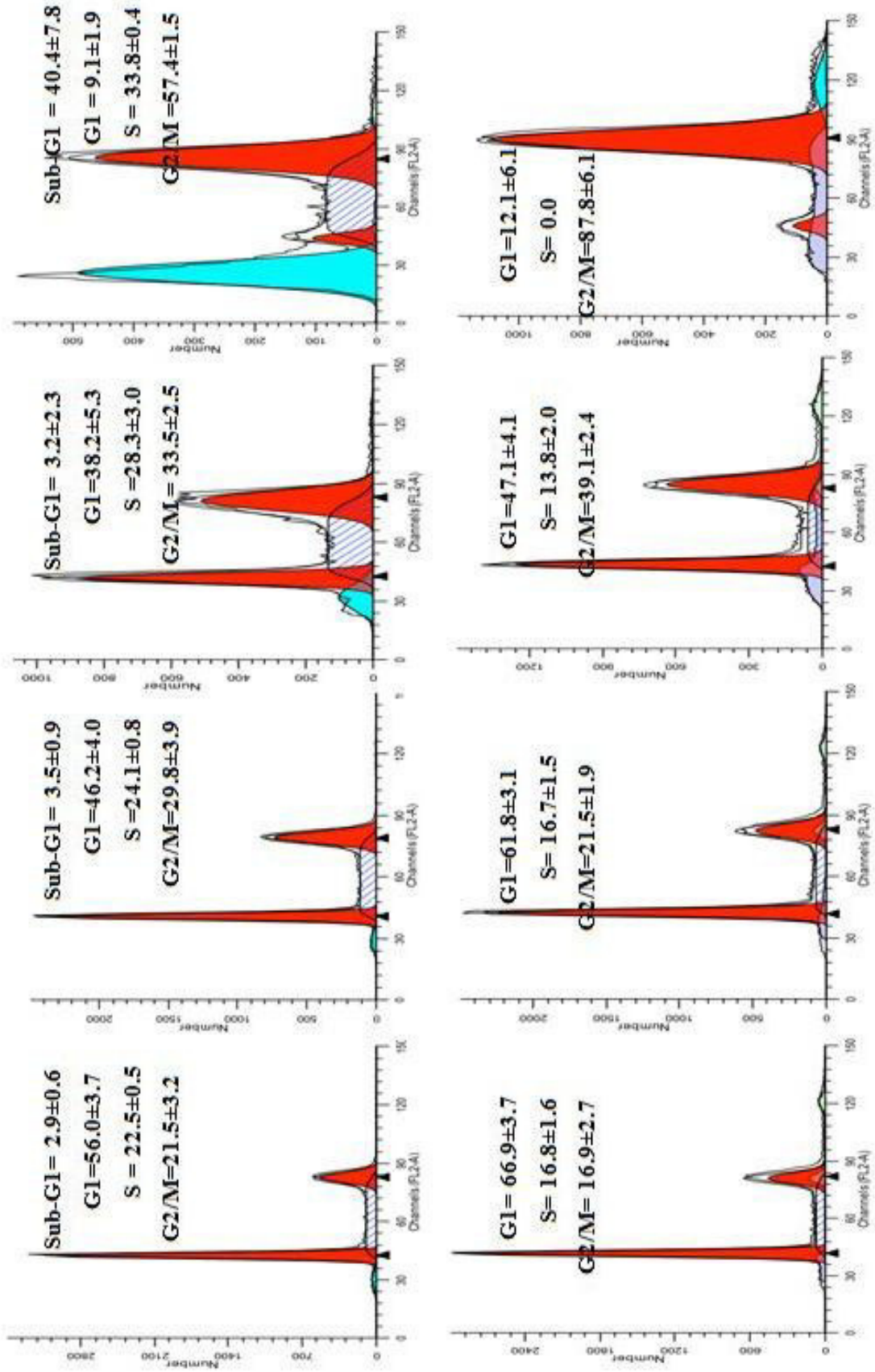
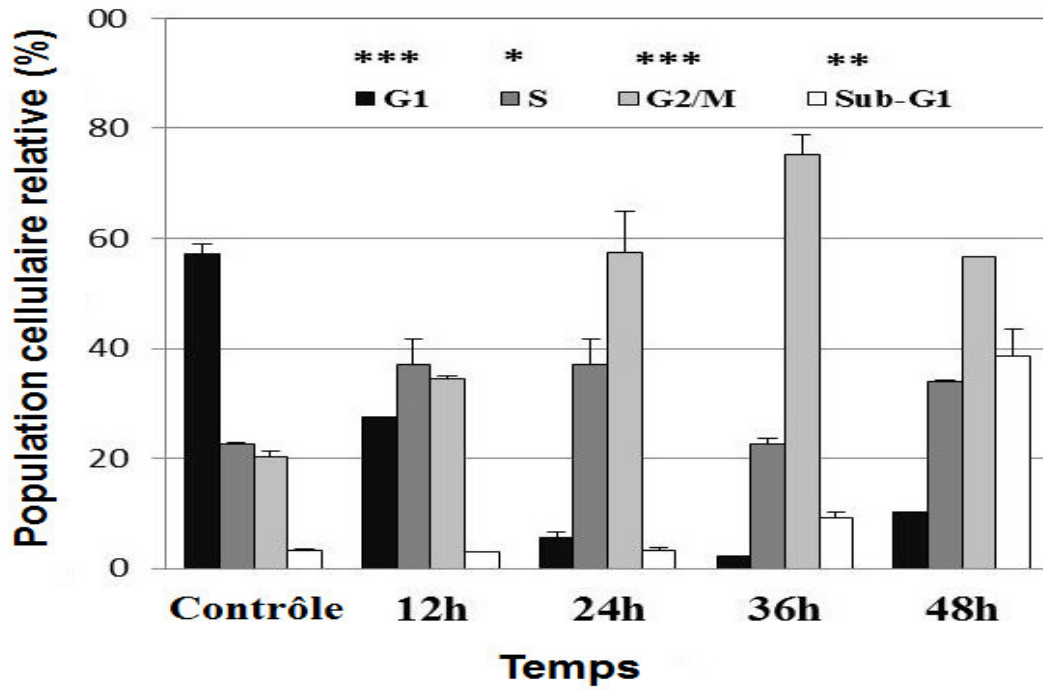


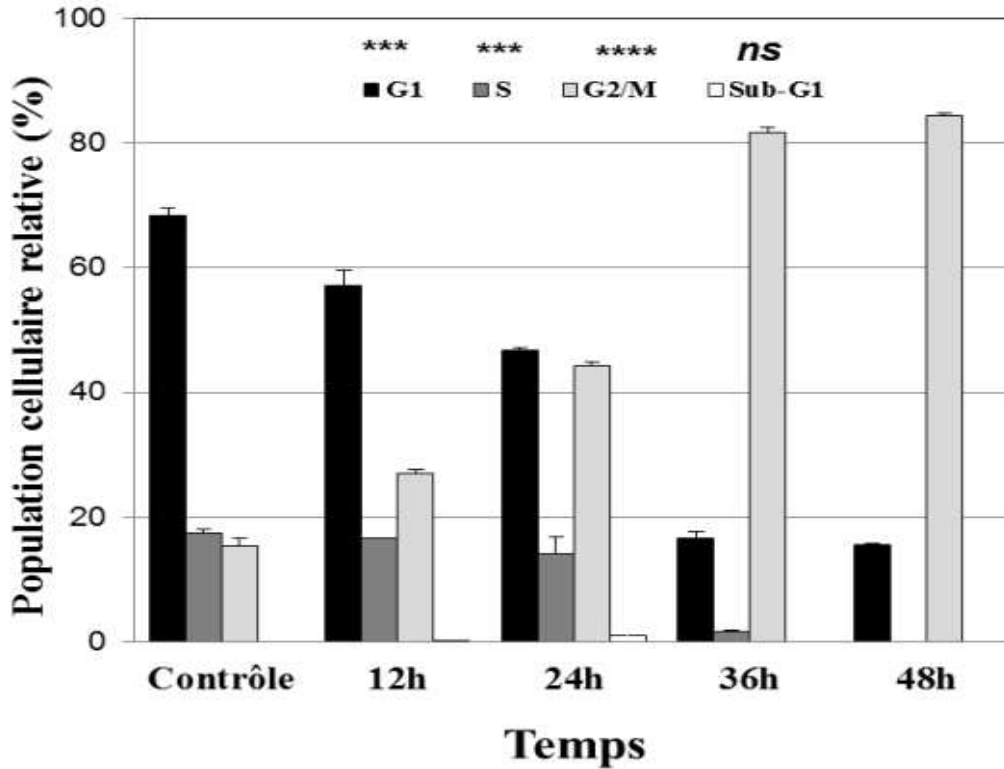
Figure 20. Effet dose et temps dépendants de la DPT sur la progression du cycle cellulaire des lignées cellulaires de cancer du sein. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 étaient soit non traitées (témoin), soit traitées avec: 20 nM de DPT pendant 12 – 48h (**A**) ou avec 5 – 20 nM de DPT pendant 48h (**B**). Après traitement, les cellules ont été récoltées, colorées avec du PI et ensuite analysées par cytométrie de flux. L'axe des « y » indique le nombre de cellules et l'axe des « x » représente la teneur en ADN. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la population cellulaire dans la phase sub-G1, G1, S et G2/M du cycle cellulaire. Les pourcentages de chaque phase dans le cycle cellulaire représentent les médianes \pm MAD de trois expériences indépendantes.

De nouveau, les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été exposées à 5, 10 et 20 nM de DPT pendant 48h. Les résultats ont montré que la DPT provoquait une accumulation dose-dépendante prononcée dans la phase G2/M du cycle cellulaire atteignant un plateau aux doses de 10 et 20 nM accompagnée d'une diminution parallèle de la population en phase G1 (**Figure 21B**). En outre, la population sub-G1, indicateur d'apoptose cellulaire, a été détectée à différentes concentrations et durées de temps dans les cellules MCF-7 où des petits fragments d'ADN dans la phase sub-G1 ont augmenté de 2.6% à 3.3%, 8.8% et 40.4% après 12, 24, 36 et 48h d'exposition à la DPT, respectivement. Cependant, La fraction apoptotique de sub-G1 n'a pas augmenté dans les cellules traitées de la lignée MDA-MB-231, lorsqu'elles ont été évaluées par rapport au témoin, ce qui suggère que seule la progression du cycle cellulaire a été significativement affectée dans ces cellules. Les distributions du cycle cellulaire sont représentées par des histogrammes dans la **Figure 21**.

A



B



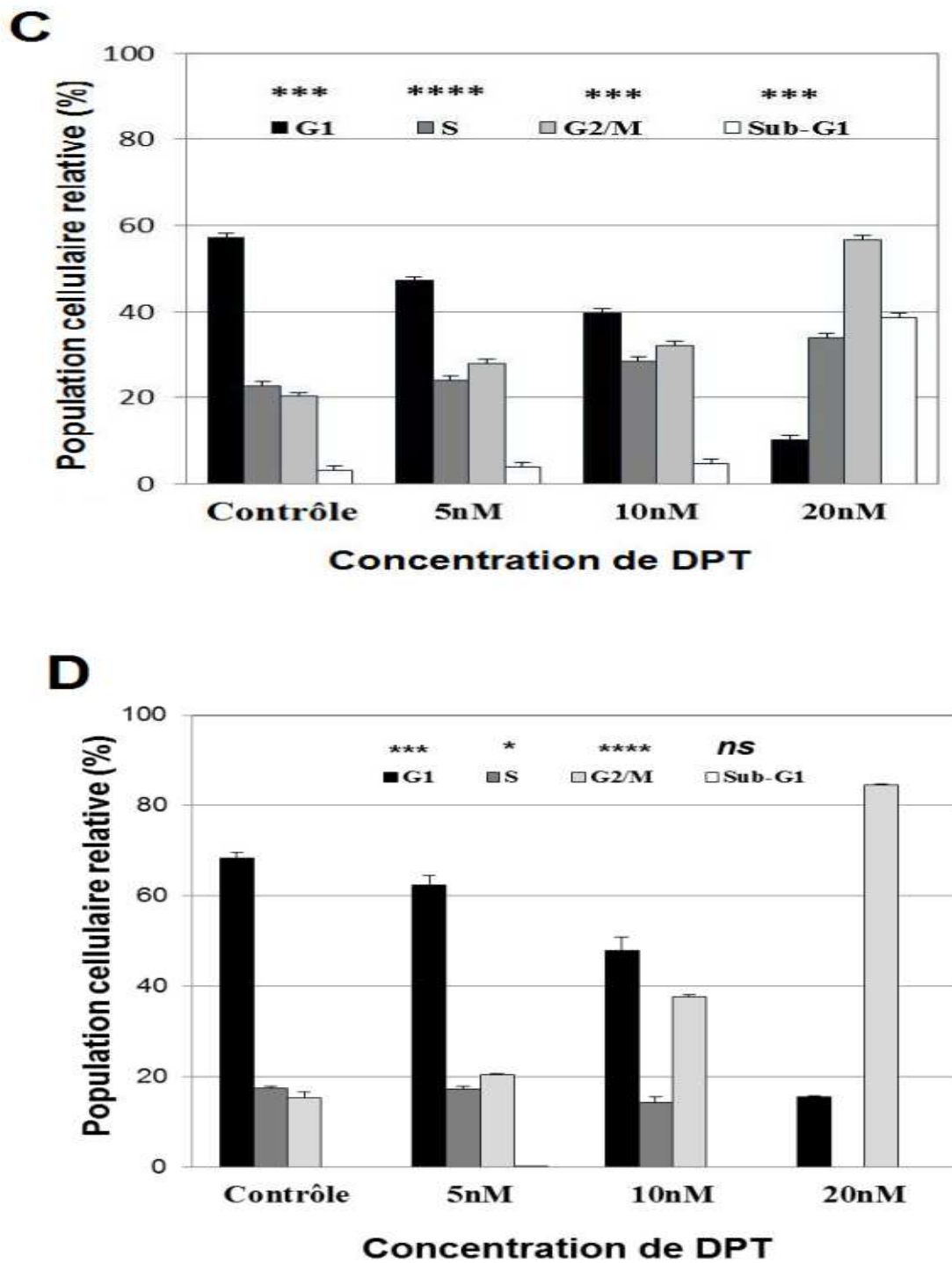


Figure 21. Analyse des données recueillies à partir de l'étude de l'action de la DPT sur la progression du cycle cellulaire des cellules MCF-7 (A et C) et MDA-MB-231 (B et D). Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 étaient soit non traitées (témoins), soit traitées avec 20 nM de DPT pendant 12 – 48h (A et B) ou avec 5 – 20 nM de DPT pendant 48h (C et D). Chaque barre représente la médiane \pm MAD des données de trois expériences indépendantes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3. La DPT induit des changements dans l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire dans les cellules tumorales

L'activité de la DPT est étroitement couplée à la progression du cycle cellulaire car l'analyse du cycle cellulaire a révélé que la DPT induisait un arrêt en phase G2/M. Pour confirmer davantage cette découverte, nous avons examiné si le traitement par la DPT modifiait l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire, comme la cycline B1, la cdc25c et la CDK1 durant 48h (**Figure 22**). La β -actine, un gène domestique, a été utilisée comme témoin de charge. Dans les cellules MCF-7, le taux de la cycline B1 augmente après traitement par la DPT. Cependant, la CDK1, qui se combine avec la cycline B1 dans le contrôle de la phase G2/M, ainsi que l'expression de la cdc25c, a considérablement diminué après 24h de traitement. D'autre part, la DPT a régulé à la baisse l'expression de la cdc25c et de la cycline B1 dans les cellules MDA-MB-231, alors qu'aucun changement détectable n'a été observé dans l'expression de la CDK1.

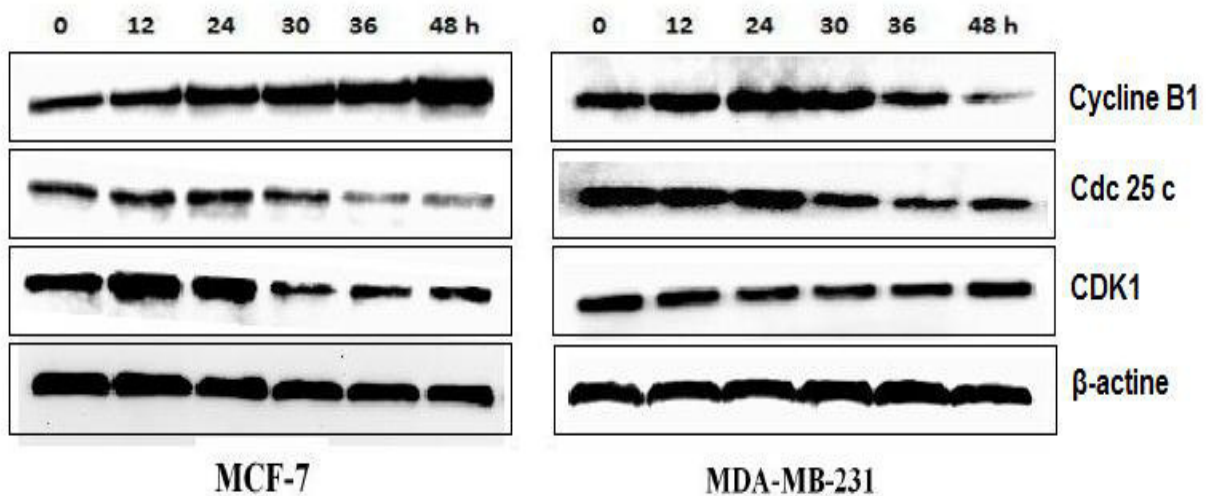


Figure 22. Effet temps-dépendant de la DPT sur l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses du sein humain. Les cellules ont été exposées à 20 nM de DPT et incubées pendant différentes durées de temps. Ensuite, les taux d'expression de la cycline B1, cdc25c, CDK1 et β -actine dans les lysats cellulaires totaux ont été déterminés par analyse Western Blot. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

4. La DPT induit des changements morphologiques dans les cellules cancéreuses

Pour obtenir un aperçu initial des effets de la DPT sur la morphologie cellulaire, une évaluation par microscopie optique a révélée des différences dans la morphologie cellulaire entre les cellules traitées par la DPT et les cellules témoins.

Le changement le plus évident qui a été observé dans les cellules MCF-7 traitées comprenait un rétrécissement cellulaire et un détachement étendu des cellules du substrat de la culture cellulaire. Les cellules MCF-7 traitées contenaient des noyaux fragmentés et leur densité cellulaire diminuait de façon spectaculaire en fonction du temps (**Figure 23**). Ces changements, caractéristiques de la mort apoptotique cellulaire ainsi que d'une adhérence réduite, sont devenus plus remarquables après 24h d'incubation avec la DPT (20 nM) ce qui pourrait indiquer la possibilité de l'apparition d'apoptose sur ces cellules après traitement par la DPT.

Cependant, l'effet de la DPT sur la morphologie des cellules MDA-MB-231 était moins puissant dans les mêmes conditions. Les cellules devenaient plus petites et arrondies, cependant, aucun rétrécissement ou signe de mort cellulaire n'a été observé (**Figure 23**).

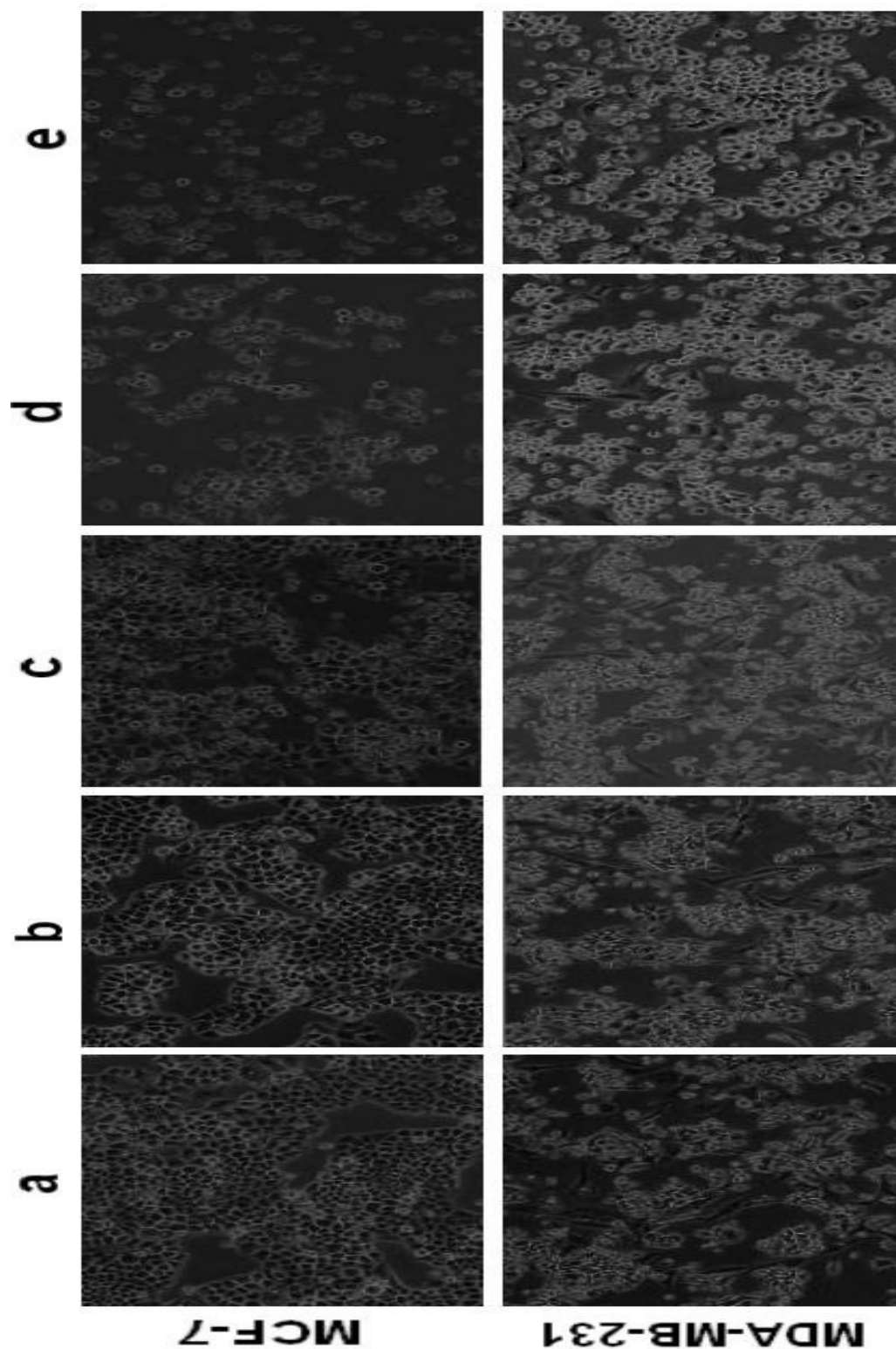


Figure 23. Modifications morphologiques des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 après traitement avec la DPT. Les cellules ont été cultivées dans des microplaques à 6 puits dans des conditions témoins (a) ou en présence de 20 nM de DPT pendant 12 – 48h (b – e). La morphologie cellulaire a été observée en microscope inversé à contraste de phase (200 ×).

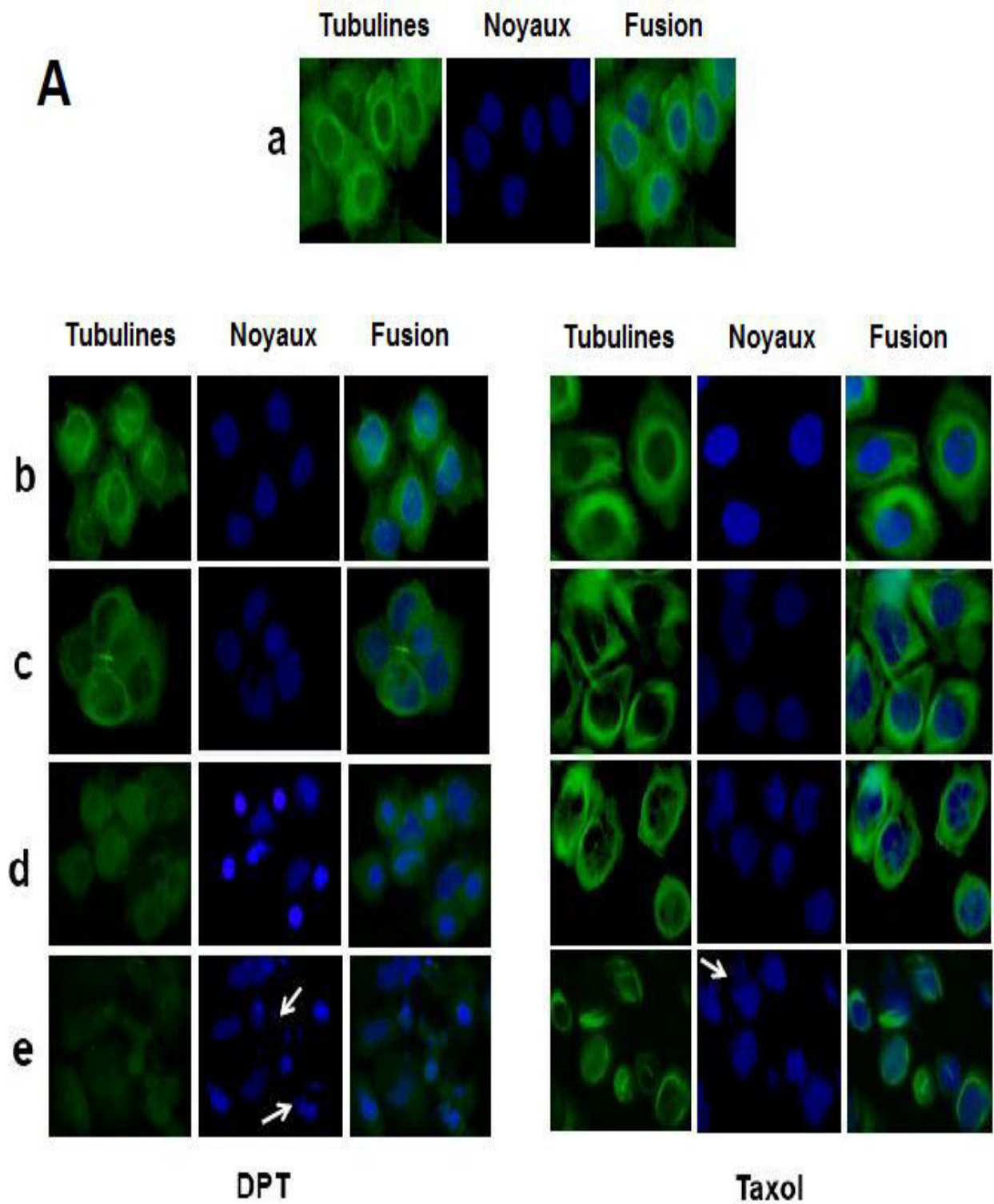
5. La DPT inhibe la polymérisation des tubulines

Pour évaluer si la DPT possède un effet sur la tubuline, des modifications possibles dans le cytosquelette ont été recherchées. Par conséquent, une coloration par immunofluorescence indirecte utilisant un anticorps anti-tubuline a été réalisée.

Tandis que le Taxol, un agent de stabilisation des microtubules [210], hypostabilisait des microtubules polymérisés et montrait un réseau distinctif de microtubules, la DPT provoquait une perturbation significative du cytosquelette de tubulines caractérisée par une dépolymérisation des microtubules cellulaires dans les cellules tumorales durant les 48h du traitement (20 nM) (**Figure 24A et B**).

Les cellules témoins présentaient un agencement normal des tubulines et des faisceaux allongés de microtubules (**Figure 24A.a et B.a**). Conformément aux résultats ci-dessus, la coloration au Hoechst a montré que les cellules MCF-7 traitées (20 nM) présentaient des changements morphologiques élevés dans lesquels les cellules se rétrécissaient, devenaient arrondies et contenaient des noyaux fragmentés après 48h de traitement, comme indiqué par des flèches blanches (**Figure 24A**).

Cependant, les cellules non traitées et les cellules MDA-MB-231 traitées présentaient des noyaux morphologiquement normaux et colorés en bleu pâle (**Figure 24A et B**).



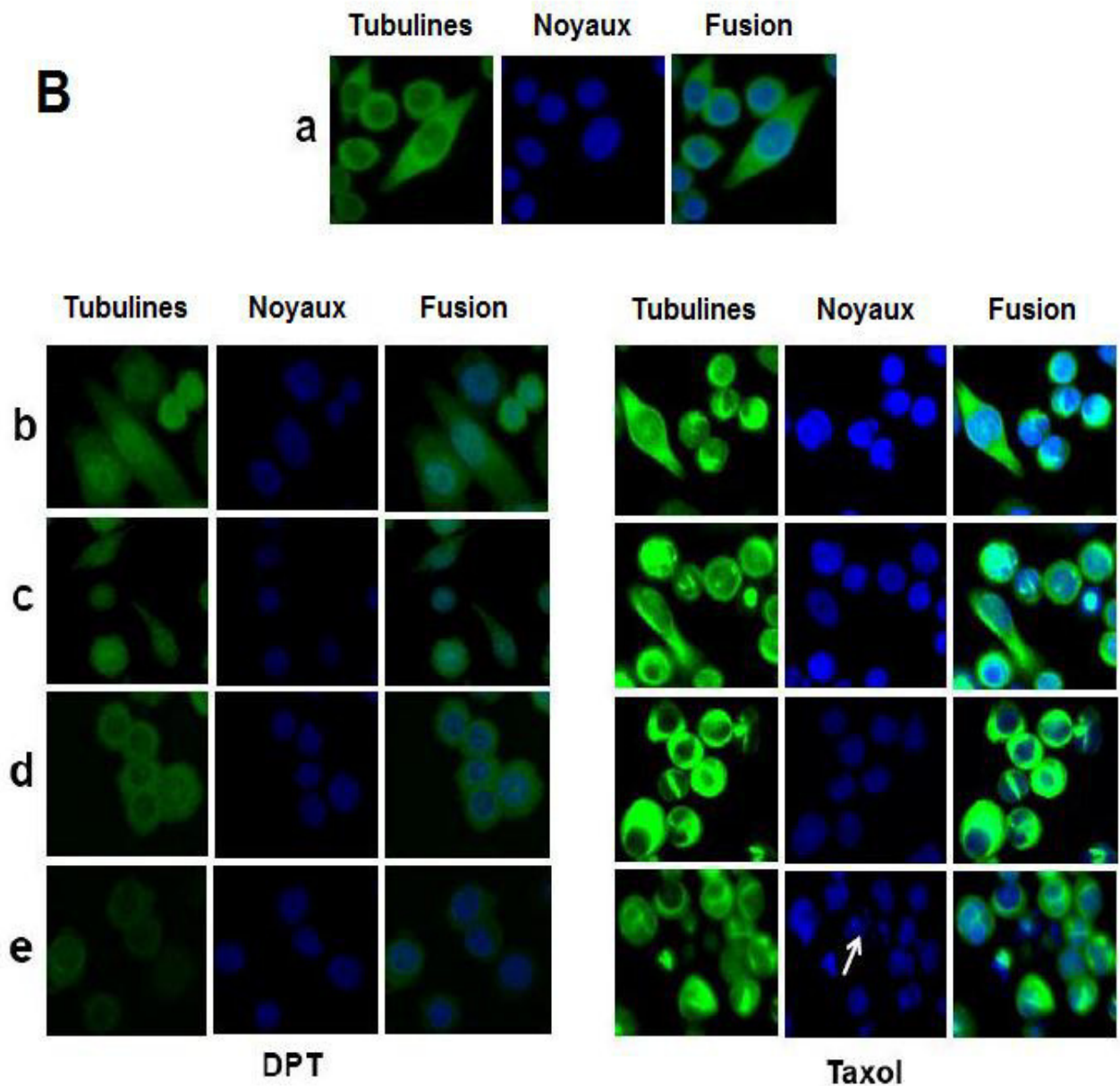


Figure 24. Effet de la DPT sur la polymérisation des tubulines. Les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231(B) ont été cultivées sur des lamelles, à 37 °C en absence (a: témoin négatif) ou en présence de DPT (20 nM) ou de Taxol (témoin positif) pendant 12 à 48h (b – e). Les microtubules (verts) ont été colorés par incubation pendant une nuit avec un anticorps anti-tubuline et ensuite avec un anticorps secondaire conjugué à Alexa-Fluor 488 pendant 30 min. L'ADN chromosomique a été coloré avec le Hoechst 33258 (bleu). La DPT perturbe la polymérisation de la tubuline dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Des cellules apoptotiques avec des noyaux condensés ont été observées dans des cellules MCF-7 traitées par la DPT. Les flèches indiquent des noyaux fragmentés de cellules apoptotiques. Les images ont été capturées par microscope inversé à fluorescence.

6. La DPT déclenche l'apoptose des cellules MCF-7

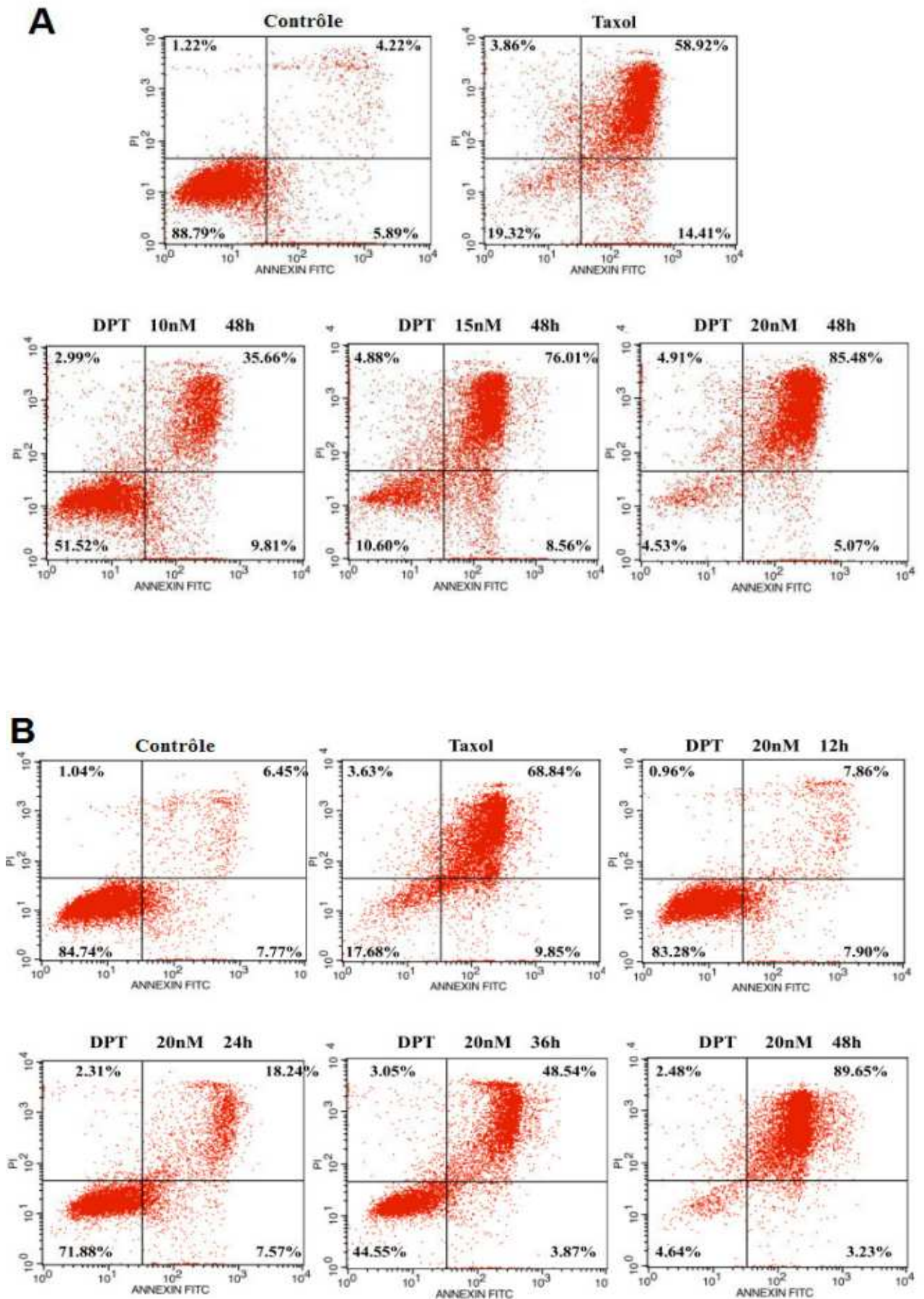
Afin d'élucider si l'effet antiprolifératif de la DPT était associé à l'apoptose, les cellules traitées ont été soumises à une analyse de cytométrie de flux avec la double coloration Annexine V-FITC/PI.

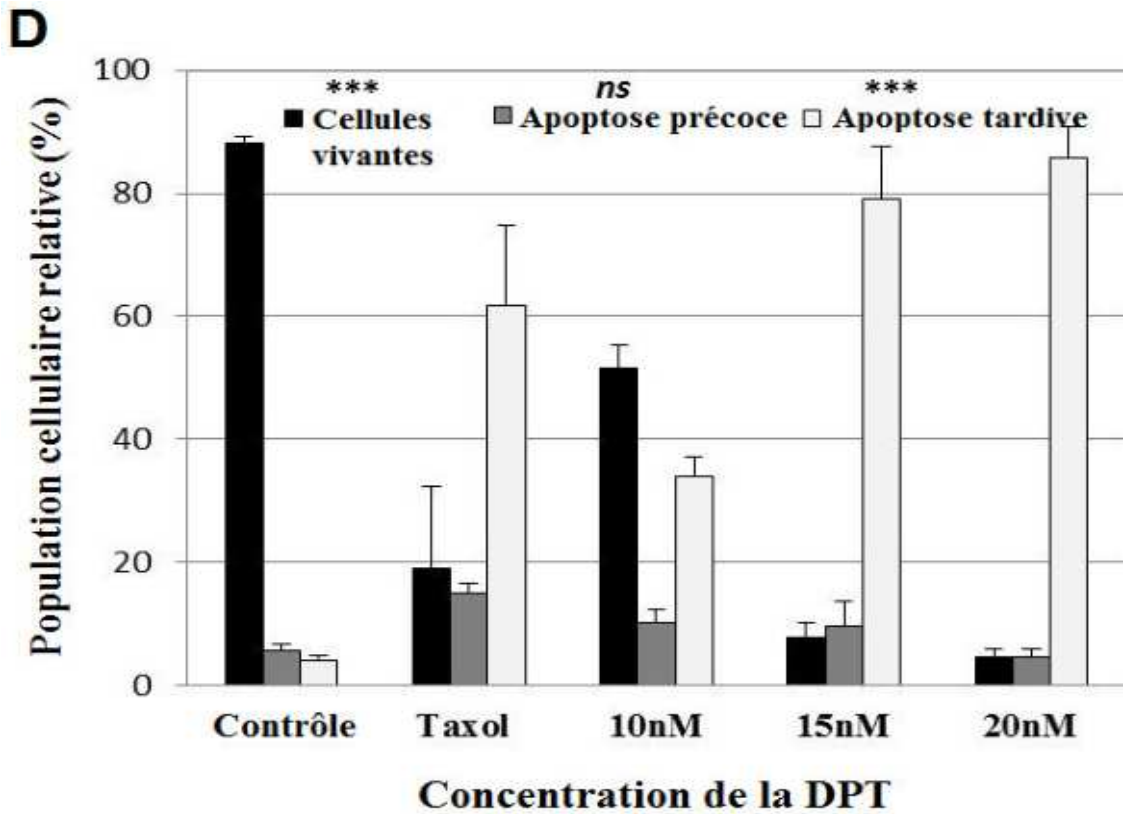
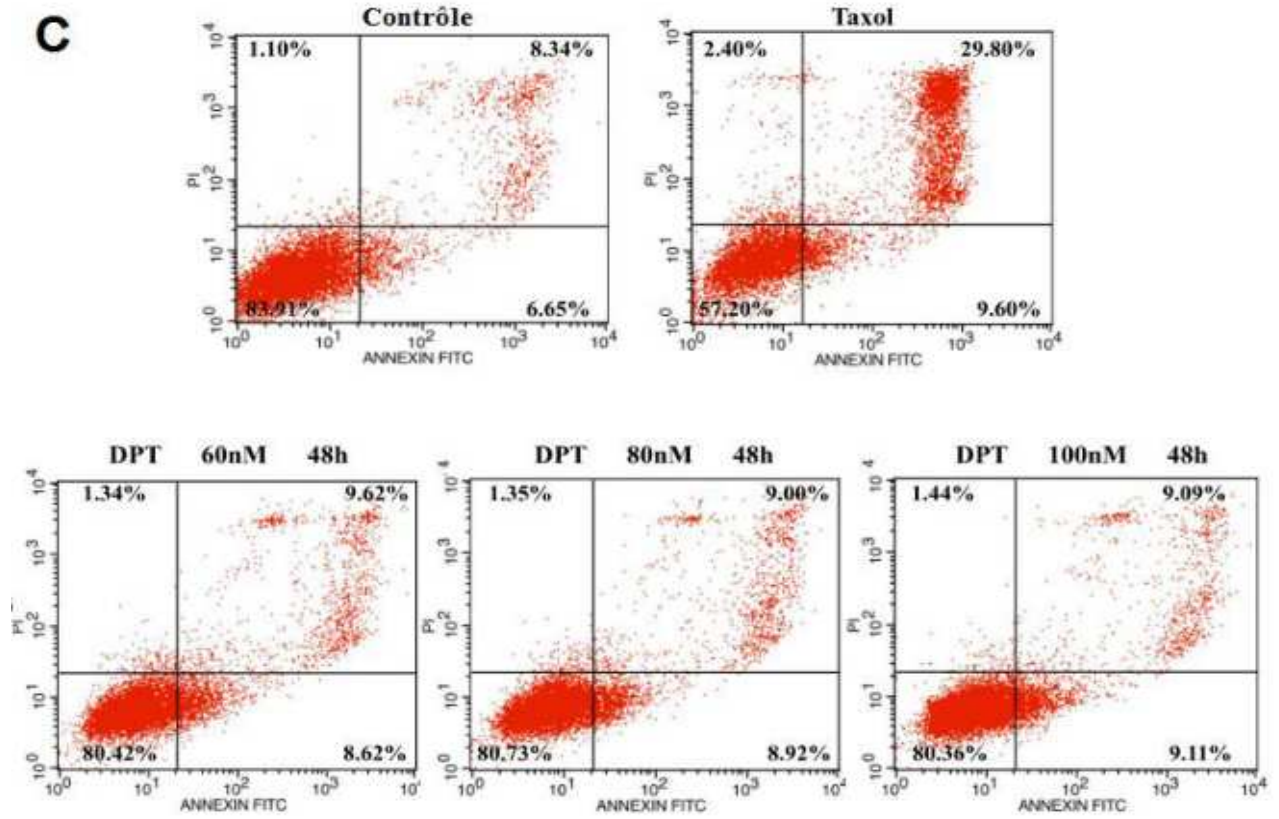
Dans les cellules MCF-7, nous avons trouvé que l'exposition à la DPT favorise à la fois l'apoptose précoce et l'apoptose tardive d'une manière dose-dépendante. Comme le montrent les **Figures 25A et 25D**, les cellules MCF-7 traitées avec 10, 15 et 20 nM de DPT pendant 48h ont donné approximativement 35%, 76% et 85% de cellules apoptotiques totales, respectivement, comparativement à 4% dans les cellules témoins. L'augmentation de la population apoptotique est compatible avec l'augmentation de la population sub-G1 observée dans l'analyse du cycle cellulaire.

De plus, la DPT induisait une apoptose cellulaire temps-dépendante dans les MCF-7 après 20 nM de traitement pendant 12 – 48h. Ainsi, le traitement à 24h a entraîné une transformation importante des cellules vivantes non apoptotiques en cellules apoptotiques tardives (18.24%). Au bout d'un traitement de 48h, l'apoptose totale est devenue plus prononcée et les cellules apoptotiques augmentaient jusqu'à environ 89% en même temps qu'une diminution des cellules vivantes non apoptotiques (4.64%) (**Figures 25B et E**).

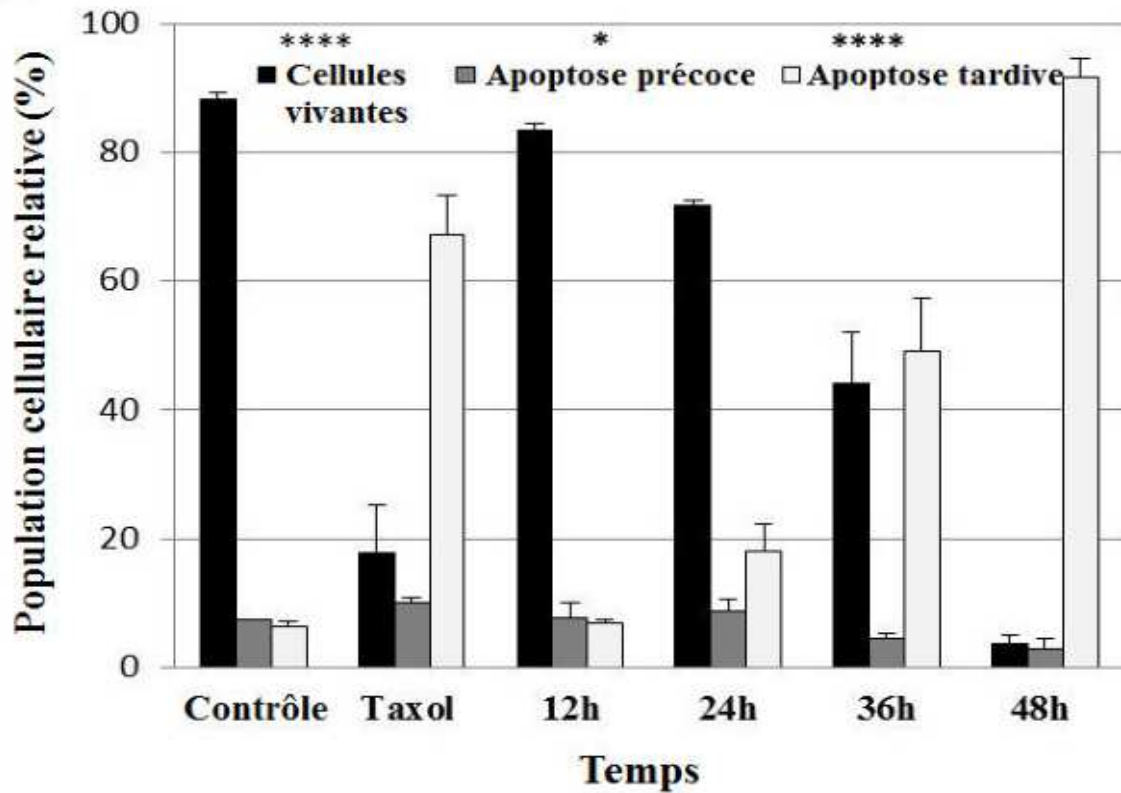
Dans les cellules MDA-MB-231, différentes concentrations de DPT (3 – 5 fois la valeur CI_{50}) ont été utilisées. Cependant, aucune différence significative dans les proportions des cellules non apoptotiques et celles des cellules en phase précoce et tardive de l'apoptose n'a été observée après 48h de traitement, comparativement au témoin (**Figure 25C et F**).

Les données obtenues sont résumées dans les **Tableaux 5 et 6**.





E



F

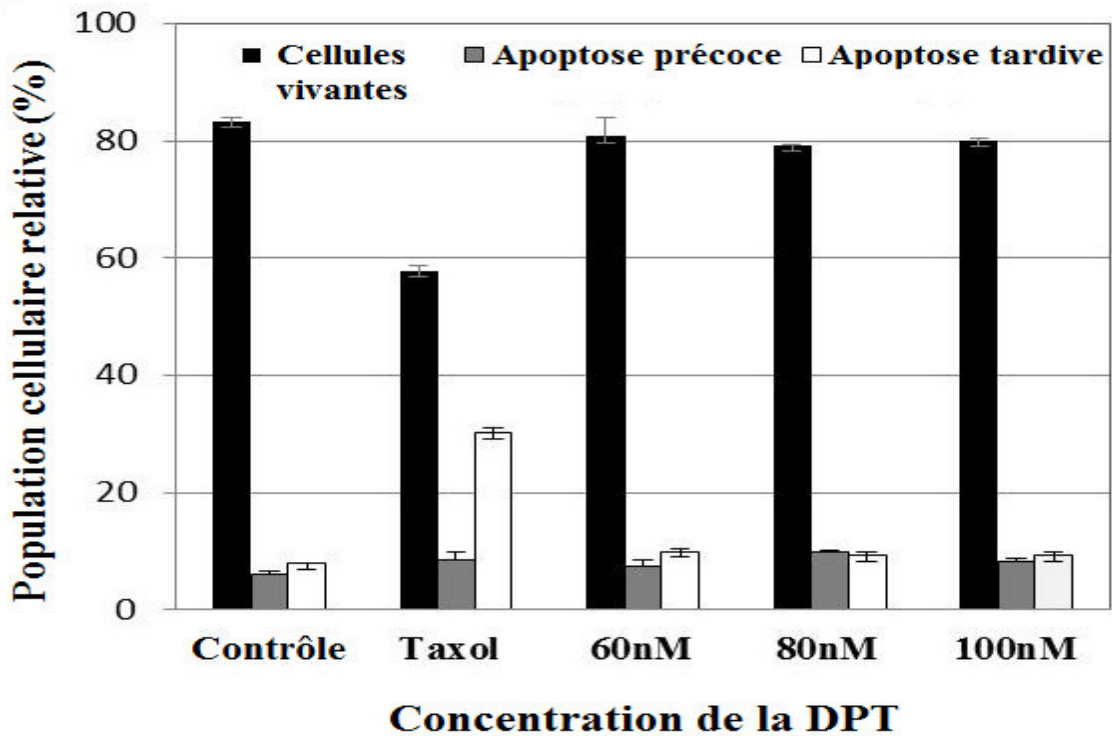


Figure 25. Analyse en cytométrie de flux par la double coloration Annexine V-FITC/PI.

Les cellules MCF-7 ont été soit non traitées soit traitées pendant 48h avec 10, 15 et 20 nM de DPT (A) ou traitées avec 20 nM de DPT pendant 12 – 48 h (B). Les cellules MDA-MB-231 n'ont pas été traitées ou bien ont été traitées pendant 48h avec 60, 80 et 100 nM de DPT (C). Le Taxol est le témoin positif. Les cellules collectées ont été soumises à une coloration puis analysées avec un cytomètre de flux. Les cellules non traitées étaient essentiellement Annexine V-FITC et PI négatives, indiquant qu'elles étaient viables et ne subissaient pas d'apoptose. Après le traitement, il y avait principalement deux populations de cellules: des cellules en phase précoce d'apoptose (Annexine V-FITC positive et PI négative) et des cellules en phase tardive d'apoptose (Annexine V-FITC positive et PI positive). Le pourcentage de cellules apoptotiques est indiqué. Les 'dot-blots' montrent les résultats d'une des trois expériences réalisées. Les histogrammes représentatifs (D) (E) et (F) montrent les fractions des cellules vivantes et des cellules au stade précoce et tardif de l'apoptose des cellules MCF-7 (D, E) et MDA-MB-231 (F). Les données numériques sont présentées sous forme de médiane ± MAD (n = 3). Les tests de Friedman (E) et de Kruskal-Wallis (D et F) ont été utilisés pour comparer la répartition des échantillons entre les groupes: ns > 0.1, * P ≤ 0.1, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001, **** P ≤ 0.0001.

Tableau 5. Test de l'Annexine V/PI après 48h de traitement des MCF-7 et MDA-MB-231 par la DPT

Lignées cellulaires		Contrôle	Taxol*	DPT		
				10 nM	15 nM	20 nM
MCF-7	Cellules vivantes	88.79±1.70	22.81±19.32	51.52±3.87	10.60±6.85	4.53±1.33
	Cellules en phase précoce d'apoptose	5.89±1.37	14.41±2.51	9.81±2.59	8.56±5.55	5.07±2.33
	Cellules en phase tardive d'apoptose	4.22±0.78	58.92±17.51	35.66±5.99	76.01±13.2	85.48±5.36
MDA-MB-231				60 nM	80 nM	100nM
	Cellules vivantes	83.91±1.42	63.06±0.06	80.42±3.79	80.73±2.80	80.36±0.88
	Cellules en phase précoce d'apoptose	6.65±1.20	3.19±1.01	8.62±2.89	8.92±1.83	9.11±1.93
	Cellules en phase tardive d'apoptose	8.34±0.81	24.21±4.16	9.62±0.93	9.00±0.99	9.09±0.85

* Contrôle positif (Taxol à 100nM pour les cellules MCF-7 et 0.5µM pour les cellules MDA-MB-231). Les résultats (donnés en %) sont la médiane ± MAD de trois expériences indépendantes.

Tableau 6. Test de l'Annexine V/PI après 12 – 48h de traitement des MCF-7 par la DPT (20 nM)

Lignées cellulaires	Contrôle	Taxol*	DPT				
			12h	24h	36h	48h	
MCF-7	Cellules vivantes	84.74±0.80	17.68±7.66	83.28±1.19	71.88±0.89	44.55±8.85	4.64±3.29
	Cellules en phase précoce d'apoptose	7.77±0.59	9.85±1.17	7.90±2.51	7.57±3.80	3.87±1.65	3.23±2.32
	Cellules en phase tardive d'apoptose	6.45±0.97	68.84±8.79	7.86±1.92	18.24±4.59	48.54±9.08	89.65±6.11

* Contrôle positif (Taxol 100 nM pour les cellules MCF-7).

Les résultats (donnés en %) sont la médiane ± MAD de trois expériences indépendantes.

7. Dépolarisation de la membrane mitochondriale par la DPT

Puisque les changements mitochondriaux sont considérés comme un événement critique du processus d'apoptose [211], le test de coloration au JC-1 a été effectué pour tester si la rupture de $\Delta\Psi_m$ précède l'activation en cascade des caspases et la mort cellulaire. A cet effet, les cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 ont toutes les deux été traitées avec de la DPT à 20nM pendant différentes durées, colorées avec le JC-1 puis analysées au microscope à fluorescence. Les agrégats JC-1 peuvent présenter une bande d'émission orange-rouge spécifique centrée à 590 nm, marquant un $\Delta\Psi_m$ élevé ; alors que les monomères affichent une bande d'émission verte centrée à 525 nm indiquant un $\Delta\Psi_m$ faible.

Dans les cellules sensibles MCF-7, le JC-1 a été mal accumulé et la proportion de fluorescence (rouge / vert) a été considérablement diminuée après 36h de traitement par la DPT (**Figure 26**). Ce résultat suggère que l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par la DPT était associée à une perturbation du $\Delta\Psi_m$ et à une apoptose consécutive dans les cellules MCF-7. En revanche, le JC-1 a été accumulé et a présenté une fluorescence cytoplasmique diffuse, non spécifiquement localisée dans les mitochondries des cellules traitées ou non traitées MDA-MB-231 qui ne présentaient qu'une légère fluorescence verte par rapport à la fluorescence rouge orangée, ce qui est typique d'un $\Delta\Psi_m$ normal et des cellules vivantes intactes avec des mitochondries polarisées (**Figure 26**).

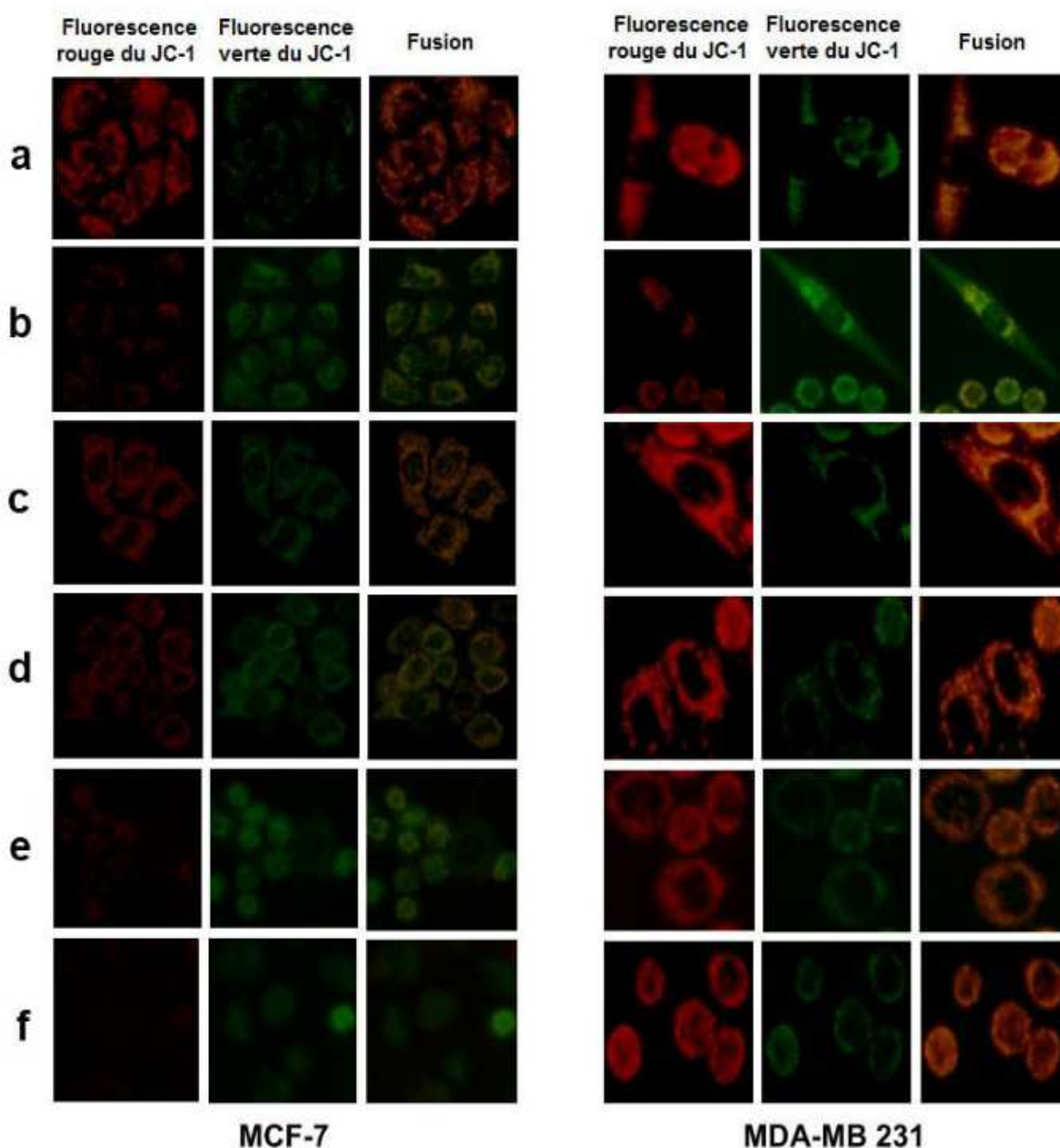
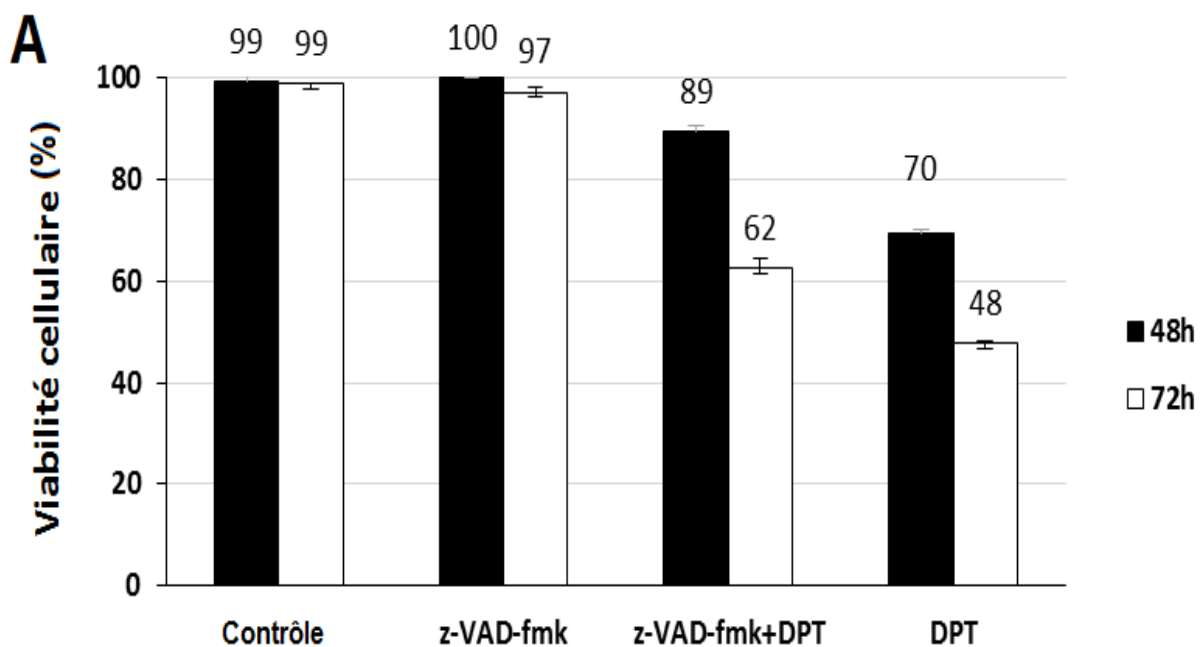


Figure 26. Evaluation du potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ par coloration au JC-1. Les agrégats JC-1 peuvent présenter une bande d'émission orange-rouge spécifique centrée à 590 nm indiquant un $\Delta\Psi_m$ élevé, alors que les monomères JC-1 affichent une bande d'émission verte centrée à 525 nm indiquant un $\Delta\Psi_m$ faible. La fusion passe du rouge orange au vert indiquant la perte de $\Delta\Psi_m$. **(a)** JC-1 dans des cellules tumorales dans des conditions normales. **(b)** JC-1 dans des cellules tumorales colorées avec le CCCP (témoin positif). **(c, d, e et f,)** JC-1 dans des cellules tumorales traitées avec 20 nM de DPT pendant 12, 24, 36 et 48h, respectivement.

8. La DPT induit l'activation des caspases dans les cellules MCF-7

Pour estimer si l'activation des caspases est impliquée dans l'apoptose induite par la DPT dans les cellules MCF et exclure, en outre, l'implication des caspases dans l'inhibition de la croissance des cellules MDA-MB-231, l'effet de l'inhibiteur des caspases, z-VAD-Fmk, sur l'inhibition de la croissance induite par la DPT a été examiné.

Comme le montre la **Figure 27A**, l'effet inhibiteur de la DPT sur la prolifération des cellules MCF-7 a été significativement inversé après traitement par le z-VAD-fmk. Ce dernier a efficacement bloqué l'effet inhibiteur de croissance des cellules MCF-7 induite par la DPT. Ainsi, après le prétraitement de z-VAD-fmk, la viabilité des cellules MCF-7 a augmenté de $20.3 \pm 1.7\%$ et de $18.2 \pm 4.6\%$ après 48h et 72h respectivement. Cependant, nous pouvons remarquer que la viabilité cellulaire dans les cellules traitées par la DPT après le prétraitement par z-VAD-fmk est restée significativement inférieure aux cellules témoins ($P < 0.05$). D'autre part, l'exposition des cellules MDA-MB-231 à l'inhibiteur de pan-caspase n'affecte pas l'inhibition de la prolifération des cellules après 48h et 72h (**Figure 27B**).



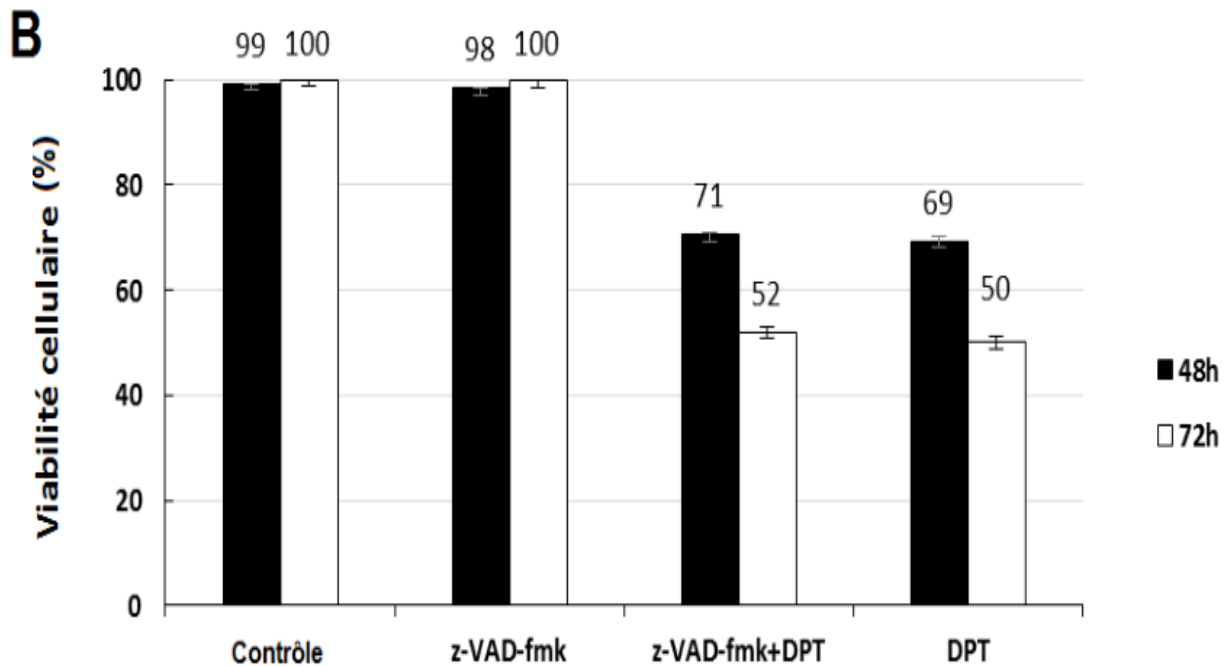


Figure 27. Effet du z-VAD-fmk sur l'inhibition de la croissance cellulaire des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 par la DPT. Les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) ont été cultivées dans des microplaques à 96 puits pendant 48h et 72h. Ensuite, les cellules étaient soit non traitées soit prétraitées avec 50 μ M de z-VAD-fmk pendant 4h avant le traitement par 20 nM de DPT. Après 72h d'incubation, 10 μ l de CCK-8 ont été ajoutés et l'incubation a été poursuivie pendant 1 – 4h. L'absorbance à 450 nm a été mesurée comme paramètre de viabilité cellulaire. Les résultats sont la médiane \pm MAD de trois expériences. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer l'importance de la différence de viabilité cellulaire lors de la comparaison entre les cellules traitées par DPT avec celles qui n'étaient pas traitées ou prétraitées avec z-VAD-fmk.

9. Effet de la DPT sur l'expression de protéines liées à l'apoptose dans les cellules MCF-7

Dans la même veine que ce qui a été observé ci-dessus, la **Figure 28** montre que la DPT favorise le clivage d'un substrat bien connu des caspases activées, PARP, impliquée dans la signalisation apoptotique dans les cellules MCF-7. Le clivage du PARP a débuté 12h après l'incubation et est devenu plus étendu vers 48h. Comme le clivage de la PARP peut être induit par d'autres protéases de mort cellulaire dans différents types de mort cellulaire [212], le

mécanisme responsable de l'apoptose induite par la DPT dans les cellules MCF-7 a été élucidé par l'examen de l'effet de la DPT sur l'expression de Bax et Bcl-2, molécules clés impliquées dans la voie apoptotique intrinsèque et rapportées avoir des propriétés pro-apoptotiques. Comme le montre la **Figure 28**, l'exposition à la DPT a provoqué une augmentation de l'expression de Bax avec un niveau inchangé de Bcl-2 dans les 48h du traitement. Là encore, le traitement par la DPT n'affecte pas l'expression des protéines liées à l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 (données non représentées).

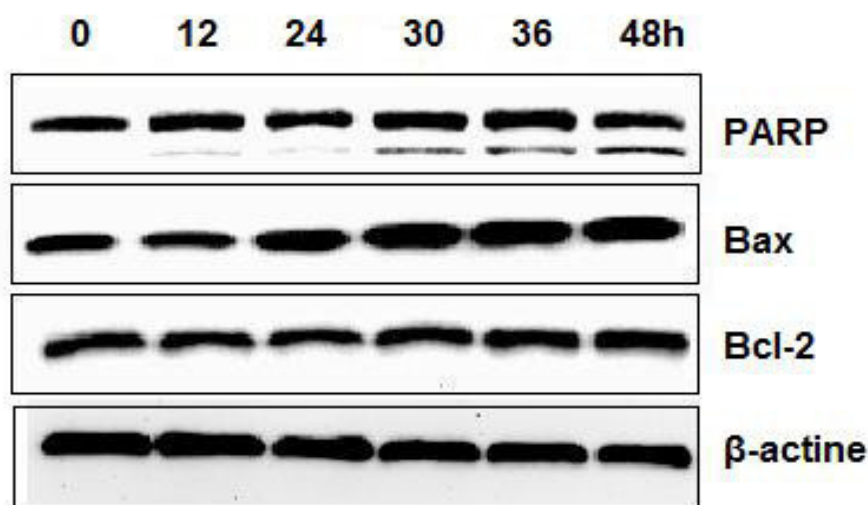


Figure 28. Effet temps-dépendant de la DPT sur l'expression des gènes liés à l'apoptose dans les cellules tumorales MCF-7. Les cellules ont été exposées à 20 nM de DPT et incubées pendant différentes durées. Ensuite, les taux d'expression de PARP, Bax, Bcl-2 et de la β -actine dans les lysats cellulaires totaux ont été déterminés par analyse de Western Blot. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

10. La DPT inhibe la croissance tumorale des xénogreffes de cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle des souris Nudes BALB/c

Pour évaluer les effets antitumoraux de la DPT sur le cancer du sein humain *in vivo*, nous avons utilisé un modèle de xénogreffe de tumeur de cancer du sein de lignée cellulaire MDA-MB-231, tout en mesurant le poids corporel, VT, T/C, RTV et TI. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7** et les **Figures 29A – D**. À la fin de l'expérience, il n'y avait pas de décès dans tous les groupes.

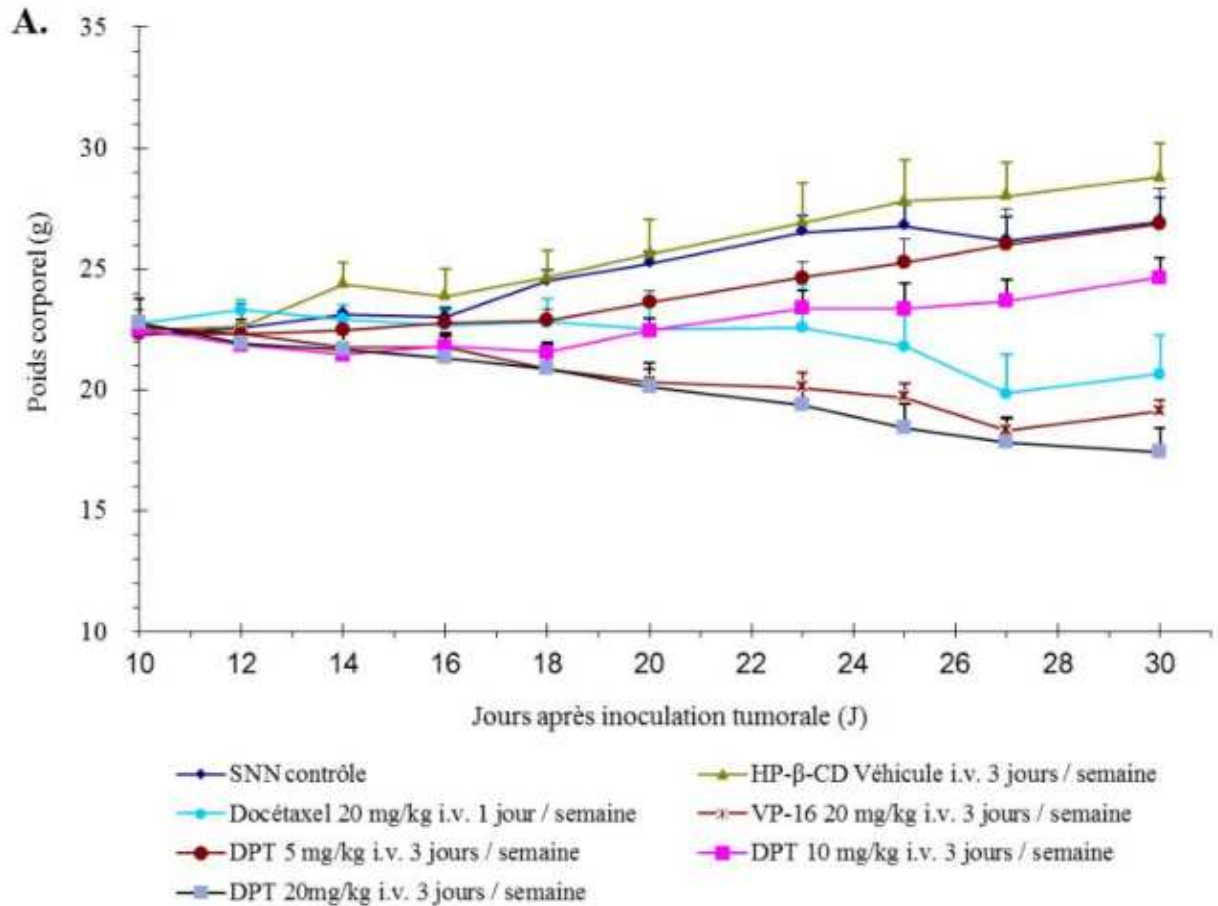
Tableau 7. Effet expérimental de la DPT sur les xénogreffes de cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle des souris Nudes BALB/c.

Groupes	Doses (mg/kg)	Voie d'administration	Nombre d'animaux		Poids corporel (g)		Volume tumoral (VT, mm ³)		RTV	T/C (%)	Poids tumoral (g)	
			Début	Fin	J0	J21	J0	J21			T/C (%)	TI (%)
SNN	-	iv	12	12	22.3±1.1	27.0±3.5	198±57	6467±2561	35.59±5.16		7.23±0.78	
HP-β-CD	-	iv	6	6	22.5±2.0	28.8±3.4	194±52	5704±2214	29.32±3.28	82.38	6.60±0.74	8.71
Docétaxel	20	iv	6	6	22.8±0.7	20.7±4.0**	197±71	2082±809***	10.98±1.29***	30.86	2.29±0.35***	68.29
VP-16	20	iv	6	6	22.6±1.2	19.1±1.9***	193±60	1453±567***	7.73±1.21***	21.72	1.63±0.30***	77.45
DPT-HP-β-CD	5	iv	6	6	22.3±0.8	26.9±3.6	197±63	2802±556***	15.26±1.78**	42.87	4.35±0.94*	39.84
DPT-HP-β-CD	10	iv	6	6	22.5±1.4	24.7±2.0	197±68	2165±715***	12.12±2.14***	34.04	2.37±0.39***	67.21
DPT-HP-β-CD	20	iv	6	6	22.8±1.2	17.4±1.1***	195±76	596±128***	3.43±0.55***	9.63	0.71±0.11***	90.15

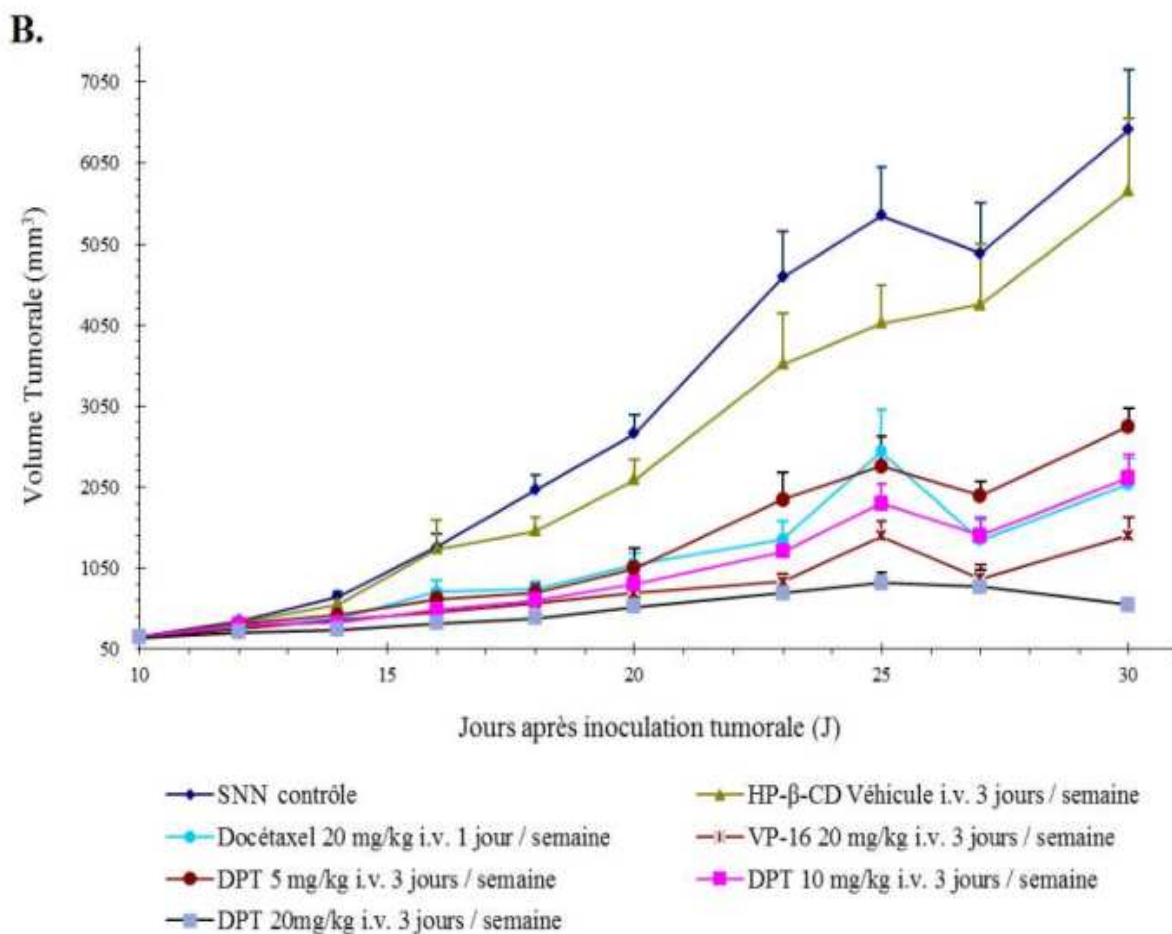
J: Jour après administration des médicaments.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, vs SNN groupe de contrôle.

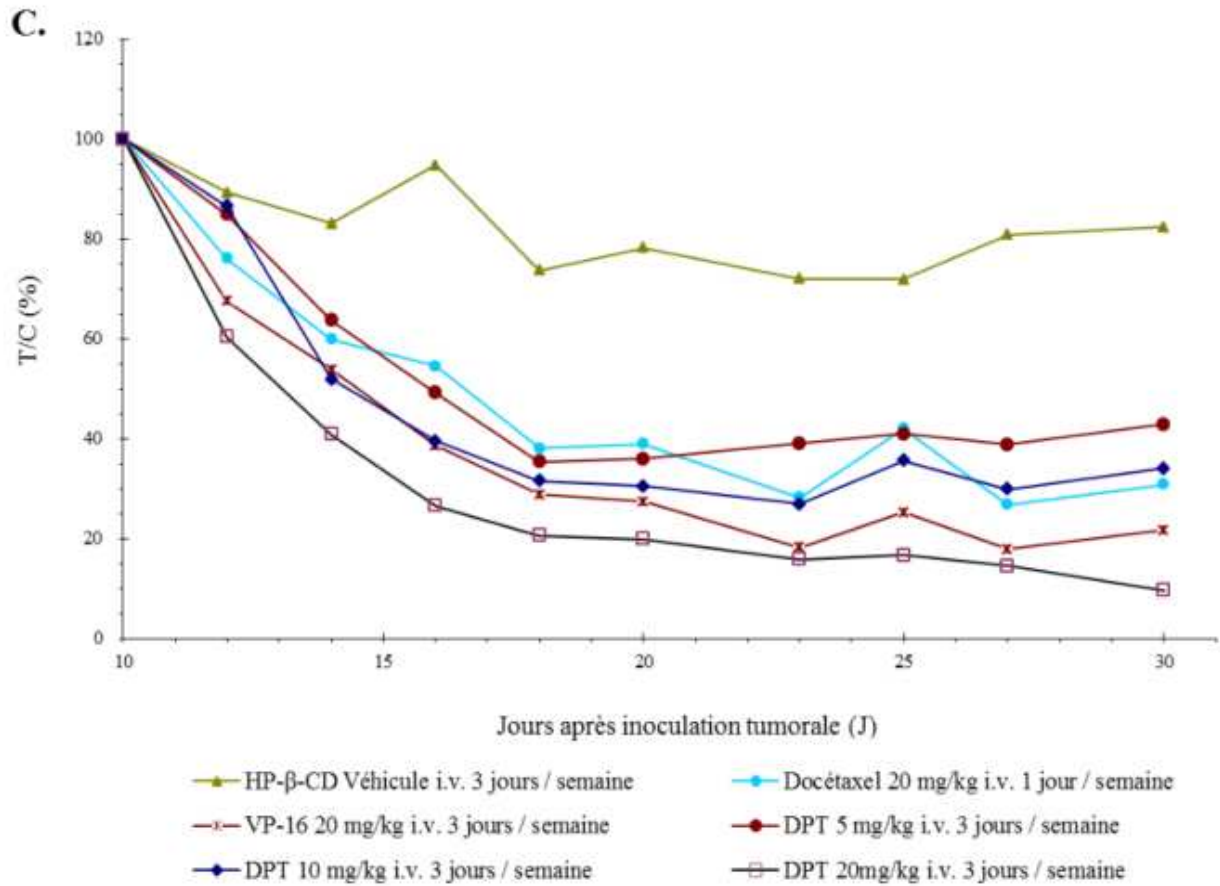
Après 3 semaines, le poids corporel a diminué de façon significative dans les groupes docétaxel (20 mg/kg), VP-16 (20 mg/kg) et DPT-HP- β -CD (20 mg/kg) de 20.7 ± 4.0 , 19.1 ± 1.9 et 17.4 ± 1.1 g respectivement par rapport à celui du groupe non traité (27.0 ± 3.5 g) (**Figure 29A**).



Le DPT-HP- β -CD intraveineux à 5 et à 10 mg/kg a donné un VT de 2802 ± 556 et 2165 ± 715 mm³, respectivement. En contraste marqué, les souris traitées avec 20 mg/kg ont présenté un VT de 596 ± 128 mm³ contre 6467 ± 2561 mm³ dans le groupe témoin; tandis que les souris traitées au docétaxel et au VP-16 avaient un VT de 2082 ± 809 et 1453 ± 567 mm³, respectivement (**Figure 29B**).



La modulation de la croissance des tumeurs *in vivo* a été évaluée en déterminant la valeur des pourcentages T/C et RTV de la cinétique de croissance (**Figure 29C et D**). Dans les groupes traités avec 5, 10 et 20 mg/kg de DPT-HP-β-CD, la valeur T/C a diminué à 42.87, 34.04 et 9.63%, respectivement, après 3 semaines de la thérapie intraveineuse par le DPT-HP-β-CD. Dans les groupes traités avec les témoins positifs, VP-16 et docétaxel, les valeurs T/C étaient de 21.72 et 30.86%, respectivement.



Comme il est montré dans le **Tableau 7**, avec les doses croissantes de DPT-HP-β-CD, le TI du poids tumoral des souris traitées par DPT-HP-β-CD augmente progressivement par rapport aux souris non traitées. Ainsi, le DPT-HP-β-CD inhibait significativement la croissance tumorale de manière dose – dépendante. Le TI (%) des groupes traités avec 5 et 20 mg/kg de DPT-HP-β-CD intraveineux a atteint 39.84 et 9015% respectivement, comparé à 77.45% dans le groupe traité par le VP-16 (20 mg/kg). De plus, le traitement avec 10 mg/kg de DPT-HP-β-CD ou 20 mg/kg de docétaxel inhibe la croissance tumorale à des proportions égales (67.21% et 68.29%, respectivement).

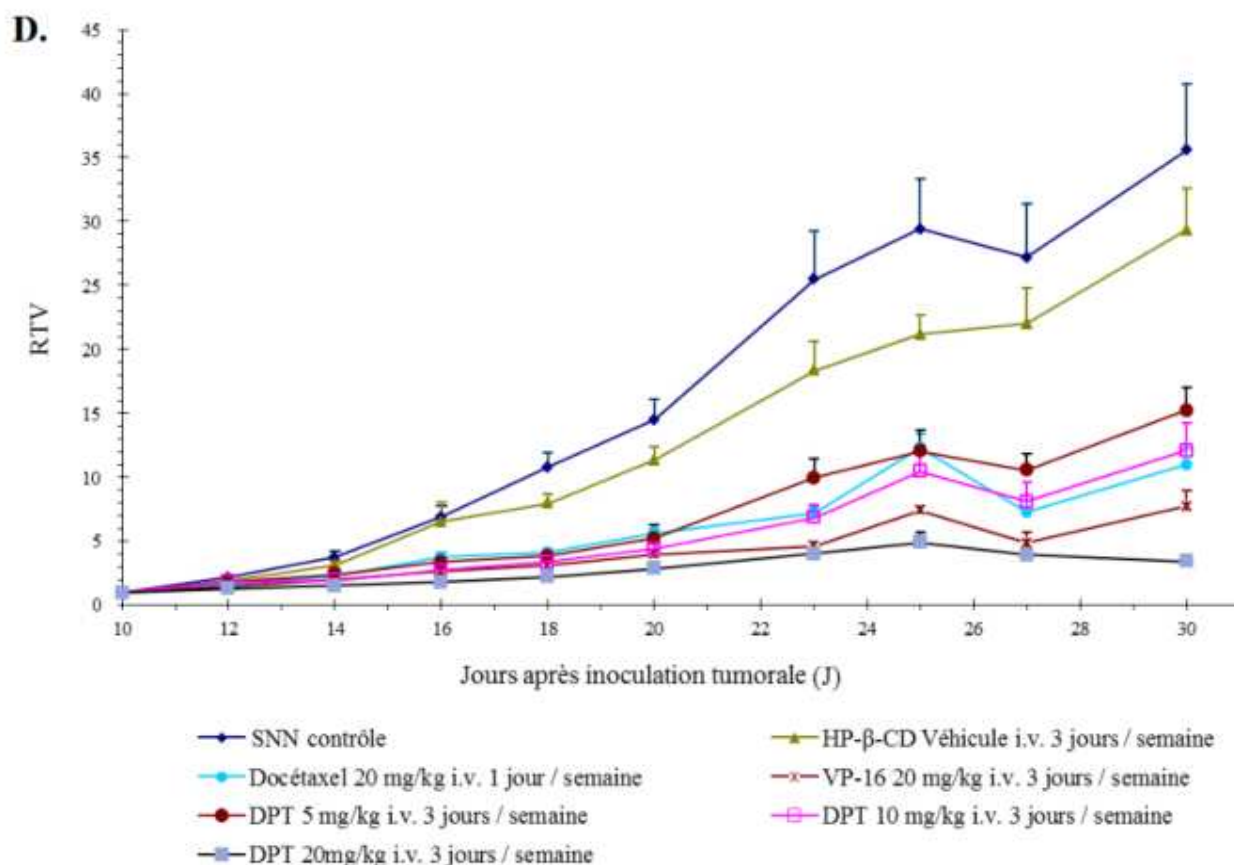


Figure 29. Effet de la DPT *in vivo* sur les xénogreffes du cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle des souris Nudes BALB/c. Les tumeurs du sein humain MDA-MB-231, ayant atteint une taille de 100-140 mm³, ont été traitées avec le DPT-HP-β-CD (5, 10 et 20 mg/kg) et les témoins positifs, avec le VP-16 (20 mg/kg) et le docétaxel (20 mg/kg). Le HP-β-CD et la SSN ont également été administrés. Après 21 jours de traitement, la différence statistique entre le témoin négatif et les groupes traités a été déterminée par le test de Mann Whitney. Les valeurs sont la moyenne du volume relatif de la tumeur (moyenne ± SEM). (A) Effet du DPT-HP-β-CD, administré par *iv*, sur le poids corporel des souris Nudes (** P = 0,004, *** P = 0,0001). (B) Effet du DPT-HP-β-CD administré par *iv* sur le volume de la tumeur (*** P <0,001). (C) Effet du DPT-HP-β-CD sur l'inhibition de la croissance tumorale. (D) Activité antitumorale du DPT-HP-β-CD sur la croissance de la xénogrefe (*** P <0,001, ** P <0,01).

La taille typique et l'apparence macroscopique des nodules de tumeur du sein humain MDA-MB-231 dans les groupes traités et non traités sont montrées sur la **Figure 30**.

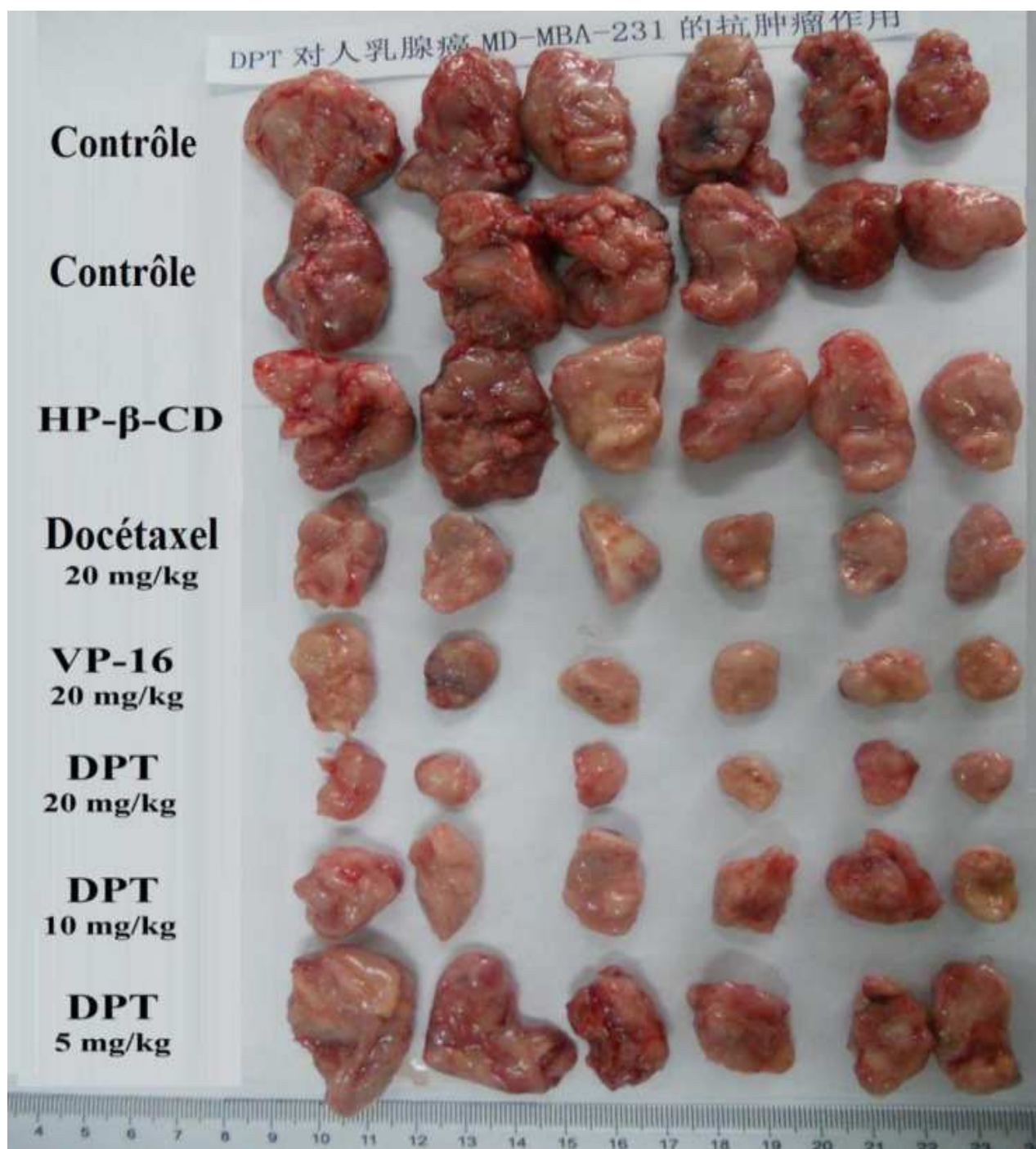


Figure 30. Taille typique et apparence macroscopique des nodules du cancer du sein humain MDA-MB-231 au 21^{ème} jour chez les souris Nudes non-traitées et traitées par des médicaments.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'un des principaux défis dans le traitement du cancer du sein est l'existence de TNBC qui sont résistants à la thérapie antihormone et aux thérapies ciblées [213]. Compte tenu de ces limitations, trouver de nouvelles thérapies à ce sous-ensemble du cancer du sein est d'une importance cruciale. Il a été démontré que la DPT inhibait de manière significative la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines par l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G2/M [19, 214].

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'effet antiprolifératif et les mécanismes antiprolifératifs correspondants d'un produit semi-synthétique de *Dysosma versipellis*, la DPT, sur une lignée de cellules de TNBC, les MDA-MB-231, et une autre lignée de cellules du cancer du sein RE⁺, les MCF-7. Le test au CCK-8 a été appliqué et les données ont révélé que la DPT était cytotoxique à la fois pour les cellules MCF-7 et les cellules MDA-MB-231 d'une manière dépendante de la concentration. En outre, l'effet cytotoxique de la DPT est plus puissant que celui du VP-16, un agent cytotoxique bien connu. La DPT a inhibé la prolifération des cellules prolifératives MCF-7 et MDA-MB-231 à des concentrations CI₅₀ très faibles par rapport à celles du VP-16. Ces données impliquent que la DPT pourrait être un agent anticancéreux prometteur basé sur sa cytotoxicité sur ces lignées cancéreuses.

L'inhibition de la tumorigénèse implique souvent la modulation d'une voie de transduction du signal, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et, par conséquent, à l'apoptose [215, 216]. Conformément aux rapports précédents, nous avons démontré que la DPT provoque un blocage du cycle cellulaire à la phase G2/M, dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, qui est partiellement liée à la perturbation de l'expression des protéines du cycle cellulaire.

Il est bien connu que le cycle cellulaire eucaryote est strictement régulé par des complexes contenant des CDKs et des cyclines, qui sont critiques pour la progression du cycle cellulaire et dont l'inactivation conduit à l'arrêt du cycle cellulaire [105]. La cycline B1 est synthétisée pendant la phase S, culmine à la phase G2/M et est rapidement dégradée à la télophase de la phase M. Elle joue un rôle crucial dans la transition G2/M et dans la progression de la phase M [217, 218]. L'accumulation de la cycline B1 a été considérée comme un indicateur de l'arrêt du cycle cellulaire dans les phases G2 et/ou M. Par conséquent, l'arrêt du cycle cellulaire induit par la DPT, dans les cellules MCF-7, pourrait être partiellement expliqué par l'expression élevée de la cycline B1. Le même effet du traitement par la DPT sur la quantité de cycline B1 a été observé dans d'autres études utilisant d'autres

lignées cellulaires [33, 214, 219]. En revanche, nous avons constaté que la DPT réduit la quantité de cycline B1 dans les cellules MDA-MB-231. Un aperçu du comportement combiné des protéines du cycle cellulaire peut donner une explication à cette observation.

La cycline B1 s'associe à la CDK1 pendant la phase G2 pour former un complexe dont l'activité dépend principalement de la quantité de cycline B1 et de l'état de phosphorylation de la CDK1 [46]. De plus, la *cdc25c* active le complexe CDK1/cycline B par déphosphorylation de CDK1 [47]. Par conséquent, un mécanisme potentiel de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la DPT dans les cellules MDA-MB-231 est par la diminution des niveaux de protéines totales de la cycline B1 et de la *cdc25c*. Un comportement comparable de la cycline B1 et de la *cdc25c* après le traitement du glioblastome U-87 MG par la DPT a été observé dans d'autres études [219]. De plus, nous pouvons également spéculer que la diminution de la *cdc25c* peut donner une explication supplémentaire à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M par l'absence de déphosphorylation de CDK1 après traitement des cellules MCF-7 par la DPT.

Les microtubules du fuseau mitotique hautement dynamique sont parmi les cibles les plus intéressantes pour la thérapie anticancéreuse [220]. Les agents chimiothérapeutiques stabilisant les microtubules cellulaires, comme le Taxol, conduisent à l'arrêt mitotique et à la cytotoxicité dans les cellules en prolifération [221]. La DPT semble être un nouvel agent de ciblage des microtubules qui fonctionne par un mécanisme différent. Les données provenant de la microscopie d'immunofluorescence ont démontré que la DPT a perturbé de façon spectaculaire le cytosquelette et a empêché la division des cellules cancéreuses par l'inhibition de la polymérisation de la tubuline dans les cellules tumorales, MCF-7 et MDA-MB-231.

Puisque l'apoptose cellulaire peut être l'une des conséquences de l'arrêt du cycle cellulaire [222], l'induction de l'apoptose a été confirmée par l'analyse de marqueurs indépendants. Ainsi, avec la coloration de Hoechst, les cellules MCF-7 traitées par la DPT présentaient des altérations morphologiques significatives liées à l'apoptose, telles que les corps apoptotiques et la condensation de la chromatine. En outre, un pic sub-G1, souvent considéré comme indicateur d'apoptose cellulaire, a été clairement observé par cytométrie de flux, après le traitement par la DPT menant les cellules MCF-7 à subir l'apoptose typique. De plus, l'analyse par coloration double FITC-Annexine V/PI des cellules MCF-7 a indiqué un nombre accru de cellules apoptotiques après traitement par la DPT en fonction de la dose et du temps.

Au cours du processus d'apoptose, plusieurs événements se produisent dans les mitochondries, y compris la libération d'activateurs de caspases tels que le cyt-c, les changements dans le transport d'électrons et la perte de potentiel transmembranaire de mitochondrie ($\Delta\Psi_m$), caractéristique de l'apoptose [223]. Pour cette raison, $\Delta\Psi_m$ est un paramètre important de la fonction mitochondriale et a été utilisé comme indicateur de l'état et l'intégrité cellulaire. En outre, le traitement par la DPT a induit de manière significative la perte du $\Delta\Psi_m$ des MCF-7, un des événements les plus précoces dans la mort cellulaire programmée et un médiateur critique de ce processus [224-226]. Pour déterminer si l'induction de l'apoptose par le traitement DPT dépend de l'activation des caspases, nous avons démontré que l'inhibiteur pan-caspase empêchait l'effet apoptotique de la DPT sur les MCF-7.

La voie apoptotique extrinsèque est initiée par l'activation des récepteurs de mort de la surface cellulaire par leurs ligands spécifiques, ce qui induit alors l'activation de la caspase 8 [227]. En revanche, la voie apoptotique intrinsèque est induite par la libération du cyt-c des mitochondries dans le cytosol et l'activation de la caspase 9 puis des caspases 3 et 7 et conduisant par conséquent à l'apoptose cellulaire [228]. Plusieurs membres pro/anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bad et Bax, exercent également leurs effets par les mitochondries, soit en interagissant avec Bcl-2 et Bcl-x1, soit par des interactions directes avec la membrane mitochondriale [229].

Nos résultats de l'analyse de Western Blot ont montré que la DPT a élevé l'expression de Bax suggérant l'implication de la voie intrinsèque au cours de l'apoptose des cellules MCF-7. Cette implication est encore étayée par le clivage observé de la PARP. En effet, l'enzyme de réparation de l'ADN est clivée de la pleine longueur de 116 kDa à une forme inactive de 85 kDa par la caspase-3 ou -7 [230] qui sont connus pour être impliqués dans la voie apoptotique intrinsèque [228]. Cependant, et en dépit de tous ces résultats, nous avons toutefois de bonnes raisons de penser que l'effet de la DPT sur la survie de MCF-7 ne dépend pas uniquement de l'apoptose dépendante des caspases. Tout d'abord, et contrairement à l'apoptose classique, nous avons constaté que le traitement par la DPT n'a pas entraîné le passage des cellules au niveau du quadrant Annexine⁺ PI (Même à des doses plus faibles ou à des points de contrôle plus précoces), et deuxièmement, l'inhibiteur de la caspase ne permettait pas de restituer la viabilité cellulaire initiale. De telles données suggèrent une mort cellulaire mixte plutôt qu'une apoptose dépendante des caspases. Ainsi, la DPT induit la mort

de MCF-7 par des mécanismes à la fois caspase-dépendants et indépendants des caspases tels que l'autophagie, l'entose, la nécroptose ou d'autres mécanismes selon la classification du Comité de nomenclature sur la mort cellulaire (NCCD) [231].

D'autre part, nos résultats montrent que la DPT a empêché les cellules MDA-MB-231 de subir une apoptose. Ceci est en désaccord avec certains résultats d'études antérieures utilisant une forme naturelle de DPT extraite d'autres plantes: *A.sylvestris* [232] ou *Juniperus communis* [15]. Dans ces études, le milieu de culture des MDA-MB-231 était différent du milieu L-15 recommandé par l'ATCC [233] et qui a été utilisé dans notre étude. Les milieux de culture cellulaire peuvent influencer non seulement la viabilité cellulaire, mais aussi la génétique cellulaire [234]. Par conséquent, l'écart observé dans le milieu de culture peut conduire à des différences dans les caractères phénotypiques de la lignée cellulaire MDA-MB-231, y compris sa réponse au traitement par la DPT. Pour cette raison, nous pensons que la lignée cellulaire MDA-MB-231 dérivant d'un TNBC, peut effectivement être résistante à l'apoptose après exposition à la DPT, comparée à la lignée cellulaire MCF-7 dérivée d'un cancer de sein sensible aux hormones. Il a déjà été signalé qu'une réponse différentielle aux médicaments cytotoxiques pouvait être observée dans ces deux lignées cellulaires. Le clophosphamide, l'épirubicine et le 5-fluorouracile induisent différenciellement l'expression de protéines apoptotiques, pro-apoptotiques et anti-apoptotiques dans les lignées de cellules de cancer de sein, MDA-MB-231 et MCF-7 [235]. De plus, de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses présentent une telle résistance à la mort cellulaire programmée après exposition à des médicaments ou à des radiations bien qu'elles subissent un arrêt permanent de la croissance. Une telle résistance est compensée par une sénescence cellulaire accélérée, ou par une autre forme de mort cellulaire appelée catastrophe mitotique [222].

La lignée cellulaire MDA-MB-231 peut subir l'une de ces variantes suite à l'exposition à la DPT. Nous pouvons remarquer que dans notre étude, cette résistance à l'apoptose ainsi que l'effet antiprolifératif ont été observés même avec des doses minimales de DPT, ce qui suggère qu'une telle réponse de la lignée cellulaire MDA-MB-231 pourrait être associée à des états de cytotoxicité minimale. Les agents anticancéreux ayant l'indice thérapeutique le plus élevé (c'est-à-dire un effet antitumoral maximal et des effets secondaires minimaux) sont les plus convoités. Les thérapies antinéoplasiques ciblées sont un exemple de ces agents [236] ainsi que les agents ayant un effet sur la prolifération cellulaire, mais pas sur des processus impliqués dans la survie [237].

Des études antérieures ont montré que la DPT induit l'apoptose et la mort cellulaire dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 de cancer du sein humain, *in vitro* [15]. Cependant, les études *in vivo* n'avaient pas encore été réalisées avant la nôtre, bien qu'elles soient nécessaires pour réaliser des essais cliniques chez l'homme et pour permettre le développement de nouveaux agents anticancéreux. Notre étude est la première du genre à étudier l'effet antitumoral de la DPT dans la xénogreffe de cancer du sein humain MDA-MB-231 dans le modèle de souris Nudes BALB/c.

Nos résultats ont montré que la DPT présentait un puissant effet inhibiteur en termes de devenir pondéral de la xénogreffe, ce qui suggère que le traitement par la DPT peut être considéré comme ayant une incidence significative sur la croissance tumorale. Nous avons utilisé deux témoins positifs: le VP-16 (un autre dérivé de la podophyllotoxine) et le docétaxel, des agents chimiothérapeutiques bien connus, qui sont utilisés dans le traitement du cancer du sein. L'inhibition de la croissance tumorale T/C (%) est utilisée pour mesurer l'effet antitumoral du traitement dans les expériences de xénogreffe tumorale de criblage de médicament [238]. Selon la valeur T/C (%), la dose de 20 mg/kg de DPT-HP- β -CD intraveineuse inhibe de manière significative la croissance tumorale par rapport au VP-16 et au docétaxel administrés à la même dose. Cependant, le DPT-HP- β -CD (20 mg/kg) ralentit le poids corporel des souris. Ainsi, la dose de (10 mg/kg) semble être la plus appropriée pour l'utilisation du DPT-HP- β -CD, car à cette dose, les valeurs T/C (%) de DPT-HP- β -CD (10 mg/Kg) et de docétaxel (20 mg/kg) sont indifférenciables. De plus, cette dose entraîne moins de perte de poids corporel. La perte de poids observée par le traitement DPT-HP- β -CD est principalement due à une réaction gastro-intestinale après l'injection *iv.* de la DPT, entraînant une diminution de l'apport alimentaire. C'est également un effet secondaire fréquent des médicaments de chimiothérapie anticancéreuse.

Conformément aux résultats ci-dessus et selon les résultats du TI, l'administration *iv.* de 10 mg/kg de DPT-HP- β -CD et de 20 mg/kg de docétaxel chez des souris Nudes induit un effet similaire sur la croissance tumorale du cancer de sein humain MDA-MB-231. Par conséquent, nos données indiquent clairement que le DPT-HP- β -CD présente une forte activité antitumorale *in vivo* avec une marge de sécurité rationnelle. De plus, nos résultats démontrent que le traitement par DPT-HP- β -CD par voie *iv.* d'une xénogreffe MDA-MB-231 de cancer du sein humain établie par voie *sc.* présente une inhibition marquée de la croissance tumorale puisque la dose efficace est < 10 mg/kg.

L'unique étude sur l'animal qui s'intéressait par l'effet de la DPT *in vivo* a été réalisée en utilisant des cellules du cancer gastrique SGC-7901 dans un modèle de xéno greffe. Elle a révélé que la DPT inhibait de manière significative la croissance tumorale et diminuait la densité des microvaisseaux [214]. Ainsi, notre étude donne plus de perspectives à l'efficacité antitumorale de la DPT *in vivo* et cela dans le cancer du sein.

En conclusion, la DPT est un traitement efficace de la xéno greffe du cancer du sein humain MDA-MB-231. Ces découvertes ont ouvert une nouvelle fenêtre pour la recherche afin de valider l'activité, *in vivo*, de la DPT chez l'animal et pour permettre son utilisation clinique en tant qu'agent prometteur dans le domaine du traitement du cancer du sein.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

Le traitement de plusieurs types de cancer, y compris le cancer du sein, est basé sur la chimiothérapie. Les agents de chimiothérapie tentent de résoudre certaines des anomalies des voies régulatrices normales des cellules qui rendent leur division non contrôlée. Beaucoup de ces agents sont des produits bioactifs dérivés de plantes. On en distingue par exemple : les vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine) qui sont des agents déstabilisateurs des microtubules, les épipodophyllotoxines (VP-16 et téniposide) qui sont des inhibiteurs de topoisomérase, les taxanes (paclitaxel et docétaxel) qui sont des agents stabilisateurs des microtubules et les dérivés de camptothécine (camptothécine et irinotécan) qui sont des antimétabolites. La liste des molécules bioactives dérivées des plantes ne cesse de grandir dans l'espoir d'améliorer l'efficacité et la tolérance des chimiothérapies.

Dans le cancer du sein, environ 12-20% des cas sont des TNBC [239]. Cette classe de cancer du sein n'a pas cessé d'attirer l'attention des cliniciens et des biologistes. Non seulement à cause de son agressivité mais également par l'absence de thérapie ciblée spécifique, par le fait qu'elle touche préférentiellement les femmes en pré-ménopause (donc jeunes) et d'origine africaine, ainsi que par le fait qu'il soit en fort chevauchement avec la présence de mutations sur le gène *BRCA-1* (qui est impliqué dans le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue). Les mutations à forte pénétrance de ce gène expliquent la forte susceptibilité des personnes qui les possèdent à développer un cancer du sein. Depuis très peu de temps, une très faible proportion des TNBC, qui sont les TNBC ayant une mutation de *BRCA-1*, peut bénéficier d'un agent inhibiteur de PARP (diminuant ainsi encore plus la capacité de réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses [240]).

A notre avis, notre travail pourrait contribuer à l'arsenal thérapeutique du TNBC dans l'avenir, si les résultats qu'il démontre pouvaient être reproduits en clinique. En effet, nos données ont révélé que la DPT inhibait efficacement la croissance des cellules tumorales parallèlement à l'induction apoptotique et à la mort cellulaire dans les cellules sensibles, MCF-7. Cependant, et dans les mêmes conditions, certaines différences entre les lignées cellulaires en réponse à la DPT ont été apparentes puisque la DPT inhibait sélectivement la prolifération des cellules MDA-MB-231 en l'absence de cytotoxicité. L'absence significative de la mort cellulaire, à des concentrations ayant des effets inhibiteurs profonds sur la prolifération et des effets cytostatiques clairs, suggère que la DPT interagit sélectivement avec les médiateurs des événements du cycle cellulaire. L'effet cytostatique de la DPT sur la lignée de cellules humaines dérivant de TNBC, peut être avantageux dans le traitement des tumeurs

humaines dans leur environnement naturel, car cela restreindrait la prolifération de manière moins susceptible de provoquer une cytotoxicité et d'induire la mort dans des tissus non tumoraux. En outre, la DPT s'est révélée efficace dans le traitement de la xénogreffe du cancer du sein humain MDA-MB-231. L'effet cytostatique de la DPT ainsi que son activité *in vivo* suggèrent que ce composé pourrait constituer la base d'un médicament à utiliser parallèlement à la chimiothérapie conventionnelle, bien que d'autres études cliniques soient nécessaires pour déterminer si les cellules cancéreuses, notamment les TNBC, peuvent être sensibles à cet agent dans leur milieu naturel et pour déterminer également sa compatibilité avec d'autres agents de chimiothérapie. Des études précliniques préalables devraient également déterminer la cinétique de ce composé.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la DPT, un composé semi-synthétique de *Dysoxia versipellis*, peut constituer un candidat potentiel pour le traitement du cancer de sein et fournit une base préliminaire pour son application clinique dans le futur en tant qu'agent prometteur dans le domaine de la thérapie du cancer du sein.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
- [2] Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009;151:727-37, W237-42.
- [3] McGuire WL, Horwitz KB, Zava DT, Garola RE, Chamness GC. Hormones in breast cancer: update 1978. *Metabolism* 1978;27:487-501.
- [4] Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:6126-33.
- [5] Chan M, Chang MC, Gonzalez R, Lategan B, del Barco E, Vera-Badillo F, et al. Outcomes of Estrogen Receptor Negative and Progesterone Receptor Positive Breast Cancer. *PLoS ONE* 2015;10:e0132449.
- [6] M JM. Deux marqueurs biologiques pour le cancer du sein triple négatif. *Revue Francophone des Laboratoires* 2013;2013:16.
- [7] Ovcaricek T, Frkovic SG, Matos E, Mozina B, Borstnar S. Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival. *Radiology and Oncology* 2011;45:46-52.
- [8] Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646-74.
- [9] Gomez-Galera S, Pelacho AM, Gene A, Capell T, Christou P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep* 2007;26:1689-715.
- [10] Messina MJ, Loprinzi CL. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J Nutr* 2001;131:3095S-108S.
- [11] Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:364-73.
- [12] Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;85:47-51.
- [13] Kulling E, Watzl W. Phytoostrogene. *Ernahrungs-Umschau* 2003;50:234-9.
- [14] Lee K-H, Xiao Z. Lignans in treatment of cancer and other diseases†. *Phytochemistry Reviews* 2003;2:341-62.
- [15] Benzina S, Harquail J, Jean S, Beauregard AP, Colquhoun CD, Carroll M, et al. Deoxypodophyllotoxin isolated from *Juniperus communis* induces apoptosis in breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2015;15:79-88.
- [16] Dewick PM. Biosynthesis of lignans: structure elucidation. Amsterdam: Elsevier 1989;5.
- [17] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-7.
- [18] Scholz E. Review of "lignans, chemical, biological and clinical properties". *Planta Med* 1991;57:508.
- [19] Khaled M, Jiang Z-Z, Zhang L-Y. Deoxypodophyllotoxin: A promising therapeutic agent from herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2013;149:24-34.
- [20] Gordaliza M, Garcia PA, del Corral JM, Castro MA, Gomez-Zurita MA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 2004;44:441-59.
- [21] Rai LK, Prasad P, Sharma E. Conservation threats to some important medicinal plants of the Sikkim Himalaya. *Biological Conservation* 2000;93:27-33.
- [22] Vasilev NP, Julsing MK, Koulman A, Clarkson C, Woerdenbag HJ, Ionkova I, et al. Bioconversion of deoxypodophyllotoxin into epipodophyllotoxin in *E. coli* using human cytochrome P450 3A4. *Journal of biotechnology* 2006;126:383-93.

- [23] Koulman A, Bos R, Medarde M, Pras N, Quax WJ. A fast and simple GC MS method for lignan profiling in *Anthriscus sylvestris* and biosynthetically related Plant species. *Planta Med* 2001;67:858-62.
- [24] Kozawa M, Baba K, Matsuyama Y, Kido T, Sakai M, Takemoto T. Components of the Root of *Anthriscus sylvestris* HOFFM. II. Insecticidal Activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 1982;30:2885-8.
- [25] Charlton JL. Antiviral activity of lignans. *J Nat Prod* 1998;61:1447-51.
- [26] Jin M, Moon TC, Quan Z, Lee E, Kim YK, Yang JH, et al. The naturally occurring flavolignan, deoxypodophyllotoxin, inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression through the NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophage cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2008;31:1312-5.
- [27] Jin M, Lee E, Yang JH, Lu Y, Kang S, Chang YC, et al. Deoxypodophyllotoxin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in murine lung epithelial cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2010;33:1-5.
- [28] Chen JJ, Chang YL, Teng CM, Chen IS. Anti-platelet aggregation alkaloids and lignans from *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta Med* 2000;66:251-6.
- [29] Gordaliza M, Castro MA, Garcia-Gravalos MD, Ruiz P, Miguel del Corral JM, San Feliciano A. Antineoplastic and antiviral activities of podophyllotoxin related lignans. *Arch Pharm (Weinheim)* 1994;327:175-9.
- [30] Lee SH, Son MJ, Ju HK, Lin CX, Moon TC, Choi HG, et al. Dual inhibition of cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase by deoxypodophyllotoxin in mouse bone marrow-derived mast cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004;27:786-8.
- [31] Sudo K, Konno K, Shigeta S, Yokota T. Inhibitory effects of podophyllotoxin derivatives on herpes simplex virus replication. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 1998;9:263-7.
- [32] Ikeda R, Nagao T, Okabe H, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M, et al. Antiproliferative constituents in umbelliferae plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1998;46:871-4.
- [33] Shin SY, Yong Y, Kim CG, Lee YH, Lim Y. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett* 2010;287:231-9.
- [34] Yong Y, Shin SY, Lee YH, Lim Y. Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: Induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:4367-71.
- [35] Suh SJ, Kim JR, Jin UH, Choi HS, Chang YC, Lee YC, et al. Deoxypodophyllotoxin, flavolignan, from *Anthriscus sylvestris* Hoffm. inhibits migration and MMP-9 via MAPK pathways in TNF-alpha-induced HASMC. *Vascular Pharmacology* 2009;51:13-20.
- [36] Choi H, Lee J, Shin HJ, Lee BG, Chang I, Hwang JS. Deoxypodophyllotoxin reduces skin pigmentation of brown Guinea pigs. *Planta Med* 2004;70:378-80.
- [37] Lin CX, Lee E, Jin MH, Yook J, Quan Z, Ha K, et al. Deoxypodophyllotoxin (DPT) inhibits eosinophil recruitment into the airway and Th2 cytokine expression in an OVA-induced lung inflammation. *Planta Med* 2006;72:786-91.
- [38] Dall'Acqua S, Giorgetti M, Cervellati R, Innocenti G. Deoxypodophyllotoxin content and antioxidant activity of aerial parts of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Z Naturforsch C* 2006;61:658-62.
- [39] Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* 2005;13:5892-908.

- [40] Gao R, Gao C, Tian X, Yu X, Di X, Xiao H, et al. Insecticidal activity of deoxydopodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L, and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. *Pest Manag Sci* 2004;60:1131-6.
- [41] Imbert TF. Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 1998;80:207-22.
- [42] Cortese F, Bhattacharyya B, Wolff J. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 1977;252:1134-40.
- [43] Stahelin H. Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *Eur J Cancer* 1973;9:215-21.
- [44] Stahelin H. 4'-Demethyl-epipodophyllotoxin thenylidene glucoside (VM 26), a podophyllum compound with a new mechanism of action. *Eur J Cancer* 1970;6:303-11.
- [45] Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 1995;17:471-80.
- [46] Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 2005;30:630-41.
- [47] Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 1991;67:197-211.
- [48] Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503-8.
- [49] Loike JD, Brewer CF, Sternlicht H, Gensler WJ, Horwitz SB. Structure-activity study of the inhibition of microtubule assembly in vitro by podophyllotoxin and its congeners. *Cancer Res* 1978;38:2688-93.
- [50] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153-64.
- [51] Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 2001;82:55-84.
- [52] Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998;281:1674-7.
- [53] Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000;287:1824-7.
- [54] Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998;281:1677-9.
- [55] Wang J, Tsirka SE. Neuroprotection by inhibition of matrix metalloproteinases in a mouse model of intracerebral haemorrhage. *Brain* 2005;128:1622-33.
- [56] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- [57] Clausell N, de Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb AI, et al. Expression of tumour necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *British Heart Journal* 1995;73:534-9.
- [58] Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, Meehan WP, Collins A, Fleck E, et al. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 2001;159:93-101.
- [59] Suh SJ, Jin UH, Kim SH, Chang HW, Son JK, Lee SH, et al. Ochnaflavone inhibits TNF-alpha-induced human VSMC proliferation via regulation of cell cycle, ERK1/2, and MMP-9. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006;99:1298-307.
- [60] Suh SJ, Jin UH, Choi HJ, Chang HW, Son JK, Lee SH, et al. Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE has an inhibitory effect on TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 production and HASMC migration via down-regulated NF-kappaB and AP-1. *Biochemical Pharmacology* 2006;72:1680-9.

- [61] Suh SJ, Moon SK, Kim CH. Raphanus sativus and its isothiocyanates inhibit vascular smooth muscle cells proliferation and induce G(1) cell cycle arrest. *International Immunopharmacology* 2006;6:854-61.
- [62] Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology* 1952;117:500-44.
- [63] Kiernan MC, Isbister GK, Lin CS, Burke D, Bostock H. Acute tetrodotoxin-induced neurotoxicity after ingestion of puffer fish. *Annals of Neurology* 2005;57:339-48.
- [64] Zhang SG, Gao R, Liu YQ, He B, Di XD, Cheng J, Xiao H. Toxicity of deoxypodophyllotoxin to *Periplaneta americana* and its effects on AChE and ATPase. *Acta Entomologica Sinica* 2007;50:248-52.
- [65] Xu P, Sun Q, Wang X, Zhang S, An S, Cheng J, et al. Pharmacological effect of deoxypodophyllotoxin: a medicinal agent of plant origin, on mammalian neurons. *Neurotoxicology* 2010;31:680-6.
- [66] Zlotkin E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual Review of Entomology* 1999;44:429-55.
- [67] Carafoli E. Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS Journal* 2005;272:1073-89.
- [68] Catterall WA. Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999;868:144-59.
- [69] Lin CX, Son MJ, Ju HK, Moon TC, Lee E, Kim SH, et al. Deoxypodophyllotoxin, a naturally occurring lignan, inhibits the passive cutaneous anaphylaxis reaction. *Planta Med* 2004;70:474-6.
- [70] Kim Y, Kim SB, You YJ, Ahn BZ. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*. *Planta Med* 2002;68:271-4.
- [71] Inamori Y, Kato Y, Kubo M, Baba K, Ishida T, Nomoto K, et al. The biological actions of deoxypodophyllotoxin (anthricin). I. Physiological activities and conformational analysis of deoxypodophyllotoxin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1985;33:704-9.
- [72] Zhu X, Wu BJ, Luo HW, et al., Preparation of solid inclusion complex of deoxypodophyllotoxin- SBE- β -CD and its antitumor activity. *Journal of China Pharmaceutical University* 2010;41:447- 50.
- [73] Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol* 2008;36:30-42.
- [74] Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology* 2005;43:1451-9.
- [75] Aisner J, Lee EJ. Etoposide. Current and future status. *Cancer* 1991;67:215-9.
- [76] Bontenbal M, Planting AS, Verweij J, de Wit R, Kruit WH, Stoter G, et al. Second-line chemotherapy with long-term low-dose oral etoposide in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995;34:185-9.
- [77] Khaled M, Belaaloui G, Jiang ZZ, Zhu X, Zhang LY. Antitumor effect of Deoxypodophyllotoxin on human breast cancer xenograft transplanted in BALB/c nude mice model. *J Infect Chemother* 2016;22:692-6.
- [78] O'Brien ME, Leonard RC, Barrett-Lee PJ, Eggleton SP, Bizzari JP. Docetaxel in the community setting: an analysis of 377 breast cancer patients treated with docetaxel (Taxotere) in the UK. UK Study Group. *Ann Oncol* 1999;10:205-10.
- [79] Kouroussis C, Androulakis N, Kakolyris S, Souglakos J, Kotsakis T, Mavroudis D, et al. Dose-escalation study of docetaxel in combination with mitoxantrone as first-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:862-9.

- [80] Ravdin PM, Burris HA, Cook G, Eisenberg P, Kane M, Bierman WA, et al. Phase II trial of docetaxel in advanced anthracycline-resistant or anthracenedione-resistant breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1995;13:2879-85.
- [81] Qin YY, Li H, Guo XJ, Ye XF, Wei X, Zhou YH, et al. Adjuvant chemotherapy, with or without taxanes, in early or operable breast cancer: a meta-analysis of 19 randomized trials with 30698 patients. *PLoS One* 2011;6:e26946.
- [82] Wang S, Xie Y. *China Species Red List (Vol. 1)*. Beijing: Higher Education Press 2004;324.
- [83] Fu LG. *Chinese Plant Red Book*: Science Press, Beijing, China, 1992.
- [84] Qiu YX, Zhou X W, Fu C X, et al. A preliminary study of genetic variation in the endangered, Chinese endemic species *Dysosma versipellis* (Berberidaceae). *Bot Bull Acad Sin* 2005;46:61–9.
- [85] Qiu YX, Guan BC, Fu CX, Comes HP. Did glacials and/or interglacials promote allopatric incipient speciation in East Asian temperate plants? Phylogeographic and coalescent analyses on refugial isolation and divergence in *Dysosma versipellis*. *Mol Phylogenet Evol* 2009;51:281-93.
- [86] Adlercreutz H. Lignans and human health. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007;44:483-525.
- [87] Guo X. *Toxic Herbs Drugs Dictionary*. Tianjin: Tianjin Sci-Tech Translation Publishers pp 1992:14-6.
- [88] Shang MY, Xu, L.S., Li, P., Xu, G.J. Study on pharmacodynamics of Chinese herbal drug Guijiu and its lignin. *Chin Tradit Herbal Drugs* 2002;33:722-4.
- [89] Gao XH, Liu, M.C., Jin, L.H., Song, B.A., Hu, D.Y., Yang, S. Study on chemical constituents from rootstalk of *Dysosma versipellis* grown in Guizhou. *Lishizhen Med Mater Med Res* 2011;22:871-3.
- [90] Jiang RW, Zhou JR, Hon PM, Li SL, Zhou Y, Li LL, et al. Lignans from *Dysosma versipellis* with inhibitory effects on prostate cancer cell lines. *J Nat Prod* 2007;70:283-6.
- [91] Xu X, Gao X, Jin L, Bhadury PS, Yuan K, Hu D, et al. Antiproliferation and cell apoptosis inducing bioactivities of constituents from *Dysosma versipellis* in PC3 and Bcap-37 cell lines. *Cell Div* 2011;6:14.
- [92] Man L, Sunnasse A, Luo Z, Liang L. Toxicology of *Dysosma versipallis* rhizome: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010;4:717-21.
- [93] College JNM. *Dictionary of Chinese Traditional Medicine*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press 1986.
- [94] Yu PZ, Wang LP, Chen ZN. A New Podophyllotoxin-Type Lignan from *Dysosma versipellis* var. *tomentosa*. *Journal of Natural Products* 1991;54:1422-4.
- [95] Song LR HX, Ding XL. *Modern Chinese Materia Medica Lexicon*. Beijing, People Health Publishing House 2001:24-6.
- [96] Gong X, Li YC. Clinical and Electrophysiologic Analysis of 17 cases of *Dysosma Versipallis* Rhizome Poisoning. *Apoplexy Nervous Dis* 2007;27:114.
- [97] Jin ZD, Yuan J. A Toxic Encephacopathy by misuse of *Dysosma Versipallis* Rhizome Medicinal Wine. *Chin J Chin Materia Medica* 2003;28:477.
- [98] Chang LW, Yang CM, Chen CF, Deng JF. Experimental podophyllotoxin (bajiaolian) poisoning: I. Effects on the nervous system. *Biomed Environ Sci* 1992;5:283-92.
- [99] Feng NH, Cai SR. A Fatal *Dysosma Versipallis* Rhizome Poisoning. *Clin Focus* 2003;18:226-7.
- [100] Chen YT. A Fatal Fibrillation Atrial and Coagulopathy by *Dysosma Versipallis* Rhizome Poisoning. *Chin J Prim Med Pharm* 2004;11:1330.

- [101] Wang LL Zhou YJ. Advances of KTS Podophyllotoxin and Derivatives. *Medicine Abroad (autonomic drug fascicule)* 2006;21:6-9.
- [102] Xia LY. *Modern Chinese Drugs Toxicology*. Tianjin Sci-Tech Translation Publishers 2005:556-7.
- [103] Lacave R, Larsen CJ, Jacques R. *Cancérologie fondamentale.*: John Libbey Eurotext., 2005.
- [104] Lebret T, Méjean A. Rapport AFU 2008 : Les métastases des cancers urologiques Physiopathologie de la métastase : du primitif au secondaire. *Progrès en Urologie* 2008;18:S147-S55.
- [105] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003;36:131-49.
- [106] Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. In: Associates. SMS, editor: *The Eukaryotic Cell Cycle*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>, 2000.
- [107] Meijer L. Le cycle cellulaire et sa régulation. *Bull Cancer* 2006;93:41-53.
- [108] Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:139-45.
- [109] Pommier Y, Kohn KW. [Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]. *Med Sci (Paris)* 2003;19:173-86.
- [110] Kresge N, Simoni RD, Hill RL. The Process of Reversible Phosphorylation: the Work of Edmond H. Fischer. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:e1-e2.
- [111] Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, et al. Cyclin E and Survival in Patients with Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2002;347:1566-75.
- [112] Wingate H, Puskas A, Duong M, Bui T, Richardson D, Liu Y, et al. Low molecular weight cyclin E is specific in breast cancer and is associated with mechanisms of tumor progression. *Cell Cycle* 2009;8:1062-8.
- [113] Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 2005;4:1201-15.
- [114] Nguyen HH, Aronchik I, Brar GA, Nguyen DH, Bjeldanes LF, Firestone GL. The dietary phytochemical indole-3-carbinol is a natural elastase enzymatic inhibitor that disrupts cyclin E protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19750-5.
- [115] Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ. Human and Yeast Cdk-activating Kinases (CAKs) Display Distinct Substrate Specificities. *Molecular Biology of the Cell* 1998;9:2545-60.
- [116] Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003;13:65-70.
- [117] Bloom J, Pagano M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 2003;13:41-7.
- [118] Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:309-15.
- [119] Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1427-38.
- [120] Beaver JA, Amiri-Kordestani L, Charlab R, Chen W, Palmby T, Tilley A, et al. FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2015;21:4760-6.
- [121] Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2016;375:1925-36.

- [122] Siemeister G, Luecking U, Wagner C, Detjen K, Mc Coy C, Bosslet K. Molecular and pharmacodynamic characteristics of the novel multi-target tumor growth inhibitor ZK 304709. *Biomed Pharmacother* 2006;60:269-72.
- [123] Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 2003;13:1775-85.
- [124] Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007;448:811-5.
- [125] Mettus RV, Rane SG. Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice. *Oncogene* 2003;22:8413-21.
- [126] Davis ST, Benson BG, Bramson HN, Chapman DE, Dickerson SH, Dold KM, et al. Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science* 2001;291:134-7.
- [127] Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F378-84.
- [128] Lloyd RK. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors and Combination Therapy. *Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases as Anti-tumor Agents*. CRC Press 2006:371-88.
- [129] Conde C, Caceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:319-32.
- [130] Andrieux A, Salin PA, Job D. Un rôle pour les microtubules dans les pathologies psychiatriques ? *Pathologie Biologie* 2004;52:89-92.
- [131] Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 1998;178:207-75.
- [132] Oakley CE, Oakley BR. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 1989;338:662-4.
- [133] O'Toole E, Greenan G, Lange KI, Srayko M, Müller-Reichert T. The Role of γ -Tubulin in Centrosomal Microtubule Organization. *PLoS ONE* 2012;7:e29795.
- [134] Dutcher SK. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:49-54.
- [135] Arnal I, Sassoon I, Tournebize R. Dynamique du fuseau : vers une cible anti-cancéreuse. *Med Sci (Paris)* 2002;18:1227-35.
- [136] Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:83-117.
- [137] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984;312:237-42.
- [138] Carlier MF. Nucleotide hydrolysis regulates the dynamics of actin filaments and microtubules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1992;336:93-7.
- [139] Hyman AA, Salser S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* 1992;3:1155-67.
- [140] Chretien D, Jainosi I, Taveau JC, Flyvbjerg H. Microtubule's conformational cap. *Cell Struct Funct* 1999;24:299-303.
- [141] Ganguly A, Yang H, Sharma R, Patel KD, Cabral F. The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *J Biol Chem* 2012;287:43359-69.
- [142] Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell* 2001;12:971-80.
- [143] Pepperkok R, Bre MH, Davoust J, Kreis TE. Microtubules are stabilized in confluent epithelial cells but not in fibroblasts. *J Cell Biol* 1990;111:3003-12.

- [144] Hayden JH, Bowser SS, Rieder CL. Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol* 1990;111:1039-45.
- [145] Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996;56:816-25.
- [146] Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 1999;17:1061-70.
- [147] Meijer L, Jézéquel A, Roberge M. Cell cycle regulators as therapeutic targets.: *Progress in cell cycle research.*, 2003.
- [148] Nicolaou KC, Cho SY, Hughes R, Winssinger N, Smethurst C, Labischinski H, et al. Solid- and solution-phase synthesis of vancomycin and vancomycin analogues with activity against vancomycin-resistant bacteria. *Chemistry* 2001;7:3798-823.
- [149] Long BH, Carboni JM, Wasserman AJ, Cornell LA, Casazza AM, Jensen PR, et al. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res* 1998;58:1111-5.
- [150] Hamel E. Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. *Med Res Rev* 1996;16:207-31.
- [151] Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010;9:790-803.
- [152] Speicher LA, Laing N, Barone LR, Robbins JD, Seamon KB, Tew KD. Interaction of an estramustine photoaffinity analogue with cytoskeletal proteins in prostate carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1994;46:866-72.
- [153] Hait WN, Rubin E, Alli E, Goodin S. Tubulin Targeting Agents. *Update on Cancer Therapeutics* 2007;2:1-18.
- [154] Johnson IS. Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer Chemother Rep* 1968;52:455-61.
- [155] Capasso A. Vinorelbine in cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2012;13:1065-71.
- [156] Dorchin M, Masoumi Dehshiri R, Soleiman S, Manashi M. Evaluation of neuropathy during intensive vincristine chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma and Acute Lymphoblastic Leukemia. *Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2013;3:138-42.
- [157] Smith GA. Current status of vinorelbine for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 1995;9:767-73.
- [158] Kitchens CA, McDonald PR, Shun TY, Pollack IF, Lazo JS. Identification of Chemosensitivity Nodes for Vinblastine through Small Interfering RNA High-Throughput Screens. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2011;339:851-8.
- [159] Mukhtar E, Adhami VM, Mukhtar H. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 2014;13:275-84.
- [160] Huizing MT, Giaccone G, van Warmerdam LJ, Rosing H, Bakker PJ, Vermorken JB, et al. Pharmacokinetics of paclitaxel and carboplatin in a dose-escalating and dose-sequencing study in patients with non-small-cell lung cancer. *The European Cancer Centre. J Clin Oncol* 1997;15:317-29.
- [161] Flores JP, Saif MW. Novel oral taxane therapies: recent Phase I results. *Clinical investigation* 2013;3:333-41.
- [162] Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973;7:253-66.

- [163] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-54.
- [164] Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-98.
- [165] Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267-93.
- [166] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- [167] Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 1994;19:26-30.
- [168] Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 2008;15:1113-23.
- [169] Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415-30.
- [170] Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005;37:719-27.
- [171] Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-98.
- [172] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-90.
- [173] Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9:423-32.
- [174] Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-92.
- [175] Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:505-10.
- [176] Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.
- [177] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
- [178] Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:259-81.
- [179] Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;256:27-33.
- [180] Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003;15:983-92.
- [181] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
- [182] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:897-907.
- [183] Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968;217:370-1.
- [184] Kindred B. Can tolerant allogeneic cells restore nude mice? *Cell Immunol* 1975;20:241-6.
- [185] Weisz-Carrington P, Schrater AF, Lamm ME, Thorbecke GJ. Immunoglobulin isotypes in plasma cells of normal and athymic mice. *Cell Immunol* 1979;44:343-51.
- [186] Malynn BA, Blackwell TK, Fulop GM, Rathbun GA, Furley AJ, Ferrier P, et al. The scid defect affects the final step of the immunoglobulin VDJ recombinase mechanism. *Cell* 1988;54:453-60.

- [187] Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966;8:295-309.
- [188] Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 1991;9:323-50.
- [189] Roder J, Duwe A. The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature* 1979;278:451-3.
- [190] Dubois-Lafforgue D, Mogenet L, Thebault K, Jami J, Krief P, Boitard C. Proinsulin 2 knockout NOD mice: a model for genetic variation of insulin gene expression in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S489-93.
- [191] Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;324:53-76.
- [192] Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2007;2:247-50.
- [193] Jung J. Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. *Toxicological Research* 2014;30:1-5.
- [194] Hsu AR, Hou LC, Veeravagu A, Greve JM, Vogel H, Tse V, et al. In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin alphavbeta3 in an orthotopic glioblastoma model. *Mol Imaging Biol* 2006;8:315-23.
- [195] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453-8.
- [196] Yano S, Muguruma H, Matsumori Y, Goto H, Nakataki E, Edakuni N, et al. Antitumor vascular strategy for controlling experimental metastatic spread of human small-cell lung cancer cells with ZD6474 in natural killer cell-depleted severe combined immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2005;11:8789-98.
- [197] Kakhki VR, Shahriari S, Treglia G, Hasanzadeh M, Zakavi SR, Yousefi Z, et al. Diagnostic performance of fluorine 18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging for detection of primary lesion and staging of endometrial cancer patients: systematic review and meta-analysis of the literature. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23:1536-43.
- [198] Cook N, Jodrell DI, Tuveson DA. Predictive in vivo animal models and translation to clinical trials. *Drug Discovery Today* 2012;17:253-60.
- [199] Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:338-50.
- [200] Moro M, Bertolini G, Tortoreto M, Pastorino U, Sozzi G, Roz L. Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:568567.
- [201] Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 2007;7:645-58.
- [202] <http://www.tecenet.com/chanpin/show-553470.html>.
- [203] Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3671-5.
- [204] Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:40-5.
- [205] Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM. Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* 1996;315 (Pt 1):21-4.

- [206] Geran RI. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (3rd ed.). *Cancer Chemother Rep* 1972;3:51-61.
- [207] Zhu X, Huang JL, Wu BJ, Luo HW, Yin ZW, Wu CX. Inclusion complex of deoxypodophyllotoxin of cyclodextrin, preparation method, use for treatment of cancer thereof. United States: Zhu X, Huang JL, Wu BJ, Luo HW, Yin ZW, Wu CX, 2012.
- [208] <https://dctd.cancer.gov/FeaturedAgents/pdfs/SolidTumorModels.pdf>
- [209] McDonald ER, 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int J Oncol* 2000;16:871-86.
- [210] Arnal I, Wade RH. How does taxol stabilize microtubules? *Curr Biol* 1995;5:900-8.
- [211] Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biology and Toxicology* 1998;14:141-5.
- [212] Duriez PJ, Shah GM. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 1997;75:337-49.
- [213] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938-48.
- [214] Wang YR, Xu Y, Jiang ZZ, Guerram M, Wang B, Zhu X, et al. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in SGC-7901 cells and inhibits tumor growth in vivo. *Molecules* 2015;20:1661-75.
- [215] Dickson MA, Schwartz GK. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol* 2009;16:36-43.
- [216] Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2008;9:1002-11.
- [217] Holloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 1993;73:1393-402.
- [218] Van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* 2008;1786:49-59.
- [219] Guerram M, Jiang ZZ, Sun L, Zhu X, Zhang LY. Antineoplastic effects of deoxypodophyllotoxin, a potent cytotoxic agent of plant origin, on glioblastoma U-87 MG and SF126 cells. *Pharmacol Rep* 2015;67:245-52.
- [220] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:253-65.
- [221] Rowinsky EK, Donehower RC. Taxol: twenty years later, the story unfolds. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1778-81.
- [222] Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001;4:303-13.
- [223] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
- [224] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 1995;181:1661-72.
- [225] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995;182:367-77.
- [226] Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:463-70.
- [227] Juang SH, Pan WY, Kuo CC, Liou JP, Hung YM, Chen LT, et al. A novel bis-benzylidenecyclopentanone derivative, BPR0Y007, inducing a rapid caspase activation

- involving upregulation of Fas (CD95/APO-1) and wild-type p53 in human oral epidermoid carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 2004;68:293-303.
- [228] Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:942-8.
- [229] Liu MJ, Wang Z, Li HX, Wu RC, Liu YZ, Wu QY. Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;194:141-55.
- [230] Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
- [231] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;19:107-20.
- [232] Jung CH, Kim H, Ahn J, Jung SK, Um MY, Son KH, et al. Anthricin Isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells by Inhibiting Akt/mTOR Signaling, and Its Apoptotic Effects Are Enhanced by Autophagy Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:385219.
- [233] <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#culturemethod>.
- [234] Arigony AL, de Oliveira IM, Machado M, Bordin DL, Bergter L, Pra D, et al. The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *Biomed Res Int* 2013;2013:597282.
- [235] Chow LW, Loo WT. The differential effects of cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil on apoptotic marker (CPP-32), pro-apoptotic protein (p21(WAF-1)) and anti-apoptotic protein (bcl-2) in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:239-44.
- [236] Stadler WM, Ratain MJ. Development of target-based antineoplastic agents. *Invest New Drugs* 2000;18:7-16.
- [237] Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett* 2007;251:168-78.
- [238] Wu J. Statistical inference for tumor growth inhibition T/C ratio. *J Biopharm Stat* 2010;20:954-64.
- [239] Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 2009;9:S73-S81.
- [240] Ponc RM, Peddi P, Callahan RD. PARP Inhibitors in Breast Cancer: Latest Evidence. *Current Breast Cancer Reports* 2017;9:188-94.

ANNEXES

ANNEXE 1 : FORMULES DES TAMPONS ET DES RÉACTIFS

1- Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline : PBS) (pH 7.4)

Composants	Quantités/litres
NaCl	8.0 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	3.63 g/l
KH ₂ PO	0.24 g/l
Eau distillée	1000ml

Directions

- ✓ Dissoudre les composants solides dans un litre d'eau distillée.
- ✓ Ajuster le pH à 7.4.
- ✓ Autoclaver la solution, avant l'utilisation, pour la stériliser.

2- Solution Trypsine/EDTA à 0.25%

Composants	Quantités/litres
EDTA	0.010 g
Trypsine	0.250 g
PBS	100 ml

Directions

- ✓ Dissoudre les composants solides dans 100 ml de PBS en utilisant l'agitateur magnétique.
- ✓ Filtrer la solution de Trypsine/EDTA sous une hotte à flux laminaire en utilisant un filtre stérile de 0.22 µm.

3- TBS (Tris-Buffered Saline)

25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7.4

	1x TBS	10x TBS
NaCl	4g	40g
Tris base	1.21g	12.1g

Directions

- ✓ Dissoudre tous les réactifs secs ensemble dans 400 ml d'eau distillée.
- ✓ Ajuster le pH à 7.4 en utilisant HCl.
- ✓ Ajouter de l'eau distillée à un volume final de 0.5 l.
- ✓ Stériliser par autoclavage.

4- TBST (Tris-Buffered Saline avec Tween)

0.1% Tween-20 dans 1x Tris-Buffered Saline - pH 7.4

20% Tween-20.....0.1 ml
10x TBS..... 50 ml
Eau distillée449.9 ml

Directions

- ✓ Ajouter 50 ml de 10x TBS aux 449.9 ml d'eau distillée.
- ✓ Ajouter 0.1 ml de Tween-20 et mélanger.

5- TBS-Triton X (Tris-Buffered Saline avec Triton X)

Triton X-100..... 0.25 ml
10x TBS.....50 ml
Eau distillée449.75 ml

Directions

- ✓ Ajouter 50 ml de 10x TBS aux 449.75 ml d'eau distillée
- ✓ Ajouter 0.25 ml de Triton X-100 et mélanger.

6- Solution de blocage: Albumine Sérique Bovine (BSA)

BSA5 g
PBS100 ml

7- 4% Paraformaldéhyde - pH 7.4

Paraformaldéhyde4 g
10N NaOH2 gouttes
PBS10 ml
Eau distillée 90 ml

Directions

- ✓ Chauffer 90 ml d'eau distillée à 60 °C (sur une plaque chauffante ou dans un four à micro-ondes).
- ✓ Ajouter 4 g de paraformaldéhyde tout en agitant l'eau distillée à 60 °C.
- ✓ Ajouter 2 gouttes d'hydroxyde de sodium 10 N (NaOH) et continuer à remuer.
- ✓ Laisser la solution remuer jusqu'à ce que le paraformaldéhyde se dissout (~ 30 min).
- ✓ Ajouter 10 ml de PBS 10x et mélanger.
- ✓ Ajouter de l'eau distillée à un volume final de 250 ml.

8- Réactifs du Western Blot

8-1- Tampon d'électrophorèse (Running buffer) (10x)

Tris (MW-121.14).....	30.3g
Glycine (MW 75.07).....	144.0g
SDS (MW 288.4).....	10.0g
Eau distillée	1000ml

8-2- Tampon de transfert (Transfer Buffer)

	1x	10x
Tris (MW 121.14)	14.41g	144.13g
Glycine (MW75.07)	3.02g	30.28g

Directions

- ✓ Ajouter de l'eau distillée (quantité suffisante pour 1000ml)
- ✓ Juste avant l'utilisation: mélanger 100 ml de tampon de transfert 10x avec 200 ml de méthanol et 700 ml d'eau distillée pour obtenir le tampon de transfert final 1x prêt à l'utilisation.

8-3- Gel SDS-PAGE

- ✓ **30% PAGE:** Acrylamide (Acr) (29.2g), méthylène bisacrylamide (Bic) (0.8g)
- Préparer dans un volume d'eau désionisée de 100 ml.
- Placer dans des bouteilles brunes maintenues dans un réfrigérateur à 4 °C.

- ✓ **1.5mol/L Tris/HCL (pH8.8):** 90.75g de base de Tris, 400 ml d'eau désionisée avec 1 mol/l HCl.
- Ajuster le pH à 8.8
- Ajouter un volume constant d'eau désionisée jusqu'à 500 ml
- Conserver au réfrigérateur à 4 °C.

- ✓ **0.5mol/L Tris/HCL (pH6.8):** 12g de base de Tris base 12g, 120 ml d'eau désionisée avec 1 mol/l HCl.
- Ajuster le pH à 6.8
- Ajouter un volume constant d'eau désionisée jusqu'à 200 ml
- Conserver au réfrigérateur à 4 °C.

- ✓ **10% SDS:** 10g SDS 10g, 100ml d'eau désionisée
- Bien mélanger à température ambiante.

- ✓ **10% ammonium persulfate (AP):** 0.1 g d'AP dissout dans 1ml d'eau désionisée et stocké à 4 °C pendant au maximum une semaine.

8-3- TBS: Voir au-dessus

8-4- TBST: Voir au-dessus

ANNEXE 2 : PUBLICATIONS

Med Chem Res
DOI 10.1007/s00044-017-1844-7



ORIGINAL RESEARCH

Deoxypodophyllotoxin, a semi-synthetic compound from *Dysosma versipellis*, induces selective cell death in human breast cancer cell lines

Meyada Khaled^{1,2,3} · Ghania Belaaloui^{3,4} · Zhen-Zhou Jiang^{5,6} · Xiong Zhu⁷ · Lu-Yong Zhang⁵

Received: 20 May 2016 / Accepted: 2 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Biologically active compounds isolated from medicinal herbs have been the center of interest for researchers to investigate their possible effects and mechanisms through which they exert their action. In the current study, we investigated the antiproliferative effect and the mechanism of action of deoxypodophyllotoxin, a semi-synthetic compound derived from the extract of a Chinese herbal medicine, *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying (Berberidaceae). The study was conducted on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. The antiproliferative effect of deoxypodophyllotoxin was assessed by the Cell Counting Kit-8 assay. Flow cytometry, Annexin V/PI, mitochondrial membrane potential, caspase

inhibition assays, and western blot analysis were performed to detect, explore, and assess the antiproliferative effect of deoxypodophyllotoxin. Our data revealed that, deoxypodophyllotoxin treatment resulted in a dose-responsive inhibition of MCF-7 and MDA-MB-231 cell growth with very low IC₅₀ (10.91 and 20.02 nM, respectively). It disrupted the cytoskeleton and induced significant cell cycle arrest at the G2/M phase in both cell lines through the interference with cell cycle regulatory proteins: cyclin B1, cdc25c, and CDK1. In MCF-7 cells, cell cycle inhibition was associated with apoptosis, which was caspase-dependent and involved elevation of Bax protein and a cleavage of PARP, this finding along with disruption of mitochondrial membrane potential, confirmed the involvement of intrinsic pathway in deoxypodophyllotoxin-induced apoptosis in MCF-7 cells. However, in MDA-MB-231 cells, deoxypodophyllotoxin is cytostatic and significantly suppresses proliferation by cell cycle arrest at G2/M phase without apoptotic induction. Such an activity of deoxypodophyllotoxin could be expected to spare normal tissues from toxic side effects.

✉ Ghania Belaaloui
gbelaaloui@yahoo.fr

✉ Lu-Yong Zhang
lyzhang@cpu.edu.cn

¹ Department of Biology of Organisms, Faculty of Life and Natural Sciences, Batna 2 University, Fesdis, Batna 05000, Algeria

² Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Batna 2 University, Road Tazoult, Batna 05000, Algeria

³ Laboratory of Acquired and Constitutional Genetic Diseases (MAGECA), Faculty of Medicine, Batna 2 University, Batna 05000, Algeria

⁴ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Batna 2 University, City Ezzouhour, Batna 05000, Algeria

⁵ Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening, China Pharmaceutical University, 24 Tong Jia Xiang, Nanjing 210009, P.R. China

⁶ Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, 24 Tong Jia Xiang, Nanjing 210009, P.R. China

⁷ Medical and Chemical Institute, China Pharmaceutical University, 24 Tong Jia Xiang, Nanjing 210009, P.R. China

Keywords DPT · Antiproliferative activity · G2/M phase · Tubulin · Cytostatic · Cytotoxic

Introduction

Breast cancer (BC) is the second most common cancer worldwide after lung cancer and the leading cause of cancer death in women. The global burden of BC exceeds all other cancers and its incidence rates are increasing (Ferlay et al. 2012). More than 60% of BCs express estrogen receptor

Published online: 15 March 2017

Springer

(ER). In general, patients with ER-positive BC have longer disease-free survival and overall survival than women with ER-negative BC (McGuire et al. 1978; Thorpe et al. 1987; Sheikh et al. 1994).

Phytoestrogens, a group of non-steroidal compounds that are widely distributed in plants, are structurally or functionally similar to mammalian estrogens. They can weakly bind to estrogen receptors and then promote or inhibit estrogen effects (Messina and Loprinzi 2001). Thus, they have been suggested to play an important role in the prevention of cancers (Adlercreutz 2002). As estrogen agonists, phytoestrogens mimic endogenous estrogens and induce estrogenic effects; also they may prevent estrogenic activity, acting as estrogen antagonists, through inhibition or alteration of ER causing antiestrogenic effects (Brzezinski and Debi 1999). The major phytoestrogens are isoflavones and lignans (Lee and Xiao 2003). Podophyllotoxin, a naturally occurring aryltetralin lignan (Fig. 1a), exhibits antitumor and anti-proliferative activity in several cancer cells (Ikeda et al. 1998; Muto et al. 2008). The class of podophyllotoxins includes also several closely-related chemical structures especially deoxypodophyllotoxin (DPT) and some cytostatic agents, such as etoposide and teniposide, semi-synthetic agents of podophyllotoxin, used to treat multiple cancers (Khaled et al. 2013).

DPT (Fig. 1b), a phytochemical compound, was found to bind and inhibit the polymerization of tubulin, the fundamental monomeric subunit of microtubules, leading to cell cycle arrest at G2/M phase and apoptosis through caspases-3 and 7 activation (Roulland et al. 2002).

In the current study, DPT was extracted from *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying (Berberidaceae), one of the important traditional Chinese herbal medicines endemic to China (Wang and Xie 2004), mainly grown in regions of the Zhejiang province, Jiangxi province, and Hubei province (Guo 1992). It is a natural source of podophyllotoxin, DPT and several other compounds (Jiang et al. 2007) known to have antitumor activities (Yu et al. 1991; Jiang et al. 2007).

Previous studies investigated DPT antiproliferative activity on certain neoplastic cells (Khaled et al. 2013; Wang et al. 2015). In the present study, we addressed the question whether the semi-synthetic DPT induces cell cycle arrest and apoptosis in both ER-positive MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 BC cells. Triple negative BCs (TNBC) lack the expression of ER, progesterone receptors, and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2). They have generally, poorer prognosis than BCs expressing these receptors. While ER+ and PR+ tumors benefit from hormone therapy and tumors that have amplified HER-2/Neu are treated with a monoclonal antibody targeting HER-2/Neu in addition to chemotherapy, TNBC are treated with only chemotherapy. Hence, we

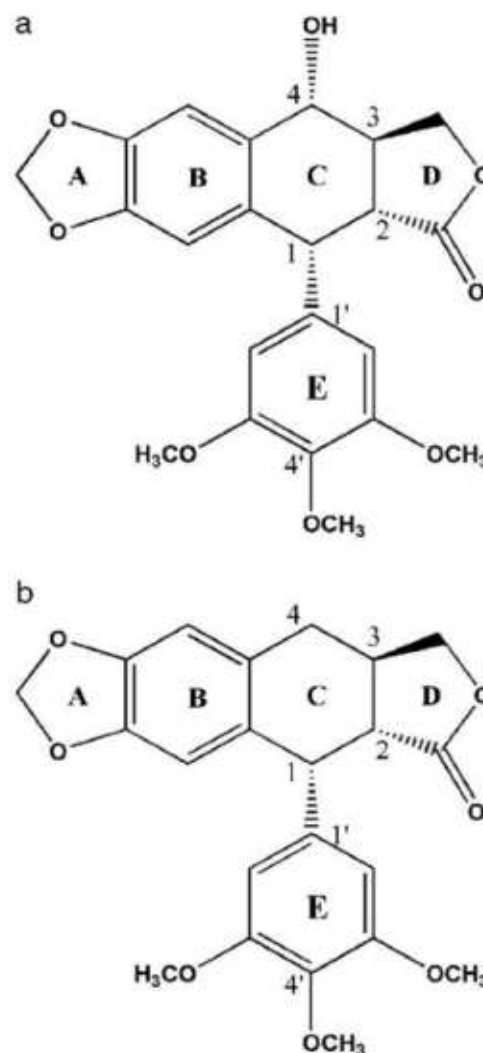


Fig. 1 Chemical structure of podophyllotoxin a and deoxypodophyllotoxin b

chose MCF-7 and MDA-MB-231 BC cells as two in vitro models of BCs with differential outcome.

Materials and methods

Drugs

DPT (MW 398 g/mol) was provided by China Pharmaceutical University Research Institute of Pharmaceutical Chemistry. It was obtained as a white powder of high purity (> 98%). A 10^{-2} M stock solution of DPT was prepared in dimethyl sulfoxide (Sigma, USA). Etoposide (Purity > 98%) was purchased from the National Institute for Food and Drug Control (NIFDC, China). Taxol (30 mg/5 ml) (Purity > 99.5%) was purchased from Shenzhen Main Luck

Pharmaceuticals Inc. (China). All drugs were diluted in serum-free media.

Cell lines and cell culture

MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HyClone, USA) or Leibovitz's medium (L15) (HyClone, USA), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Beyotime Biotechnology, China). As recommended by the American Type Culture Collection (ATCC), cultures were incubated in a humidified incubator at 37 °C, with 5% CO₂ for MCF-7 cells but without CO₂ for MDA-MB-231 cells.

Cell proliferation assay (CCK-8)

Cell proliferation was colorimetrically evaluated with the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) according to the manufacturer's instruction. Briefly, exponentially growing MCF-7 (1×10^4) and MDA-MB-231 (1.5×10^4) cells were seeded in 96-well plates. After 24 h incubation, cells were exposed to serial different DPT concentrations (1 nM–1 mM) and to etoposide (positive control) in parallel for comparison, with three wells per concentration. After 72 h drugs exposure, the CCK-8 solution was added to each well and the cells were incubated for additional 1–4 h at 37 °C. The absorbance intensity of each well was measured with Bio-Rad 680 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 450 nm. The absorbance of the drug-treated wells was compared with untreated well (negative control). The inhibitory rate of cell proliferation was calculated as: $(OD_{\text{control}} - OD_{\text{treated sample}}) / OD_{\text{control}} \times 100$. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated using the dose–response fitted curves (Origin Labs OriginPro v8.0).

Cell morphology assessment by light microscopy

To gain an initial insight into the effects of DPT on cell morphology, human BC cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were seeded in 6-well tissue culture plates and cultured under the conditions indicated above. When the cells density reached approximately 80% confluence, they were treated with DPT (20 nM) and incubated for different lengths of time ranging from 12 to 48 h. The morphological changes were monitored using an inverted phase contrast microscopy (Olympus IX71, Tokyo, Japan).

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was assayed by determining DNA content. BC cells were incubated in complete growth

medium in the presence or absence of increasing concentrations of DPT (5, 10, and 20 nM) for different time periods (12, 24, 36, and 48 h). Briefly, cells were trypsinized, suspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 70% ice-cold ethanol at 4 °C overnight. Fixed cells were collected by centrifugation, rinsed with PBS and resuspended in staining buffer containing RNase A and propidium iodide (PI) (Beyotime Biotechnology, China) for 30 min in the dark. The percentages of cell distribution in G1, G2/M and S phases were determined by flow cytometry. Data were acquired using CellQuest 6.0 software (BD Biosciences, USA) and cell cycle analysis was performed using ModFit LT version 3.2 software (BD Biosciences, USA).

Detection of apoptotic cells

Apoptotic cells were determined by an Annexin-V/PI double staining assay using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells without DPT (control) and treated cells with different concentrations of DPT (5, 10, and 20 nM) and Taxol (positive control) for different time periods, were harvested, washed with cold PBS and then stained with labeling solution containing FITC-labeled annexin V and PI for 15 min in the dark at room temperature. Subsequently, the samples were subjected to flow cytometry using a fluorescence-activated cell sorting flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). The cells in early stages of apoptosis were annexin V positive and PI negative, whereas those in late stages of apoptosis were both annexin V and PI positive.

Immunofluorescence staining assay

Tumor cells cultivated on sterile glass coverslips were either untreated or treated with DPT (20 nM) and Taxol (positive control) for 12–48 h. Following drug treatment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and washed with tris buffered saline tween 20 (TBST) for 5 min at room temperature. Then, the cells were blocked by 5% bovine serum albumin (Sunshine, China) and stained with a mouse monoclonal antibody anti- α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, USA) for 1 h at room temperature. Subsequently, the cells were washed with TBST to remove excess antibody and then stained with Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody and with DNA stain Hoechst 33258 dye (Invitrogen, CA, USA) in the dark for 30 min at 37 °C. Finally, the slides were mounted with antifade mounting medium and observed with an Olympus IX71 fluorescence microscope (Tokyo, Japan).

Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) is the hallmark for apoptosis (Green and Reed 1998). The fluorescent cationic dye, JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) purchased from Beyotime Biotechnology (Nanjing, China), was used to reveal the loss of $\Delta\Psi_m$ (Smiley et al. 1991). In healthy non-apoptotic cells with high $\Delta\Psi_m$, the dye stains the mitochondria bright orange red. When the $\Delta\Psi_m$ collapses in apoptotic cells, the red/green fluorescence intensity ratio decreases (Cossarizza et al. 1993). In brief, cancer cells were seeded in 6-well plates. After DPT treatment (20 nM) for 12 to 48 h, cells were washed with PBS and stained with JC-1 in the dark for 30 min at 37 °C. The anti-mitochondrial agent carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was used as positive control. After the incubation, cells were washed twice with JC-1 staining buffer and then 2 ml of cell culture medium were added to each well. Fluorescent images were visualized by a fluorescent microscope (Olympus IX71, Tokyo, Japan).

Caspase inhibition assay

The *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) is a cell-permeable pan-caspase inhibitor that irreversibly inhibits caspase-mediated apoptosis by preventing the conversion of pro-caspases to their active forms (Slee et al. 1996). To study the involvement of caspases in DPT-induced apoptosis, seeded cells in 96-well plates either untreated or pretreated for 4 h with 100 μ M of pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (Beyotime Biotechnology, China), before exposure to DPT (20 nM) for 48 and 72 h. Cell viability was then measured using CCK-8 assay as described above.

Western blotting analysis

Untreated or treated cells with DPT for different time periods were washed with ice-cold PBS, and then proteins were extracted using the KeyGEN Total Protein Extraction Kit (KeyGEN, China) following the manufacturer's instructions. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid kit (Thermo, USA). Protein extracts were frozen at -80 °C until use. For western blot analysis, equal amounts of protein extracts were electrophoresed on 10% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (0.22 mm) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) by electroblotting. After blocking in 5% non-fat milk, the membranes were incubated overnight with specific primary antibodies at 4 °C. Antibodies against cyclin B1,

cdc25c, CDK1, PARP, Bax, Bcl2, and β -actin were purchased from cell signaling technology, USA. The next day, the immunoreaction was continued with the appropriate secondary antibodies for 1 h at 37 °C. Protein bands on PVDF membranes were assessed with the ChemiDoc XRS imaging densitometer (Bio-Rad), using the Quantity One software program (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Statistical analysis

Results were expressed as median \pm median absolute deviation (MAD) of three separate experiments. Statistical differences between control and treated groups were determined by Kruskal–Wallis non parametric test in case of unmatched groups or Friedman's non parametric test in case of matched groups. The criterion for significance was set at *P*-value < 0.05.

Results

DPT inhibits tumor cells proliferation

The effect of DPT on human BC cells proliferation was assessed by CCK-8 assay. As shown in (Fig. 2), with increasing doses of DPT, proliferation inhibitory rates of treated cells were gradually increased compared to untreated cells. Thus, DPT was found to inhibit the growth of tumor cells in a concentration-dependent manner. Furthermore, DPT significantly suppressed MCF-7 and MDA-MB-231 cells proliferation at very low concentrations (IC₅₀ 10.91 and 20.02 nM, respectively) compared to positive control. The obtained IC₅₀ values were summarized in Table 1.

DPT induced G2/M phase cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

Fundamental alterations in the genetic control of cancer cell division have been observed, resulting in an unrestrained cell proliferation (Vermeulen et al. 2003). Thus, the induction of cell cycle arrest is considered as an important target for cancer therapy (McDonald and El-Deiry 2000). The inhibition of proliferation observed with DPT could be due to its effect on cell cycle, to the induction of apoptosis or both. To elucidate whether DPT growth inhibitory effects were due to cell cycle arrest, flow cytometry analysis was performed. As shown in Fig. 3, DPT treatment resulted in significant dose-dependent and time-dependent accumulation of cells in the G2/M phase accompanied by a concomitant decrease in G1 phase compared to control, which suggested that DPT enhanced inhibitory effect in MCF-7 and MDA-MB-231 cells was a result of G2/M phase inhibition. DPT caused dose-dependent accumulation in G2/M

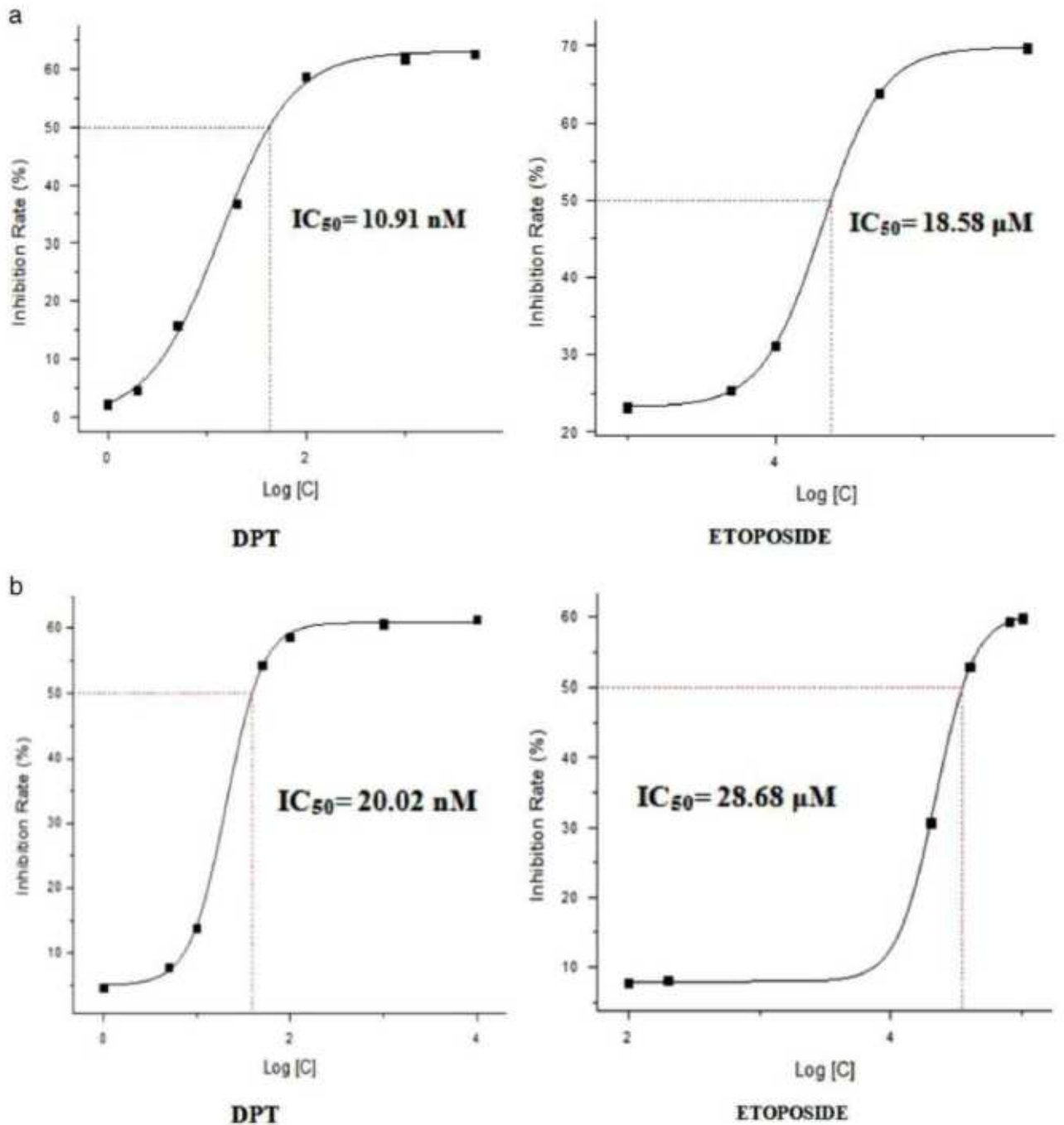


Fig. 2 Cell proliferation analysis of DPT in MCF-7 (a) and MDA-MB-231 (b) cells by CCK-8 method. Cells were grown to confluence in 96 well-plates. Then, they were either untreated (control) or treated with different concentrations of DPT (1n M-1 mM) and etoposide (positive control) for 72 h. After treatment, CCK-8 was added and cells

were incubated for additional 1–4 h at 37 °C. The optical density in control and drug-treated wells was measured at 450 nm with Bio-Rad 680 microplate reader. Each concentration was used in triplicate. Curves represent the mean of the growth inhibition rate following the logarithm of treatment concentration

phase of the cell cycle, and following DPT (20 nM) exposure for 48 h, the percentage of MDA-MB-231 cells in G2/M fraction increased 5.2 fold against 2.67 fold in MCF-7 compared to vehicle control (Fig. 3a).

Meanwhile, DPT caused a pronounced dose-dependent accumulation in the G2/M phase of the cell cycle reaching a plateau at the doses of 10 and 20 nM, and a parallel reduction in the G1 phase (Fig. 3b). Furthermore, the sub-

Table 1 The obtained IC₅₀ values in human breast cancer cell lines after DPT-treatment and etoposide-treatment

Cell lines	DPT IC ₅₀ (nM) ^a	Etoposide ^b IC ₅₀ (nM) ^a	Etoposide IC ₅₀ / DPT IC ₅₀
MCF-7	10.91 ± 3.1	18580 ± 1900	1703.02
MDA-MB-231	20.02 ± 0.9	28680 ± 6300	1432.57

^a IC₅₀ values, expressed in nanomole (nM), are the median ± MAD of three independent experiments^b Positive control

G1 population, indicator of cell apoptosis, was detected in treated MCF-7 cells and increased from 2.6 to 40.4% after 48 h of DPT (20 nM) exposure. However, when evaluated against the control, the sub-G1 apoptotic fraction did not increase in MDA-MB-231 treated cells, thereby suggesting that only cell cycle progression had been significantly affected in these cells. Cell cycle distributions were shown in Fig. 3c.

DPT-induced changes in cell cycle regulatory protein expression in tumor cells

DPT activity is closely coupled to cell cycle progression as the cell cycle analysis revealed that DPT induced G2/M arrest. To further confirm this finding, we examined whether DPT treatment altered cell cycle regulatory proteins expression, such as cyclin B1, cdc25c, and CDK1 within 48 h (Fig. 3d). β -actin, a housekeeping gene, was used as a loading control.

In MCF-7 cells, the level of cyclin B1 increased after DPT treatment. However, CDK1, which combine with cyclin B1 in the control of the G2/M phase, as well as cdc25c expression dramatically decreased after 24 h. On the other hand, DPT down-regulated the expression of cdc25c and cyclin B1 in MDA-MB-231 cells, while no detectable change was observed in CDK1 expression.

DPT-induced morphological changes in cells

To gain an initial insight into the effects of DPT on cell morphology, differences in cell morphology were observed between DPT-treated and control cells as assessed by light microscopy. The most conspicuous change observed in MCF-7 treated cells included cell shrinkage and extensive detachment of the cells from the cell culture substratum. MCF-7 treated cells contained fragmented nuclei and the cell density reduced dramatically in time-dependent manner (Fig. 4). These changes, characteristic of cell apoptotic death, as well as of reduced adhesion, became more remarkable after 24-h incubation with DPT (20 nM), which might indicate the possibility of apoptotic occurrence in these cells after DPT treatment. However, the effect of DPT on MDA-MB-231 cells morphology was less potent under

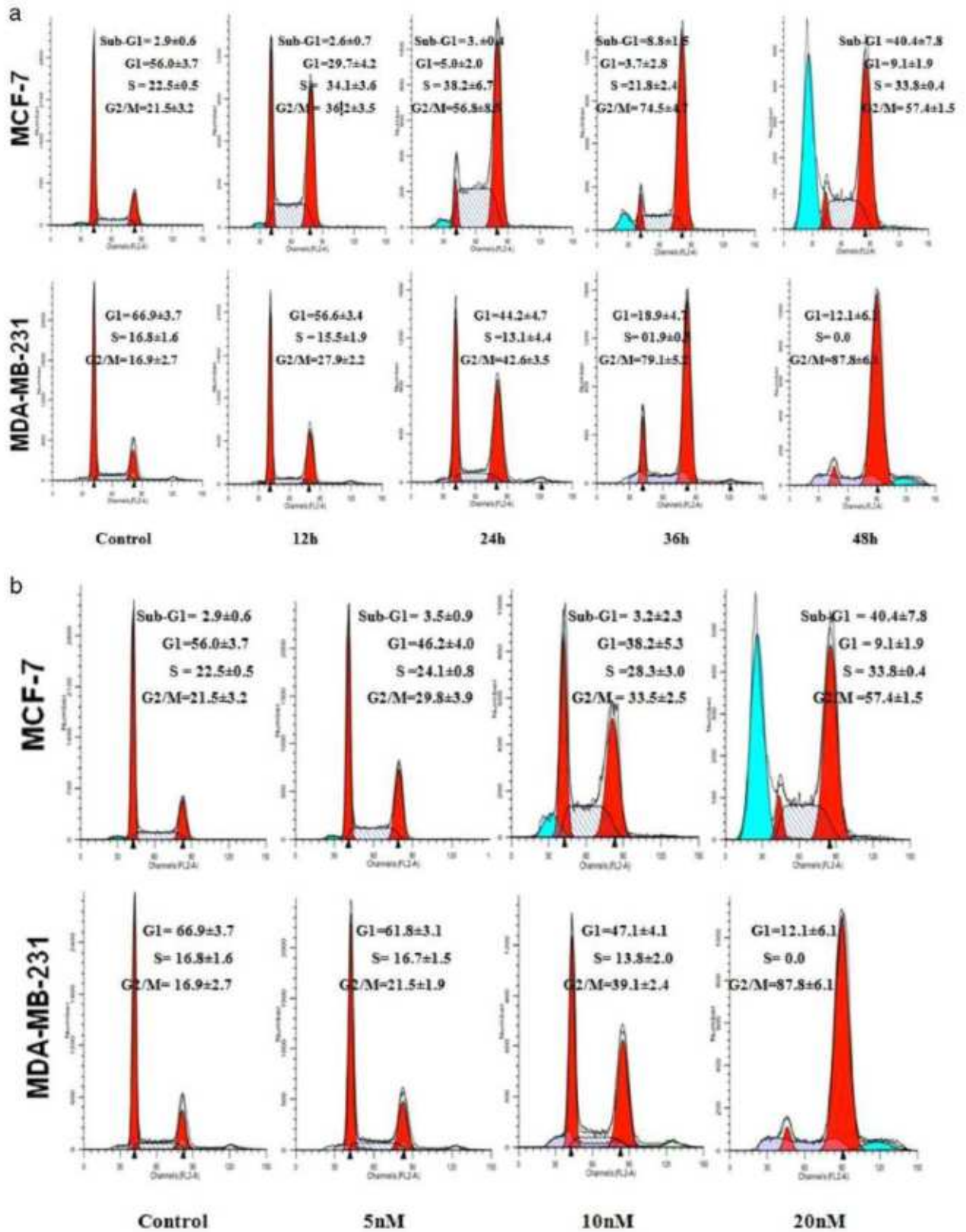
the same conditions. However, no shrinkage or sign of cell death were observed (Fig. 4).

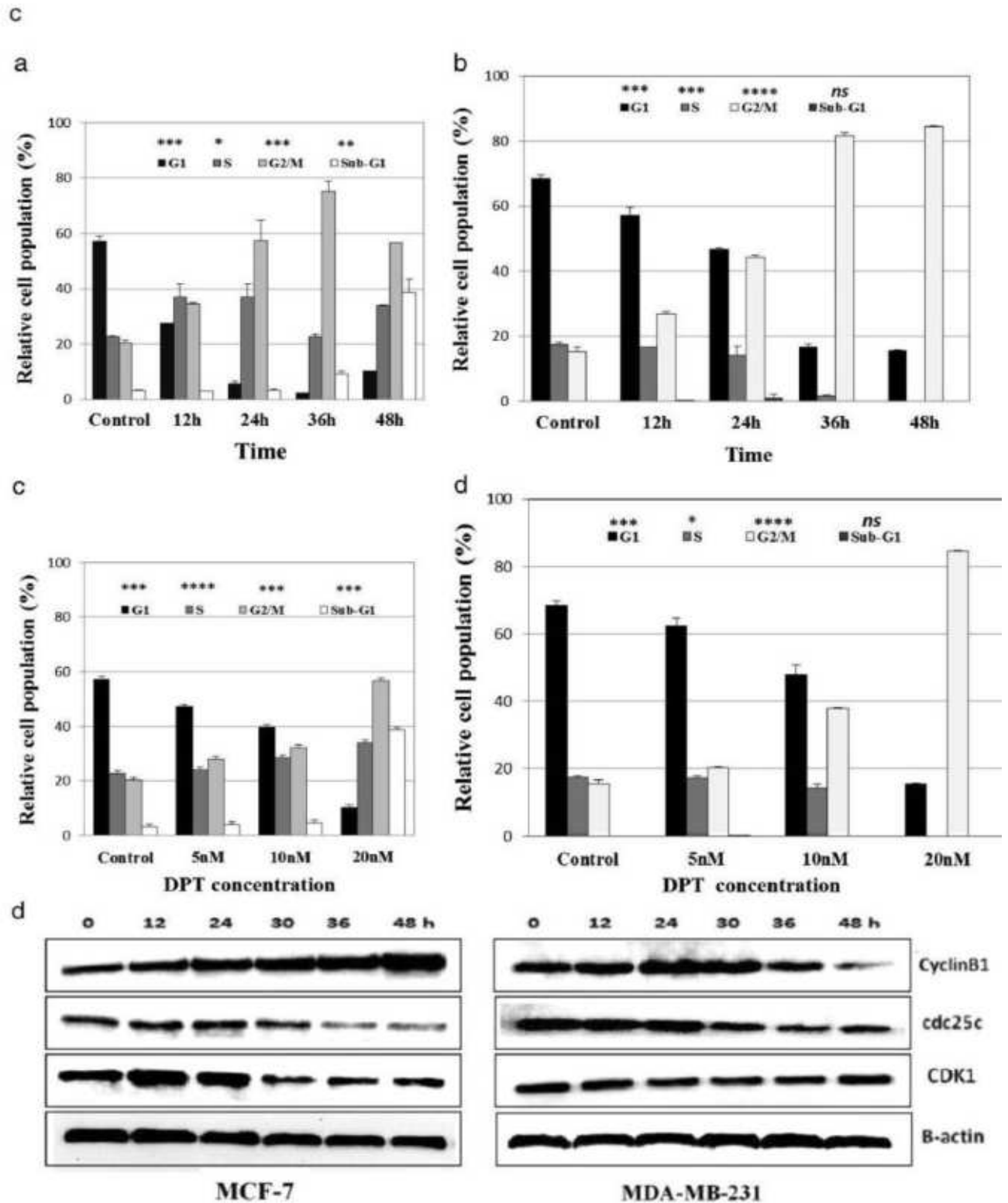
DPT inhibited tubulin polymerization

To assess whether DPT has an effect on tubulin, we looked for possible alterations in the cytoskeleton. Therefore, an indirect immunofluorescence staining using an anti-tubulin antibody was performed. While Taxol, a microtubule-stabilizing agent (Arnal and Wade 1995), hyperstabilized polymerized microtubules and showed distinctive microtubule network, DPT caused a significant disruption of the tubulin cytoskeleton characterized by cellular microtubule depolymerization within 48 h of treatment (20 nM) in tumor cells (Fig. 5a, b). Control cells showed normal tubulin arrangement and elongated bundles of microtubules (Fig. 5a.a, b.a). Consistent with the above results, Hoechst staining showed that MCF-7 treated cells (20 nM) exhibited high morphological changes in which the cells shrank, became rounded, and contained fragmented nuclei after 48 h treatment, as indicated with white arrows (Fig. 5a). However, untreated cells and MDA-MB-231 treated cells showed morphologically normal and dimly blue nuclei (Fig. 5a, b).

DPT triggered apoptosis in MCF-7 cells but not in MDA-MB-231 cells

In order to elucidate whether the antiproliferative effect of DPT was associated with apoptosis, treated cells were subjected to annexin-V FITC/PI flow cytometry analysis. In MCF-7 cells, DPT exposure was found to promote both early and late apoptosis in a dose-dependent manner. As shown in Fig. 6a, d, MCF-7 treated cells with 10, 15, and 20 nM of DPT for 48 h resulted in approximately 35, 76, and 85% of total apoptotic cells, respectively, compared to 4% in the control cells. The increase in cell's apoptotic population is consistent with the increase in sub-G1 population that was observed in the cell cycle analysis. Moreover, DPT induced a time-dependent cell apoptosis in MCF-7 after 20 nM DPT treatment for 12–48 h. Thus, 24 h cells treatment, resulted in a strong shift from non-apoptotic live cells to late apoptotic cells (18.24%). At the end of 48 h treatment, the total apoptosis became more significant





◀ **Fig. 3** Dose and time-dependent effect of DPT on the cell cycle progression of BC cell lines. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were either untreated (control) or treated with a 20 nM of DPT for 12–48 h or b DPT (5–20 nM) for 48 h. After treatment, cells were harvested, stained with PI and then analyzed by flow cytometry. The y-axis denotes cell count and the x-axis represents DNA content. Values are expressed as percentage of the cell population in the sub-G1, G1, S, and G2/M phase of the cell cycle. Flow cytometry histograms show cell cycle progression in one experiment out of three independent experiments. **c** Analysis of data collected from the investigation of DPT's action on the cell cycle progression. MCF-7 (a, c), MDA-MB-231 (b, d). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were either untreated (control) or treated with 20 nM of DPT for 12–48 h (a, b) or DPT (5–20 nM) for 48 h (c, d). Each bar represents the median \pm MAD of data from three independent experiments. Friedman (a, b) and Kruskal–Wallis (c, d) tests were used to compare the distribution of samples between the groups. ns > 0.1, * $P \leq 0.1$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$. **d** Time-dependent effect of DPT on cell cycle regulatory proteins in human BC cells. Cells were exposed to DPT (20 nM) and incubated for different lengths of time. Then, expression levels of cyclin B1, cdc25c, CDK1, and β -actin (a housekeeping gene used as a loading control) in total cell lysates were determined by western blot analysis. This figure is representative of three independent experiments

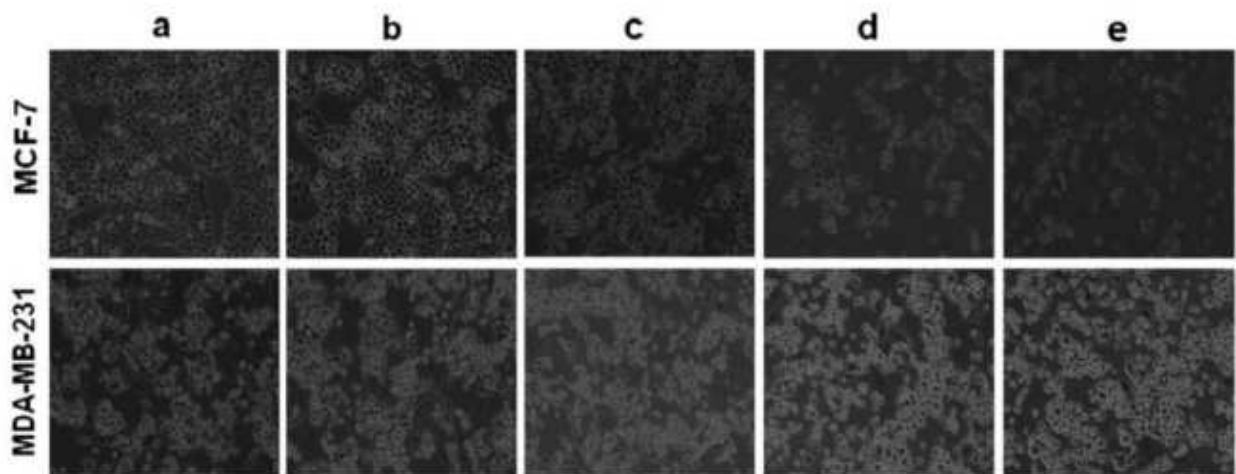


Fig. 4 Morphological changes of MDA-MB-231 and MCF-7 cells after DPT-treatment: Cells were cultured in 6-well plates under control condition a or in the presence of DPT (20 nM) for 12–48 h b–e. Cell morphology was observed under a phase-contrast microscopy (200X)

and apoptotic cells increased up to about 89% concomitantly with a decrease in non-apoptotic live cells (4.64%) (Fig. 6b, e).

In MDA-MB-231 cells, different concentrations of DPT (3–5 folds IC_{50}) were used. However, no significant difference in the proportions of non-apoptotic cells, and those in early and late apoptosis were observed after 48 h, compared to the control (Fig. 6c, f). The obtained data summarized in Tables 2, 3.

Mitochondrial membrane depolarization by DPT

Since the mitochondrial changes are considered as a critical event of the apoptotic process (Hirsch et al. 1998), JC-1 staining assay was carried out to verify whether $\Delta\Psi_m$ disruption precedes caspase cascade activation and cell death. In sensitive MCF-7 cells, the JC-1 was accumulated and the fluorescence ratio (red/green) was dramatically decreased after 36 h of DPT treatment (Fig. 7). This suggested that, the DPT-induced cell proliferation inhibition was associated with $\Delta\Psi_m$ disruption and consequently MCF-7 cells apoptosis. In contrast, JC-1 was poorly accumulated and exhibited a diffuse cytoplasmic fluorescence, not

specifically localized in mitochondria, in both untreated and MDA-MB-231 treated cells, which displayed only a slight green fluorescence compared to the orange-red one, typical of intact live cells with polarized mitochondria (Fig. 7).

DPT-induced caspase activation in MCF-7 cells

To estimate whether caspases activation is involved in DPT-induced MCF-7 cell apoptosis and to further exclude caspases implication in growth inhibition of MDA-MB-231 cells, the effect of a well-known pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk, on DPT-induced growth-inhibition was examined. As shown in Fig. 8a, DPT inhibitory effect on MCF-7 cell proliferation was significantly reversed by z-VAD-fmk pre-treatment, as MCF-7 cells viability increased by $20.3 \pm 1.7\%$ and $18.2 \pm 4.6\%$ after 48 and 72 h respectively. However, we can notice that cell viability in DPT treated cells after z-VAD-fmk pretreatment remained significantly inferior to control cells ($P < 0.05$). On the other hand, the exposure of MDA-MB-231 cells to the pan-caspase inhibitor did not affect the cells proliferation after both 48 and 72 h (Fig. 8b).

◀ **Fig. 5** Effect of DPT on tubulin polymerization. MCF-7 **a** and MDA-MB-231 **b** cells, grown on coverslips, were incubated at 37 °C in the absence (**a**: Negative control) or presence of DPT (20 nM) or Taxol (positive control) for 12–48 h (**b–e**). Microtubules (green) were stained by overnight incubation with anti- α -tubulin antibody then with Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody for 30 min. Chromosomal DNA was stained with Hoechst 33258 (blue). DPT disrupted tubulin polymerization in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Apoptotic cells with condensed nuclei were observed in DPT-treated MCF-7 cells. Arrows indicate fragmented nuclei of apoptotic cells. The images were captured using confocal microscopy

Effect of DPT on apoptosis related proteins expression in MCF-7

In line with our previous findings, Fig. 8c showed that DPT promoted the cleavage of a well-known substrate of activated caspases, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), which involved in apoptotic signaling in MCF-7 cells. PARP cleavage started after 12 h and became more extensive by 48 h. As PARP cleavage can be induced by other death proteases in different types of cell death (Duriez and Shah 1997), we further elucidate the mechanism responsible for DPT-induced apoptosis in MCF-7 by the examination of the effect of DPT on the expression of Bax and Bcl-2, key molecules that are involved in intrinsic apoptotic pathway and reported to have pro-apoptotic properties. As shown in Fig. 8c, DPT exposure caused Bax over-expression along with unchanged level of Bcl2 following 48 h of drug treatment. While, DPT treatment did not affect apoptosis related proteins expression in MDA-MB-231 cells (data not shown).

Discussion

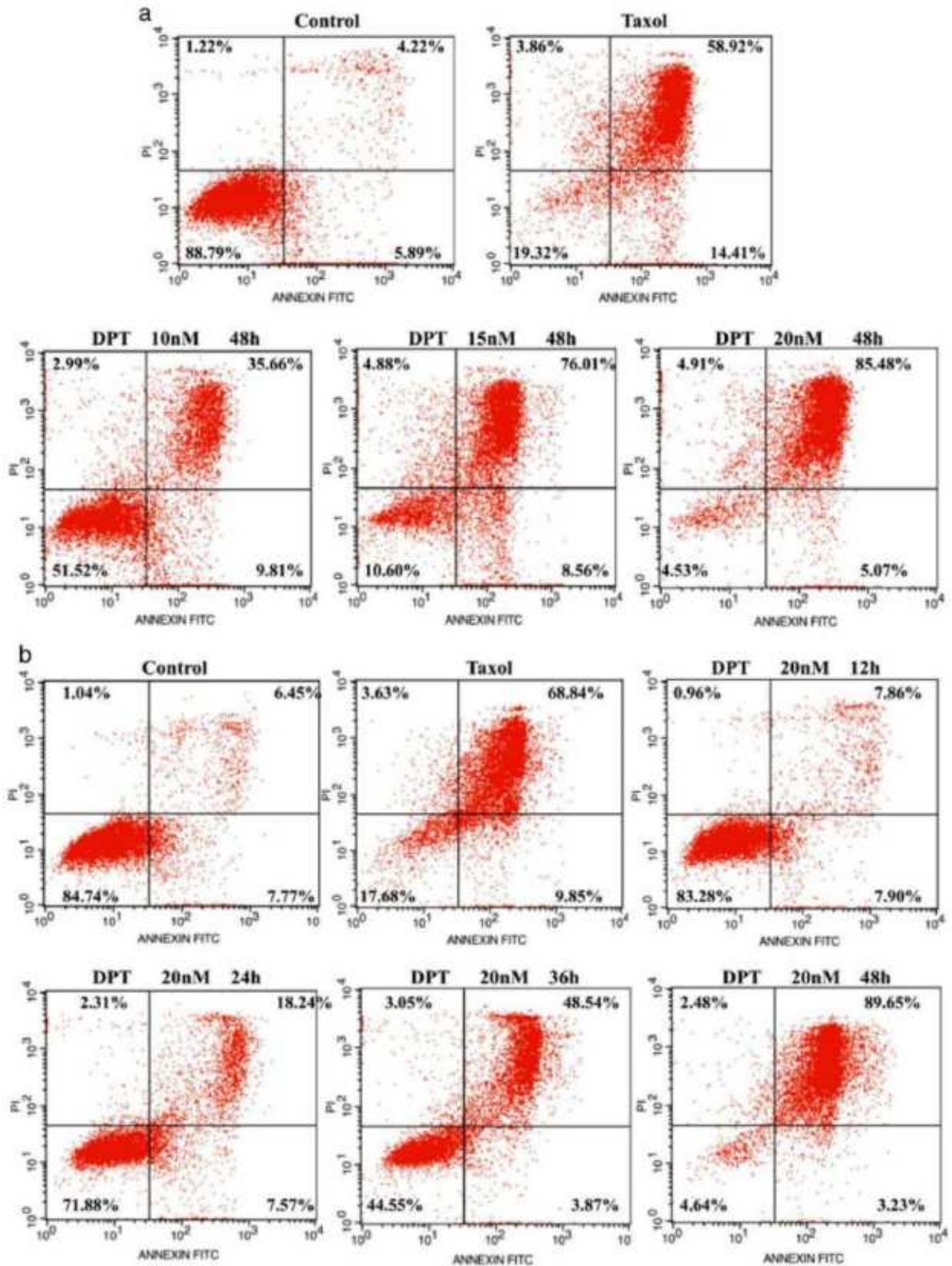
One of the main challenges in BC treatment is the existence of TNBC tumors that are resistant to antihormone therapy (Foulkes et al. 2010). Hence, finding new therapies to this BC subset is of crucial importance. Previously, DPT was found to significantly inhibit the proliferation of several human cancer cell lines through cell cycle arrest at G2/M checkpoint (Khaled et al. 2013; Wang et al. 2015). In this study, the antiproliferative effect and the corresponding antiproliferative mechanisms of DPT on TNBC MDA-MB-231 and ER-positive MCF-7 BC cells were investigated. We have demonstrated that DPT arrested growth of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines at very low IC_{50} compared to that of etoposide, a well-known cytotoxic agent.

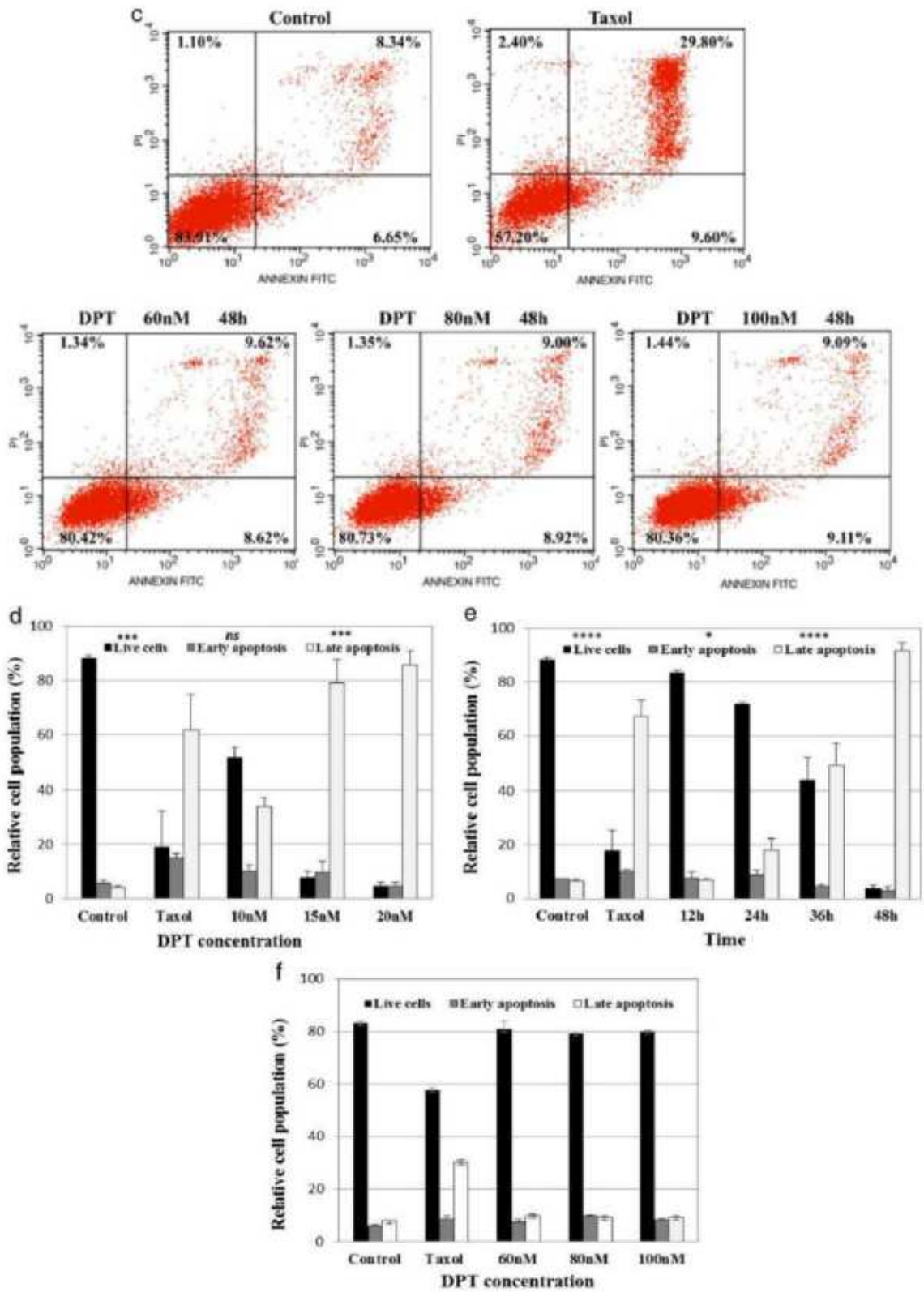
Inhibition of tumorigenesis often involves modulation of signal transduction pathway leading to cell cycle arrest and consequently apoptosis (Call et al. 2008; Dickson and Schwartz 2009). Consistent with previous reports, herein we demonstrated that DPT caused cell cycle block at G2/M phase in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells, which is partially related to perturbation of cell cycle proteins expression. It is well known that the eukaryotic cell cycle is strictly regulated by complexes containing cdks and cyclins,

which are critical for the progression of cell cycle and their inactivation lead to cell cycle arrest (Vermeulen et al. 2003). Cyclin B1 is synthesized during S phase, peaks at G2/M phase, and is rapidly degraded at telophase of M phase. It plays a crucial role in the G2/M transition and in the M phase progression (Holloway et al. 1993; van Leuken et al. 2008). Cyclin B1 accumulation has been considered as an indicator of cell cycle arrest in G2 and/or M cell phases. Hence, DPT-induced cell cycle arrest in MCF-7 cells might be partially explained by the elevated cyclin B1 expression. The same effect of DPT treatment on cyclin B1 accumulation has been observed in other studies using other cancer cell lines (Shin et al. 2010; Guerram et al. 2015; Wang et al. 2015). In contrast, we noticed that DPT reduced cyclin B1 expression in MDA-MB-231 cells. A preview of the combined compartment of cell cycle proteins may give an explanation to this observation. It is well-known that cyclin B1 associates to CDK1 during G2 phase to form a complex whose activity is mostly dependent on the amount of cyclin B1 and the phosphorylation status of CDK1 (Malumbres and Barbacid 2005). Additionally, cdc25c activates the CDK1/cyclin B complex through dephosphorylation of CDK1 (Gautier et al. 1991). Hence, a potential mechanism for DPT-induced cell cycle arrest in MDA-MB-231 cells is through reduction of total protein levels of cyclin B1 and cdc25c. A comparable behavior of cyclin B1 and cdc25c after DPT treatment of U-87 MG glioblastoma has been observed by others (Guerram et al. 2015). Furthermore, we can also speculate that reduction of cdc25c may give an additional explanation to G2/M phase arrest through the absence of CDK1 dephosphorylation after MCF-7 cells treatment by DPT.

Highly dynamic mitotic-spindle microtubules are among the most interesting targets for anticancer therapy (Jordan and Wilson 2004). Chemotherapeutic agents stabilizing cellular microtubules, like Taxol, lead to mitotic arrest and cytotoxicity in proliferating cells (Rowinsky and Donehower 1991). DPT seems to be a novel microtubule-targeting agent that works through a different mechanism. Data from immunofluorescence microscopy demonstrated that DPT dramatically disrupted the cytoskeleton and prevented cancer cells division through inhibition of tubulin polymerization in mammalian tumor cells, MCF-7 and MDA-MB-231.

Since cell apoptosis may be one of the consequences of cell-cycle arrest (Roninson et al. 2001), apoptotic induction





◀ **Fig. 6** Flow cytometric analysis using annexin V-FITC/PI double-staining. MCF-7 cells were a untreated or treated for 48 h with 10, 15, and 20 nM of DPT or b treated with DPT (20 nM) for 12–48 h. c MDA-MB-231 cells were untreated or treated with 60, 80, and 100 nM of DPT for 48 h. Taxol used as positive control. The collected cells were subjected to staining then analyzed with a flow cytometer. Untreated cells were primarily Annexin V-FITC and PI negative, indicating that they were viable and not undergoing apoptosis. After treatment, there were primarily two populations of cells: Cells in early stages of apoptosis are annexin V positive and PI negative, whereas those in late stages of apoptosis are both annexin V and PI positive. The percentage of apoptotic cells is indicated. Dot blots show the results from one of the three conducted experiments. d, e, f histograms showed the fractions of live, early, and late apoptotic MCF-7 d, e and MDA-MB-231 f cells. The numerical data are presented as median \pm MAD ($n = 3$). Friedman (e) and Kruskal-Wallis (*D* and *F*) tests were used to compare the distribution of samples between the groups; ns > 0.1 , * $P \leq 0.1$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$

Table 2 Annexin V/PI assay data after 48 h of DPT-treatment

Cell lines		Control	Taxol*	DPT		
				10 nM	15 nM	20 nM
MCF-7	Live Cells	88.79 \pm 1.70	22.81 \pm 19.32	51.52 \pm 3.87	10.60 \pm 6.85	4.53 \pm 1.33
	Early apoptotic cells	5.89 \pm 1.37	14.41 \pm 2.51	9.81 \pm 2.59	8.56 \pm 5.55	5.07 \pm 2.33
	Late apoptotic cells	4.22 \pm 0.78	58.92 \pm 17.51	35.66 \pm 5.99	76.01 \pm 13.2	85.48 \pm 5.36
MDA-MB-231	Live cells	83.91 \pm 1.42	63.06 \pm 0.06	80.42 \pm 3.79	80.73 \pm 2.80	80.36 \pm 0.88
	Early apoptotic cells	6.65 \pm 1.20	3.19 \pm 1.01	8.62 \pm 2.89	8.92 \pm 1.83	9.11 \pm 1.93
	Late apoptotic cells	8.34 \pm 0.81	24.21 \pm 4.16	9.62 \pm 0.93	9.00 \pm 0.99	9.09 \pm 0.85

Results are given in % and are the median \pm MAD of three independent experiments

* Positive control

Table 3 Annexin V/PI assay data after 12, 24, 36, and 48 h of DPT-treatment (20 nM)

Cell lines		Control	Taxol*	DPT			
				12 h	24 h	36 h	48 h
MCF-7	Live cells	84.74 \pm 0.80	17.68 \pm 7.66	83.28 \pm 1.19	71.88 \pm 0.89	44.55 \pm 8.85	4.64 \pm 3.29
	Early apoptotic cells	7.77 \pm 0.59	9.85 \pm 1.17	7.90 \pm 2.51	7.57 \pm 3.80	3.87 \pm 1.65	3.23 \pm 2.32
	Late apoptotic cells	6.45 \pm 0.97	68.84 \pm 8.79	7.86 \pm 1.92	18.24 \pm 4.59	48.54 \pm 9.08	89.65 \pm 6.11

Results are given in percentage and are the median \pm MAD of three independent experiments

* Positive control

was confirmed by analysis of independent markers. Thereby, according to Hoechst staining, DPT-treated MCF-7 cells displayed significant apoptotic-related morphological alterations, such as apoptotic body formation and chromatin condensation. In addition, a sub-G1 peak, often considered as an indicator of cell apoptosis was clearly observed by flow cytometry after the DPT treatment of MCF-7 cells. Moreover, FITC-Annexin V/PI staining assay of MCF-7 cells indicated an increased number of apoptotic cells after DPT treatment in both dose- and time-dependent manner. Besides, DPT treatment significantly induced MCF-7 $\Delta\Psi_m$ loss, which is one of the earliest events in programmed cell death (Zamzami et al. 1995a, b; Kim et al. 2003). To further assess whether DPT-induced apoptosis is

caspase-dependent, we demonstrated that the pan-caspase inhibitor prevented the DPT apoptotic effect on MCF-7.

It is well known that extrinsic apoptotic pathway is initiated by the engagement of cell surface death receptors with their specific ligands, which then induce caspase 8 activation (Juang et al. 2004). In contrast, intrinsic apoptotic pathway is induced by release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol and activation of caspase 9, and then caspases 3 and 7 and consequently cell apoptosis (Tong et al. 2002). Many of the pro/anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as Bad and Bax also mediate their effects through the mitochondria, either by interacting with Bcl-2 and Bcl-xl or through direct interactions with the mitochondrial membrane (Liu et al. 2004). Our findings

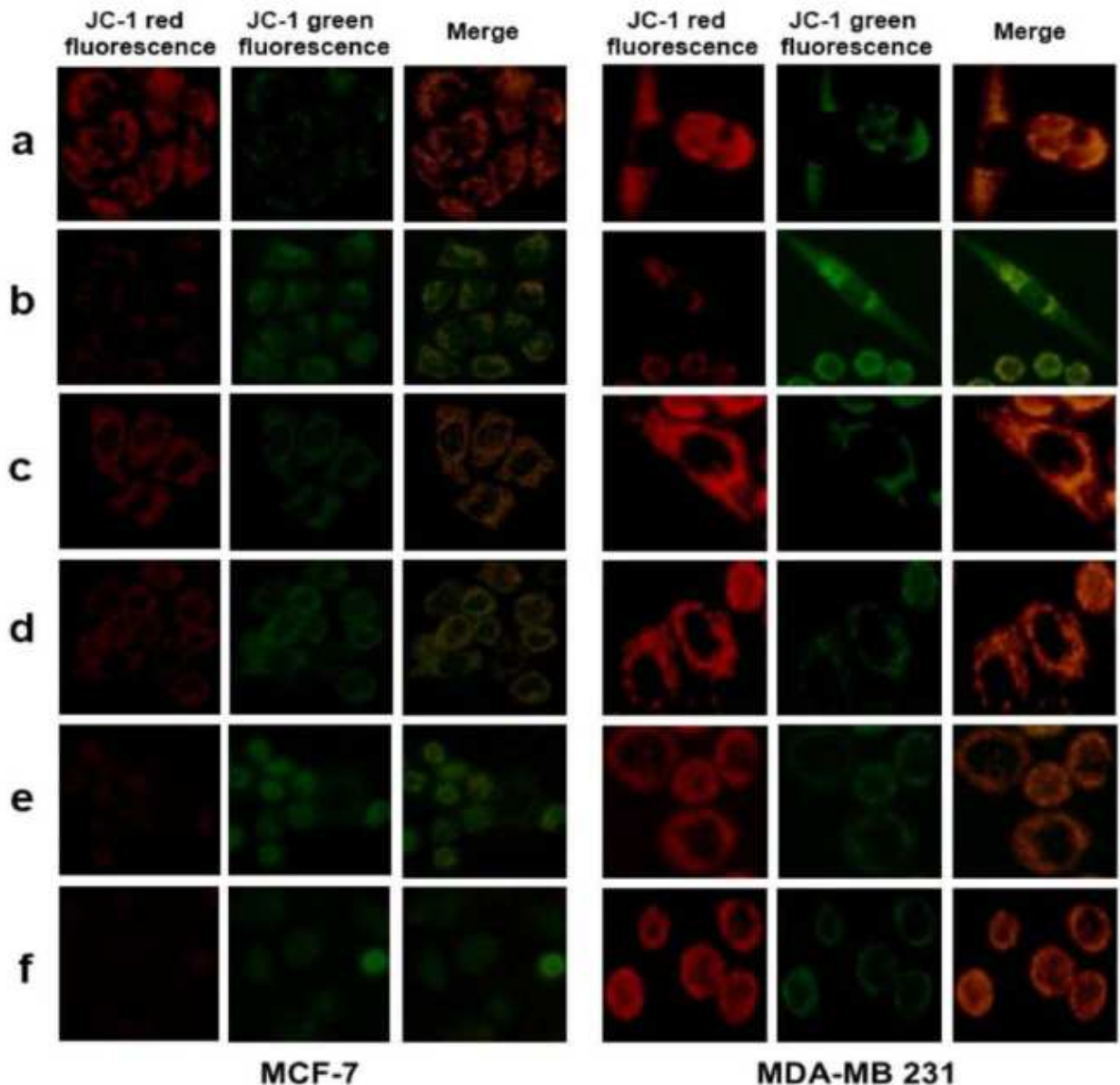


Fig. 7 Mitochondrial transmembrane potential evaluated by JC-1 staining: JC-1 aggregates can display a specific *orange-red* emission band centered at 590 nm indicating a high membrane potential ($\Delta\Psi_m$), whereas JC-1 monomers display a green emission band centered at

525 nm indicating low $\Delta\Psi_m$. **a** JC-1 in tumor cells under normal conditions. **b** JC-1 in tumor cells stained with CCCP as positive control. **c, d, e, f** JC-1 in tumor cells treated with DPT (20 nM) for 12, 24, 36, and 48 h, respectively

from western blot analysis showed that DPT up-regulated Bax expression suggesting the involvement of the intrinsic pathway during MCF-7 cells apoptosis. This involvement is further supported by the observed cleavage of PARP. Indeed, the DNA repair enzyme PARP is cleaved from the full-length 116-kDa to the inactive 85-kDa form by caspase-3 or caspase-7 (Nicholson et al. 1995), which are known to be involved in the intrinsic apoptotic pathway (Tong et al. 2002). However, we have many reasons to speculate that DPT effects on MCF-7 survival don't merely base on

caspase-dependent apoptosis. First, and unlike classical apoptosis, we found that DPT treatment didn't cause cells to cycle through Annexin + PI-quadrant (even at lower doses or earlier time points), and second, the pan-caspase inhibitor failed to reconstitute the initial cell viability. Such data is suggestive of mixed cell death rather than just caspase-dependent apoptosis. Thus DPT-induced MCF-7 death through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms such as autophagy, enterosis, necroptosis or other mechanisms following the classification of the

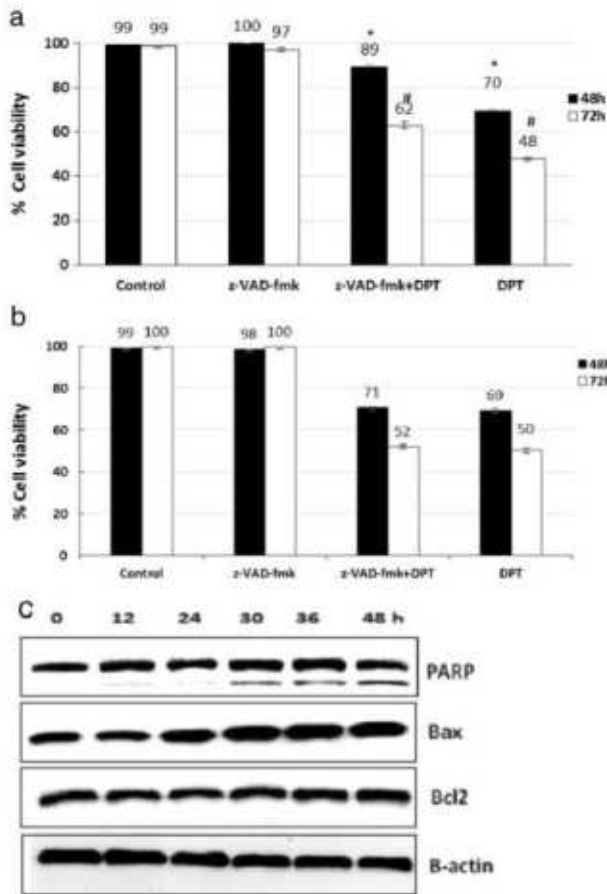


Fig. 8 Effect of z-VAD-fmk on cell growth inhibition induced by DPT. **a** MCF-7 and **b** MDA-MB-231 cells were cultured in 96-well plates for 48 h and 72 h. Then, they were either untreated or pre-treated with z-VAD-fmk (50 μ M) for 4 h before treatment with DPT (20 nM). After 72 h incubation, CCK-8 (10 μ l) was added and incubation was continued for 1–4 h. The absorbance at 450 nm was measured as a parameter of cell viability. Data are median \pm MAD of three experiments. Kruskal–Wallis test was used to assess the significance of the difference in cell viability when comparing between DPT-treated cells that were untreated and pre-treated with z-VAD-fmk. The symbols * and # indicate that *P*-value is significant (< 0.05). **c** Time-dependent effect of DPT on apoptosis-related gene expression in MCF-7 cells. Cells were exposed to DPT (20 nM) and incubated for different lengths of time. Then, expression levels of PARP, Bax, Bcl2, and β -actin in total cell lysates were determined by western blot analysis. This figure is representative of three independent experiments

Nomenclature Committee on Cell Death (Galluzzi et al. 2012).

On the other hand, our results show that DPT prevented MDA-MB-231 cells to undergo apoptosis. This is in contrast with findings from other studies using a natural form of DPT that is extracted from other plants such as *Anthriscus sylvestris* (Jung et al. 2013) or *Juniperus communis* (Benzina et al. 2015). In these studies, MDA-MB-231 culture medium was different from the Leibovitz's L-15 medium that is recommended by the ATCC (American Type Culture

Collection 2015) and which was used in our study. Cell culture media may influence not only cell viability but also cell genetics (Arigony et al. 2013). Hence, the observed discrepancy in culture medium may lead to differences in phenotypic traits of MDA-MB-231 cell line including the response to DPT-treatment. For this reason, we think that MDA-MB-231 cell line which derives from a TNBC, may, effectively, be apoptosis resistant after exposure to DPT, compared to MCF-7 cell line deriving from a hormone sensitive BC. It has been already reported that a differential response to cytotoxic drugs can be observed in these two cell lines. Clophosphamide, epirubicin, and 5-fluorouracil differentially induce apoptotic, pro-apoptotic, and anti-apoptotic proteins in BC cells lines MDA-MB-231 and MCF-7 (Chow and Loo 2003). Additionally, many cancer cell lines exhibit such a resistance to programmed cell death after exposure to drugs or radiation although they are undergoing permanent growth arrest. Such resistance is compensated by accelerated cell senescence, or by another form of cell death named mitotic catastrophe (Roninson et al. 2001). MDA-MB-231 cell line may undergo one of these alternative fates following DPT exposure. In our study, this resistance to apoptosis and the antiproliferative effect were observed even with minimal doses of DPT, which suggests that such response of MDA-MB-231 cell line could be associated with conditions of minimal cytotoxicity. Anticancer agents having the highest therapeutic index (i.e., the maximal anti-tumor effect and the minimal side effects) are the most coveted. Target-based anti-neoplastic therapies are an example of these agents (Stadler and Ratain 2000), as well as agents having an effect on cellular proliferation, but not on processes involved in survival (Morley et al. 2007).

Conclusion

In conclusion, our data revealed that DPT effectively inhibited tumor cell growth alongside with apoptotic induction and cell death in sensitive MCF-7 cells. Under the same conditions, some differences between cell lines in response to DPT were apparent since DPT selectively inhibited proliferation of MDA-MB-231 cells in the absence of cytotoxicity. This lack of any significant cell death at concentrations that have profound inhibitory effects on proliferation and clear cytostatic effects suggests that DPT interacts selectively with mediators of cell cycle events. Cytostatic effect of DPT on human TNBC cells without inducing cell death may be advantageous in treating human tumors in their natural environment, as it would restrict proliferation in a manner less likely to cause cytotoxicity and induce death in non-tumor tissues.

Taken together, these findings suggested that DPT, a semi-synthetic compound from *Dysosma versipellis*, may acts as a potential candidate for cancer treatment and provide preliminary basis for its clinical application in the future.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge financial support from the National Natural Science Foundation of China (81274146 to LZ), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD to LZ), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (YD2014SK0002 to JZ) and 333 high level project of Jiangsu Province (BRA2014245 to LZ).

Compliance with ethical standards

conflicts of interest All authors declare that they have no competing interests.

References

- Adlercreutz H (2002) Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 3:364–373
- American Type Culture Collection (2015) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#culturemethod> Accessed 25 Dec 2015
- Arigony AL, de Oliveira IM, Machado M, Bordin DL, Bergter L, Pra D, Henriques JA (2013) The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *Biomed Res Int* 2013:597282
- Arnal I, Wade RH (1995) How does taxol stabilize microtubules? *Curr Biol* 5:900–908
- Benzina S, Harquail J, Jean S, Beauregard AP, Colquhoun CD, Carroll M, Bos A, Gray CA, Robichaud GA (2015) Deoxy-podophyllotoxin isolated from *Juniperus communis* induces apoptosis in breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 15:79–88
- Brzezinski A, Debi A (1999) Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85:47–51
- Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR (2008) Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 9:1002–1011
- Chow LW, Loo WT (2003) The differential effects of cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil on apoptotic marker (CPP-32), pro-apoptotic protein (p21(WAF-1)) and anti-apoptotic protein (bcl-2) in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 80:239–244
- Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 197:40–45
- Dickson MA, Schwartz GK (2009) Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol* 16:36–43
- Duriez PJ, Shah GM (1997) Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 75:337–349
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2012) Cancer incidence and mortality worldwide, GLOBOCAN 2012 v1.0. IARC CancerBase 2012; No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. <http://globocan.iarc.fr> Accessed 11 Dec 2015
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363:1938–1948
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovskiy B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death sub-routines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ* 19:107–120
- Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW (1991) cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 67:197–211
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309–1312
- Guerram M, Jiang ZZ, Sun L, Zhu X, Zhang LY (2015) Antineoplastic effects of deoxypodophyllotoxin, a potent cytotoxic agent of plant origin, on glioblastoma U-87 MG and SF126 cells. *Pharmacol Rep* 67:245–252
- Guo X (1992) Toxic herbs drugs dictionary. Tianjin Science and Technology and Translation Publishing. Tianjin, pp 14–16
- Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G (1998) Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol Toxicol* 14:141–145
- Holloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW (1993) Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73:1393–1402
- Ikeda R, Nagao T, Okabe H, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M, Mori M (1998) Antiproliferative constituents in umbelliferae plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Chem Pharm Bull* 46:871–874
- Jiang RW, Zhou JR, Hon PM, Li SL, Zhou Y, Li LL, Ye WC, Xu HX, Shaw PC, But PP (2007) Lignans from *Dysosma versipellis* with inhibitory effects on prostate cancer cell lines. *J Nat Prod* 70:283–286
- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253–265
- Juang SH, Pan WY, Kuo CC, Liou JP, Hung YM, Chen LT, Hsieh HP, Chang JY (2004) A novel bis-benzylidenecyclopentanone derivative, BPR0Y007, inducing a rapid caspase activation involving upregulation of Fas (CD95/APO-1) and wild-type p53 in human oral epidermoid carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 68:293–303
- Jung CH, Kim H, Ahn J, Jung SK, Um MY, Son KH, Kim TW, Ha TY (2013) Anthricin Isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells by Inhibiting Akt/mTOR Signaling, and Its Apoptotic Effects Are Enhanced by Autophagy Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:385219
- Khaled M, Jiang ZZ, Zhang LY (2013) Deoxypodophyllotoxin: A promising therapeutic agent from herbal medicine. *J Ethnopharmacol* 149:24–34
- Kim JS, He L, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:463–470
- Lee KH, Xiao Z (2003) Lignans in treatment of cancer and other diseases†. *Phytochem Rev* 2:341–362
- Liu MJ, Wang Z, Li HX, Wu RC, Liu YZ, Wu QY (2004) Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 194:141–155
- Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630–641

- McDonald ER, El-Deiry WS (2000) Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int J Oncol* 16:871–886
- McGuire WL, Horwitz KB, Zava DT, Garola RE, Chamness GC (1978) Hormones in breast cancer: update 1978. *Metabolism* 27:487–501
- Messina MJ, Loprinzi CL (2001) Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J Nutr* 131:3095S–3108S
- Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J (2007) Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett* 251:168–178
- Muto N, Tomokuni T, Haramoto M, Tatemoto H, Nakanishi T, Inatomi Y, Murata H, Inada A (2008) Isolation of apoptosis- and differentiation-inducing substances toward human promyelocytic leukemia HL-60 cells from leaves of *Juniperus taxifolia*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:477–484
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37–43
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4:303–313
- Roulland E, Magiatis P, Arimondo P, Bertounesque E, Monneret C (2002) Hemi-synthesis and biological activity of new analogues of podophyllotoxin. *Bioorg Med Chem* 10:3463–3471
- Rowinsky EK, Donehower RC (1991) Taxol: twenty years later, the story unfolds. *J Natl Cancer Inst* 83:1778–1781
- Sheikh MS, Garcia M, Pujol P, Fontana JA, Rochefort H (1994) Why are estrogen-receptor-negative breast cancers more aggressive than the estrogen-receptor-positive breast cancers? *Invasion Metastasis* 14:329–336
- Shin SY, Yong Y, Kim CG, Lee YH, Lim Y (2010) Deoxy-podophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett* 287:231–239
- Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM (1996) Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* 315:21–24
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Chen LB (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3671–3675
- Stadler WM, Ratain MJ (2000) Development of target-based anti-neoplastic agents. *Invest New Drugs* 18:7–16
- Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N (1987) Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 47:6126–6133
- Tong WG, Ding XZ, Adrian TE (2002) The mechanisms of lipoxigenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296:942–948
- van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R (2008) To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* 1786:49–59
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36:131–149
- Wang S, Xie Y (2004) China species red list, vol 1. Higher Education Press, Beijing, p 324
- Wang YR, Xu Y, Jiang ZZ, Guerram M, Wang B, Zhu X, Zhang LY (2015) Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in SGC-7901 cells and inhibits tumor growth in vivo. *Molecules* 20:1661–1675
- Yu PZ, Wang LP, Chen ZN (1991) A new podophyllotoxin-type lignan from *Dysoisma versipellis* var. *tomentosa*. *J Nat Prod* 54:1422–1424
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G (1995a) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182:367–377
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssières JL, Petit PX, Kroemer G (1995b) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181:1661–1672



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection and Chemotherapy

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jic>

Original Article

Antitumor effect of Deoxypodophyllotoxin on human breast cancer xenograft transplanted in BALB/c nude mice model



Meyada Khaled^a, Ghania Belaaloui^{b,*}, Zhen-Zhou Jiang^{c,d}, Xiong Zhu^e,
Lu-Yong Zhang^{c,**}

^a Faculty of Life and Natural Sciences, Batna 2 University, Fesdis, Batna 05000, Algeria^b Department of Medicine, Faculty of Medicine, Batna 2 University, Ezouhour, Batna 05000, Algeria^c Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening, China Pharmaceutical University, 24 Tong Jia Xiang, Nanjing 210009, PR China^d Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, 24 Tong Jia Xiang, Nanjing 210009, PR China^e Medical and Chemical Institute, China Pharmaceutical University, 24 Tong Jia Xiang, Nanjing 210009, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2016

Received in revised form

14 July 2016

Accepted 30 July 2016

Available online 28 August 2016

Keywords:

DPT- β -CD

MDA-MB-231

Breast cancer

Nude mice

VP-16

Docetaxel

ABSTRACT

Recently, biologically active compounds isolated from plants used in herbal medicine have been the center of interest. Deoxypodophyllotoxin (DPT), structurally closely related to the lignan podophyllotoxin, was found to be a potent antitumor and antiproliferative agent, in several tumor cells, *in vitro*. However, DPT has not been used clinically yet because of the lack of *in vivo* studies. This study is the first report demonstrating the antitumor effect of DPT on MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice. DPT, significantly, inhibited the growth of MDA-MB-231 xenograft in BALB/c nude mice. The T/C value (the value of the relative tumor volume of treatment group compared to the control group) of groups treated with 5, 10, and 20 mg/kg of intravenous DPT-HP- β -CD was 42.87%, 34.04% and 9.63%, respectively, suggesting the positive antitumor activity of DPT. In addition, the antitumor effect of DPT-HP- β -CD (20 mg/kg) in human breast cancer MDA-MB-231 xenograft was more effective than etoposide (VP-16) (20 mg/kg) and docetaxel (20 mg/kg). These findings suggest that this drug is a promising chemotherapy candidate against human breast carcinoma.

© 2016 Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is one of the most frequent cancers in the world [1], and it is the commonest cancer amongst women [2]. Deoxypodophyllotoxin (DPT) (Fig. 1A) is a cyclolignan structurally closely related to the lignin podophyllotoxin (Fig. 1B). DPT has antitumor and anti-proliferative activity in several cancer cells. In the *in vitro* studies, DPT was found to inhibit tubulin polymerization leading to cell cycle arrest at G2/M phase and apoptosis [3]. The class of podophyllotoxins includes also some cytostatic agents such as etoposide (VP-16) and teniposide, a semi-synthetic agents of

podophyllotoxin, used to treat multiple cancers [4]. VP-16 (Fig. 1C), a topoisomerase II inhibitor, is an alkaloid cytotoxic drug that binds to and inhibits topoisomerase II-DNA function and stops the cell cycle at the late S and G2 phases [5]. VP-16 is effective for the treatment of several tumors, including metastatic BC [6].

At the other hand, Docetaxel (Fig. 1D), a semi-synthetic taxane, is an active cytotoxic compound with potent antitumor effect against BC [7,8]. It promotes the polymerization of tubulin and the stabilization of microtubules by preventing their disassembly [9]. Although this chemotherapeutic drug reduces the risk of cancer recurrence and has led to improvements in survival, it is associated with numerous drug-related toxicities due in part to the high doses used to achieve the desired anti-tumor effect [10]. Therefore, lower doses and sequestration rates in healthy organs would improve the effectiveness of treatments and minimize adverse effects.

The *in vivo* studies on DPT were limited by its insolubility in water which made the preparation of intravenous injection impossible. Recently, in China, researchers have succeeded in

* Corresponding author. Fax: +213 33857501.

** Corresponding author.

E-mail addresses: meyada_pharm@hotmail.fr (M. Khaled), gbelaaloui@yahoo.fr (G. Belaaloui), bcaglejiang@cpu.edu.cn (Z.-Z. Jiang), cpuzxc@foxmail.com (X. Zhu), lyzhang@cpu.edu.cn (L.-Y. Zhang).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2016.07.017>

1341–321X/© 2016 Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

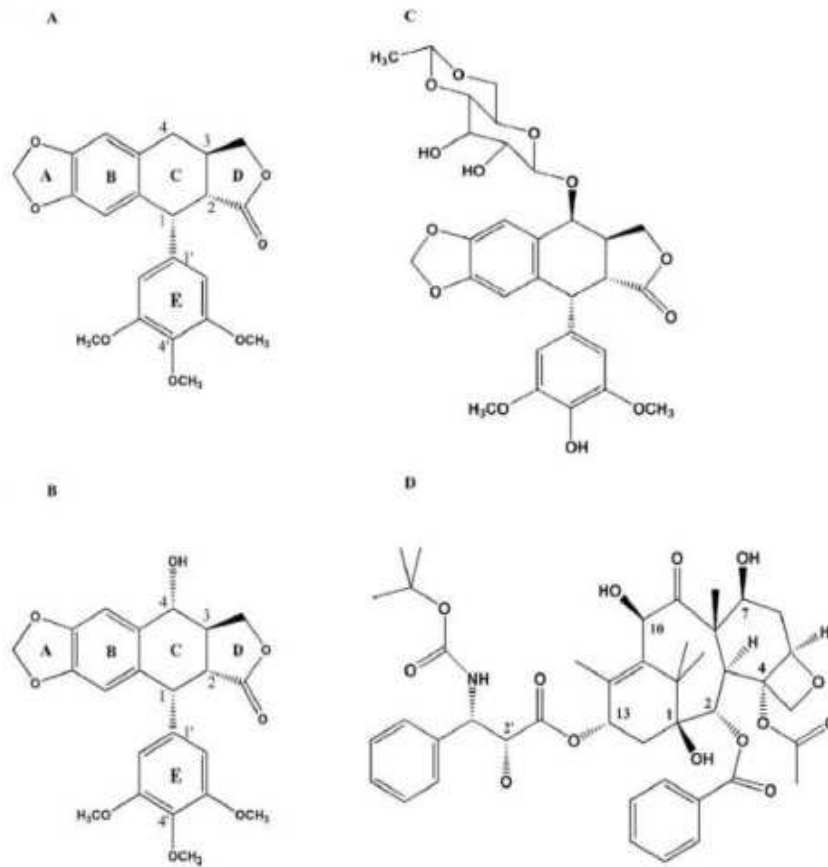


Fig. 1. Structures of deoxypodophyllotoxin (A), podophyllotoxin (B), etoposide (VP-16) (C) and docetaxel (D).

preparing DPT inclusion complex with a derivative of β -cyclodextrin (β -CD), sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) [4,11]. SBE- β -CD and HP- β -CD are polyanionic derivatives used in complex with various drugs to facilitate their solubility and chemical stability after parenteral drug administration. Approved by the Food and Drug Administration, these derivatives are well tolerated in humans and have no adverse effects [12,13]. The solid inclusion complex of DPT and β -CD increased the solubility and was tested *in vitro* and *in vivo*. The results revealed that this complex exhibited significant antitumor activity against various human cancer cell lines such as small cell lung cancer, leukemia, cervical cancer and gastric cancer [4,11].

A previous study has demonstrated that DPT exhibits potent antiproliferative and antitumor effect on human BC MDA-MB-231 cell line, *in vitro* [14]. BC cell line MDA-MB-231 derives from a triple negative breast cancer (TNBC). The TNBCs lack the expression of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2). They have generally, poorer prognosis than BCs expressing these receptors. While ER+ and PR + tumors benefit from hormone therapy and tumors that have amplified HER-2/Neu are treated with a monoclonal antibody targeting HER-2/Neu in addition to chemotherapy, TNBC are treated with only chemotherapy [15]. Since the *in vivo* antitumor efficacy of DPT on MDA-MB-231 cell line has not been investigated yet, the present study aims to determine, for the first time, the *in vivo* antitumor effect of DPT on the human BC cell line MDA-MB-231 by evaluating tumor growth inhibition in mice, in order to provide reference for clinical research.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Drugs and reagents

DPT, a white powder of high purity (>98%), DPT-HP- β -CD inclusion complex and HP- β -CD were obtained from the Medicinal Chemical Institute, China Pharmaceutical University, Nanjing, China. A 10^{-2} M stock solution of DPT was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) and stored at -20°C . VP-16 and docetaxel (solutions for injection) were purchased from Qilu Pharmaceutical Co., Ltd. China. 0.9% sodium chloride injection (Normal saline, NS) was purchased from Nanjing Xiaoying Pharmaceutical Holdings Limited, China.

2.1.2. Cell line and cell culture

MDA-MB-231 cell line was grown in Leibovitz's medium (L15) (HyClone, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Beyotime Biotechnology, China). As recommended by the ATCC, cultures were incubated in a humidified incubator at 37°C without CO_2 .

2.1.3. Animals

Female BALB/c nu/nu nude mice (6–8 weeks old, weighing 18–24 g) were used to establish the MDA-MB-231 xenograft tumor model and were purchased from Shanghai SIPPR-BK Laboratory Animal Co., Ltd (Shanghai, China). The mice were in the laboratory animal barrier system under specific pathogen-free conditions with a constant temperature and humidity. All animal tests and

experimental procedures were approved by the Ethical Committee of China Pharmaceutical University, Nanjing, China.

2.2. Methods

2.2.1. Tumor xenograft inoculation

Cells for human breast tumor xenograft were sourced from cell culture. Exponentially growing MDA-MB-231 cells were harvested and then centrifuged. The supernatant aspirated before resuspending the cell pellet in an appropriate volume of serum-free L-15 medium to obtain the final working concentration. The cell suspension was placed in ice to ensure cell survival.

Xenograft model of BC was established by a subcutaneous injection (sc.) of $3 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ MDA-MB-231 cells into the right flank region. After 7–10 days of growth, tumor tissues were cut into 1–3 mm³ pieces and implanted (sc.) into the right flank region of each mouse using a range trocar. Following ten days of growth, the nude mice with implanted tumor were screened for tumor volume. Tumor-bearing mice in which the tumors had reached a volume of 180–280 mm³ were selected. Tumor size was evaluated by measuring two perpendicular tumor diameters (a, length; b, width) 3 times a week with a slide caliper and the tumor volume (TV) was calculated according to the method developed by the American National Cancer Institute [16]: $V = (a \times b^2)/2$.

2.2.2. Mice treatment

Tumor-bearing mice were randomized into 7 groups (n = 6). Each group was closely matched before treatment, which began ten days after cell transplantation. Animals were intravenously injected (iv.) (Tail-vein injection) with: (1) Control (NS), (2) HP- β -CD (negative control), (3) DPT-HP- β -CD inclusion complex (containing 3.06% of DPT), (4) VP-16 and docetaxel (Positive control).

The maximum DPT-HP- β -CD tolerated dose in nude mice was 20 mg/kg [11]. Etoposide (VP-16) and docetaxel were used at the dose of (20 mg/kg) each, as described in our previous work [17]. The protocol of drugs and reagents administration is resumed in Table 1.

Table 1

The protocol of drugs and reagents administration.

No.	Groups	Number of animals	Route of administration	Doses (mg/kg)	Delivery volume (ml/20 g)	Dosage regimen
1	NS ^a	12	iv.	–	0.4	3 times/week \times 3 weeks
2	HP- β -CD	6	iv.	–	0.4	
3	DPT-HP- β -CD (5 mg/kg)	6	iv.	5	0.4	
4	DPT-HP- β -CD (10 mg/kg)	6	iv.	10	0.4	1 time/week \times 3 weeks
5	DPT-HP- β -CD (20 mg/kg)	6	iv.	20	0.4	
6	VP-16	6	iv.	20	0.4	
7	Docetaxel	6	iv.	20	0.4	

^a NS: Normal saline (0.9% sodium chloride).

Table 2

Experimental effect of DPT in MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice model.

Groups	Doses (mg/kg)	Route of administration	Number of animals	Body weight (g)		Tumor volume (TV, mm ³)		RTV	T/C (%)	Tumor weight (g)	IR/%	
				Beginning	End	d0	d21					d0
NS	–	iv	12	12	22.3 \pm 1.1	27.0 \pm 3.5	198 \pm 57	6467 \pm 2561	35.59 \pm 5.16	7.23 \pm 0.78		
HP- β -CD	–	iv	6	6	22.5 \pm 2.0	28.8 \pm 3.4	194 \pm 52	5704 \pm 2214	29.32 \pm 3.28	82.38	6.60 \pm 0.74	8.71
Docetaxel	20	iv	6	6	22.8 \pm 0.7	20.7 \pm 4.0**	197 \pm 71	2082 \pm 809***	10.98 \pm 1.29***	30.86	2.29 \pm 0.35***	68.29
VP-16	20	iv	6	6	22.6 \pm 1.2	19.1 \pm 1.9***	193 \pm 60	1453 \pm 567***	7.73 \pm 1.21***	21.72	1.63 \pm 0.30***	77.45
DPT-HP- β -CD	5	iv	6	6	22.3 \pm 0.8	26.9 \pm 3.6	197 \pm 63	2802 \pm 556***	15.26 \pm 1.78**	42.87	4.35 \pm 0.94*	39.84
DPT-HP- β -CD	10	iv	6	6	22.5 \pm 1.4	24.7 \pm 2.0	197 \pm 68	2165 \pm 715***	12.12 \pm 2.14***	34.04	2.37 \pm 0.39***	67.21
DPT-HP- β -CD	20	iv	6	6	22.8 \pm 1.2	17.4 \pm 1.1***	195 \pm 76	596 \pm 128***	3.43 \pm 0.55***	9.63	0.71 \pm 0.11***	90.15

d: day after drug administration.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, vs NS control group.

2.2.3. Tumor growth evaluation

The effects of DPT-HP- β -CD on the tumor–growth curve (T/C) were evaluated in terms of the lowest T/C value (%) during the experiment, where T is the relative mean tumor weight of the treated group and C the relative tumor weight of the control group at any given time. The growth kinetic antitumor activity was evaluated as positive when the lowest T/C was $\leq 40\%$ and P value < 0.05, following the guidelines of the Developmental Therapeutics Program for solid tumors of the Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD) in the National cancer institute (NCI) [18].

The T/C (%) is calculated by the formula: $T/C (\%) = (T_{RTV}/C_{RTV}) \times 100\%$ (T_{RTV} : relative tumor volume of treatment group, C_{RTV} : relative tumor volume of control group). Relative tumor volume (RTV) was assessed by dividing the tumor volume on different observation days by the starting tumor volume.

The mice were sacrificed on day 21 after the initial treatment. The effect of the agents on tumor growth was evaluated in terms of the T/C value (%). The tumor growth inhibition rate is also used as a reference test and calculated as: $IR (\%) = (\text{tumor weight of control group} - \text{tumor weight of treatment group}) / \text{tumor weight of control group} \times 100\%$. The $IR \geq 60\%$ and $P < 0.05$ are considered as statistically significant.

2.3. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Statistically significant differences were assessed via Mann Whitney test, a non-parametric test. The criterion for significance was a P value < 0.05.

3. Results

To evaluate the anti-tumor effects of DPT on human BC *in vivo*, we employed a MDA-MB-231 BC cell line xenograft tumor model, measuring body weight, tumor volume (TV), T/C, RTV and IR. The results are presented in Table 2 and Fig. 2A–D. At the end of the experiment, there were no deaths in all the groups.

After 3 weeks, body weight significantly decreased in docetaxel (20 mg/kg), VP-16 (20 mg/kg) and DPT-HP- β -CD (20 mg/kg) by 20.7 ± 4.0 , 19.1 ± 1.9 and 17.4 ± 1.1 g compared to that of untreated group (27.0 ± 3.5 g) (Fig. 2A).

Intravenous DPT-HP- β -CD at 5 and 10 mg/kg gave a TV of 2802 ± 556 and 2165 ± 715 mm³, respectively. In marked contrast, mice treated with 20 mg/kg gave a TV of 596 ± 128 mm³ against 6467 ± 2561 mm³ in the control group; whereas docetaxel and VP-16 treated mice had a TV of 2082 ± 809 and 1453 ± 567 mm³, respectively (Fig. 2B).

The *in vivo* growth modulation of the tumors was assessed by determining the percentage of T/C and RTV value of growth kinetics (Fig. 2C and D). In the groups treated with 5, 10 and 20 mg/kg of DPT-HP- β -CD, the T/C value decreased to 42.87, 34.04 and 9.63%, respectively, after 3 weeks of DPT-HP- β -CD intravenous therapy. In the groups treated with positive controls, VP-16 and docetaxel, the T/C value were 21.72 and 30.86%, respectively.

As shown in Table 2, with the increasing doses of DPT-HP- β -CD, the tumor weight IR of DPT-HP- β -CD treated mice gradually increased compared to untreated mice. Thus, DPT-HP- β -CD was found to significantly inhibit the growth of tumors in a

concentration-dependent manner. The IR (%) of groups treated with 5 and 20 mg/kg of intravenous DPT-HP- β -CD reached 39.84 and 90.15%, respectively, compared to 77.45% in VP-16 (20 mg/kg) treated groups. Moreover, treatment with 10 mg/kg of DPT-HP- β -CD or 20 mg/kg of docetaxel inhibits tumor growth at equal proportions (67.21% and 68.29%, respectively).

The typical size and the macroscopic appearance of MDA-MB-231 human breast tumor nodules in the treated and untreated groups are shown in Fig. 3.

4. Discussion

Previous studies showed that DPT induces apoptosis and cell death in human BC MDA-MB-231 cell line, *in vitro* [14]. However, *in vivo* studies have not been carried out yet, though they are needed to carry out clinical trials in humans and enable the development of new anti-cancer agents. This study is the first of its kind to investigate the antitumor effect of DPT in MDA-MB-231 human BC xenograft in BALB/c nude mice model.

Our results showed that DPT exhibited potent inhibitory effect in terms of the weight of the xenograft which suggests that DPT

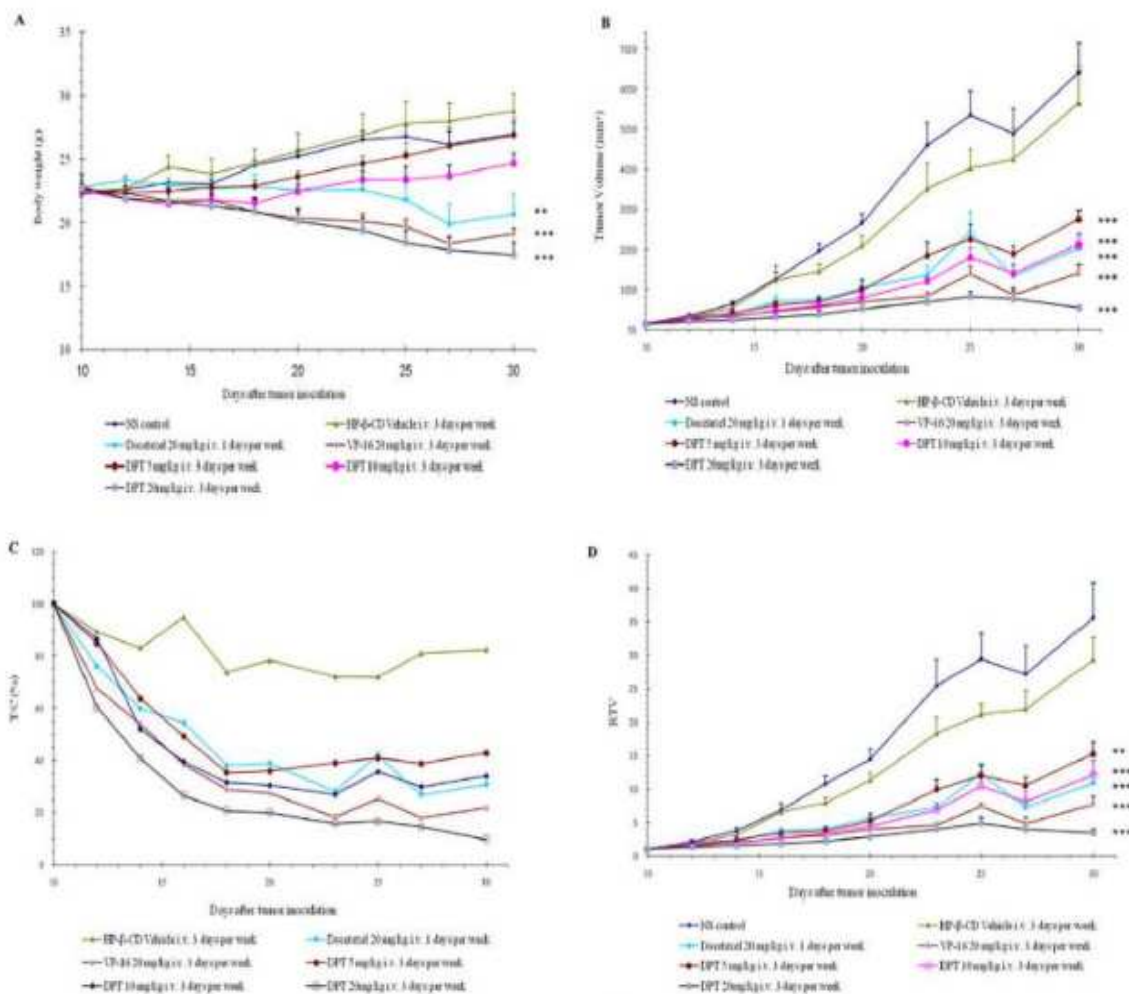


Fig. 2. In-vivo effect of DPT in MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice model. After the MDA-MB-231 human breast tumors reached 100–140 mm³ in size, DPT-HP- β -CD treatment (5, 10 and 20 mg/kg) and positive controls, etoposide (20 mg/kg) and docetaxel (20 mg/kg), were administered. HP- β -CD and NS were also administered. After 21 days of treatment, the statistical difference between the control and treated groups was determined by the Mann Whitney test. Values are the mean of relative tumor volume. (A) Effect of intravenous DPT-HP- β -CD on body weight in nude mice during tumor xenograft study (***P* = 0.004, ****P* = 0.0001). (B) Effect of intravenous DPT-HP- β -CD on tumor volume in nude mice (****P* < 0.001). (C) Effect of DPT-HP- β -CD on tumor growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer nude mice. (D) Antitumor activity of the DPT-HP- β -CD against the growth of the xenograft (****P* < 0.001, ***P* < 0.01).



Fig. 3. Typical size and macroscopic appearance of MDA-MB-231 human breast cancer nodules on day 21 in the control and drugs treated nude mice.

therapy can be considered to significantly affect tumor growth. We used two positive controls: etoposide (another derivative of podophyllotoxin) and docetaxel which are well known chemotherapy agents used in BC treatment. The tumor growth inhibition T/C (%) is used to measure the antitumor effect of treatment in drug screening tumor xenograft experiments [19]. According to T/C (%) value, the dose of 20 mg/kg of intravenous DPT-HP- β -CD significantly inhibits tumor growth compared to both VP-16 and docetaxel administrated at the same dose. However, DPT-HP- β -CD (20 mg/kg) slow-down mice body weight. So, the dose of (10 mg/kg) seems to be the more appropriate for DPT-HP- β -CD use because at this dose, T/C (%) value of both DPT-HP- β -CD (10 mg/kg) and docetaxel (20 mg/kg) is indistinguishable and lead to fewer body weight loss. Weight loss in case of DPT-HP- β -CD is mainly due to gastrointestinal reaction after DPT intravenous injection, resulting in reduced food intake, it is also a common side effect of cancer chemotherapy drugs.

Consistent with the above findings and from the tumor growth inhibition rate (IR) results, the intravenous administration of 10 mg/kg of DPT-HP- β -CD and 20 mg/kg of docetaxel in nude mice induce similar effect on human BC MDA-MB-231 tumor growth. Hence, our data plainly indicated that DPT-HP- β -CD has a strong anti-tumor activity *in vivo* with a rational safety margin. Moreover, our findings demonstrate that intravenous DPT-HP- β -CD treatment of subcutaneously established human BC MDA-MB-231 xenograft has a marked tumor growth inhibition since the effective dose is <10 mg/kg.

The unique animal study that was interested in the *in vivo* effect of DPT was conducted using SGC-7901 gastric cancer cells in a xenograft model. It revealed that DPT significantly inhibited tumor growth and decreased microvessel density [20]. Thus, our study gives more insights to the *in vivo* anti-tumor efficacy of DPT but in BC.

In conclusion, DPT is an effective treatment of human BC MDA-MB-231 xenograft. These findings opened a new window for

research to validate the *in vivo* activity of DPT in animals and to further allow its clinical use as a promising agent in the area of BC therapy.

Conflicts of interest

All authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from the National Natural Science Foundation of China (81274146), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (YD2014SK0002).

References

- [1] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49: 33–64.
- [2] Ferlay J, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide. IARC CancerBase 2012; No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. accessed on 11th December 2015.
- [3] Roulland E, Magiatis P, Arimondo P, Bertounesque E, Monneret C. Hemisynthesis and biological activity of new analogues of podophyllotoxin. *Bioorg Med Chem* 2002;10:3463–71.
- [4] Khaled M, Jiang ZZ, Zhang LY. Deoxy podophyllotoxin: a promising therapeutic agent from herbal medicine. *J Ethnopharmacol* 2013;149:24–34.
- [5] Aisner J, Lee EJ. Etoposide. Current and future status. *Cancer* 1991;67:215–9.
- [6] Bontenbal M, Planting AS, Verweij J, de Wit R, Kruit WH, Stoter G, et al. Second-line chemotherapy with long-term low-dose oral etoposide in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995;34:185–9.
- [7] O'Brien ME, Leonard RC, Barrett-Lee PJ, Eggleton SP, Bizzari JP, UK study group. Docetaxel in the community setting: an analysis of 377 breast cancer patients treated with docetaxel (taxotere) in the UK. *Ann Oncol* 1999;10:205–10.
- [8] Kouroussis C, Androulakis N, Kakolyris S, Souglakos J, Kotsakis T, Mavroudis D, et al. Dose-escalation study of docetaxel in combination with mitoxantrone as first-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:862–9.
- [9] Ravdin PM, Burris HA, Cook G, Eisenberg P, Kane M, Bierman WA, et al. Phase II trial of docetaxel in advanced anthracycline-resistant or anthracenedione-resistant breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:2879–85.
- [10] Qin YY, Li H, Gao XJ, Ye XF, Wei X, Zhou YH, et al. Adjuvant chemotherapy, with or without taxanes, in early or operable breast cancer: a meta-analysis of 19 randomized trials with 30698 patients. *PLoS One* 2011;6:e26946.
- [11] Zhu X, Wu BJ, Luo HW, Tao L, Zhao Q, Guo QL, et al. Preparation of solid inclusion complex of deoxy podophyllotoxin- sbe- β -cd and its antitumor activity. *JCPU* 2010;41:447–50.
- [12] Gould S, Scott RC. 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (hp- β -cd): a toxicology review. *Food Chem Toxicol* 2005;43:1451–9.
- [13] Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol* 2008;36:30–42.
- [14] Benzina S, Harquail J, Jean S, Beaugregard AP, Colquhoun CD, Carroll M, et al. Deoxy podophyllotoxin isolated from *Juniperus communis* induces apoptosis in breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2015;15:79–88.
- [15] Ovcaricek T, Frkovic SG, Matos E, Mozina B, Borstnar S. Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival. *Radiol Oncol* 2011;45:46–52.
- [16] Geran RI. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (3rd ed.) *Cancer Chemother Rep* 1972;3:51–61.
- [17] Luo HW, Wu BJ, Wu CX, Zhu X. Inclusion complex of deoxy podophyllotoxin of cyclodextrin, preparation method, use for treatment of cancer thereof. Zhejiang Jianfeng Pharmaceutical Holdings, China Pharmaceutical University, assignee; 2012. United States patent US 10823054.1.
- [18] Available from: <http://dctd.cancer.gov/FeaturedAgents/pdfs/SolidTumorModels.pdf>.
- [19] Wu J. Statistical inference for tumor growth inhibition t/c ratio. *J Biopharm Stat* 2010;20:954–64.
- [20] Wang YR, Xu Y, Jiang ZZ, Guerram M, Wang B, Zhu X, et al. Deoxy podophyllotoxin induces g2/m cell cycle arrest and apoptosis in sgc-7901 cells and inhibits tumor growth *in vivo*. *Molecules* 2015;20:1661–75.

(DPT) Deoxydopodophyllotoxin هو مركب شبه اصطناعي مستخلص من *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng، واحدة من أكثر الأعشاب الطبية الصينية شعبية. هذا البحث يهتم بدراسة السمية الخلوية لـ DPT داخل خلايا سرطان الثدي MCF-7 و MDA-MB-231، في كل من المختبر والجسم الحي. وكشفت بياناتنا أن علاج DPT أدى إلى تثبيط نمو الخلايا MCF-7 و MDA-MB-231، بصفة جرعة - استجابة، مع قيمة منخفضة جدا لـ IC_{50} (10.91 نانومول/ لتر و 20.02 نانومول/ لتر، على التوالي). وقد عطل DPT الهيكل الخلوي وأدى إلى توقيف معتبر لدورة الخلية في المرحلة G2/M في كلتا الخليتين من خلال التداخل مع البروتينات التنظيمية لدورة الخلية: cyclin B1، cdc25c و CDK1. في الخلايا MCF-7، كان تثبيط دورة الخلية مرتبطا مع موت الخلايا المبرمج، والذي اعتمد على ال-caspase. بينما، في الخلايا MDA-MB-231، DPT هو مثبط وقل بشكل كبير تكاثر الخلايا عن طريق توقيف دورة الخلية في المرحلة G2/M دون تحريض موت الخلايا المبرمج. في المختبر، وجد أن DPT هو مضاد قوي للورم وعامل مضاد للتكاثر في العديد من الخلايا السرطانية. ومع ذلك، لم يتم استخدام DPT سريريا وذلك لعدم وجود دراسات في الجسم الحي. الدراسة الحالية هي أول تقرير يكشف تأثير DPT المضاد للورم على الطعوم الأجنبية لسرطان الثدي البشري MDA-MB-231، في الفئران عارية. DPT حال، بشكل ملحوظ، دون نمو الطعم الأجنبي MDA-MB-231 في الفئران عارية من نوع BALB/c. حيث ساوت قيمة T/C (قيمة حجم الورم النسبي لمجموعة العلاج مقارنة مع المجموعة المرجعية) في المجموعات المعالجة بـ 5، 10 و 20 ملغ/ كغ من DPT-HP- β -CD الوريدي نسبة 42.87%، 34.04% و 9.63% على التوالي، ما يشير إلى نشاط إيجابي لـ DPT، مضاد للورم. بالإضافة إلى ذلك، كان تأثير مضاد الورم DPT-HP- β -CD (20 ملغ/كغ) في الطعم الأجنبي لسرطان الثدي البشري MDA-MB-231 أكثر فعالية من ال-etoposide (VP-16) (20 ملغ/كغ) و docetaxel (20 ملغ/كغ). وتشير هذه النتائج إلى أن هذا الدواء مرشح واعد في العلاج الكيميائي ضد سرطان الثدي البشري.

كلمات البحث: DPT؛ مرحلة G2/M؛ السمية الخلوية؛ DPT-HP- β -CD؛ الطعم الأجنبي؛ VP-16؛ docetaxel.

Abstract

Deoxydopodophyllotoxin (DPT) is a semi-synthetic compound derived from the extract of *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng, one of the most popular Chinese herbal medicines. The present study evaluates the *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity of DPT on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Our data revealed that DPT treatment resulted in a dose-responsive inhibition of MCF-7 and MDA-MB-231 cell growth with very low IC_{50} (10.91 nM and 20.02 nM, respectively). It disrupted the cytoskeleton and induced significant cell cycle arrest at the G2/M phase in both cell lines through the interference with cell cycle regulatory proteins: cyclin B1, cdc25c and CDK1. In MCF-7 cells, cell cycle inhibition was associated with apoptosis, which was caspase-dependent. However, in MDA-MB-231 cells, DPT is cytostatic and significantly suppresses proliferation by cell cycle arrest at G2/M phase without apoptotic induction. DPT was found to be a potent antitumor and antiproliferative agent, in several tumor cells, *in vitro*. However, DPT has not been used clinically yet because of the lack of *in vivo* studies. This study is the first report demonstrating the antitumor effect of DPT on MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice. DPT, significantly, inhibited the growth of MDA-MB-231 xenograft in BALB/c nude mice. The T/C value (the value of the relative tumor volume of treatment group compared to the control group) of groups treated with 5, 10, and 20 mg/kg of intravenous DPT-HP- β -CD was 42.87%, 34.04% and 9.63%, respectively, suggesting the positive antitumor activity of DPT. In addition, the antitumor effect of DPT-HP- β -CD (20 mg/kg) in human breast cancer MDA-MB-231 xenograft was more effective than etoposide (VP-16) (20 mg/kg) and docetaxel (20 mg/kg). These findings suggest that this drug is a promising chemotherapy candidate against human breast carcinoma.

Keywords: DPT; G2/M phase; cytotoxicity; DPT- β -CD; xenograft; VP-16; docetaxel.

Résumé

Désoxydopodophyllotoxine (DPT) est un composé semi-synthétique dérivé de l'extrait de *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng, l'une des plantes médicinales chinoises les plus populaires. La présente étude évalue la cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* de la DPT sur les lignées de cellules de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Nos données ont révélé que le traitement par la DPT a entraîné une inhibition dose-réponse de la croissance cellulaire MCF-7 et MDA-MB-231 avec une CI_{50} très faible (10,91 nM et 20,02 nM, respectivement). Elle a perturbé le cytosquelette et a induit un arrêt important du cycle cellulaire à la phase G2/M dans les deux lignées cellulaires grâce à l'interférence avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire: cycline B1, cdc25c et CDK1. Dans les cellules MCF-7, l'inhibition du cycle cellulaire était associée à l'apoptose, qui était caspase-dépendante. Cependant, dans les cellules MDA-MB-231, la DPT est cytostatique et supprime de manière significative la prolifération par arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M sans induction apoptotique. La DPT s'est révélée être un agent antitumoral et antiprolifératif puissant, dans plusieurs cellules tumorales, *in vitro*. Cependant, la DPT n'a pas encore été utilisé cliniquement en raison de manque d'études *in vivo*. Cette étude est le premier rapport démontrant l'effet antitumoral de la DPT sur les xénogreffes de cancer du sein humain MDA-MB-231 chez des souris nues. La DPT a inhibé, de manière significative, la croissance de la xénogreffe MDA-MB-231 chez les souris nues BALB/c. La valeur T/C (la valeur du volume tumoral relatif du groupe de traitement par rapport au groupe témoin) des groupes traités avec 5, 10 et 20 mg/kg de DPT-HP- β -CD intraveineux était de 42,87%, 34,04% et 9,63%, respectivement, suggérant l'activité antitumorale positive de la DPT. En outre, l'effet antitumoral de la DPD-HP- β -CD (20 mg/kg) sur la xénogreffe de cancer du sein humain MDA-MB-231, était plus efficace que l'étoposide (VP-16) (20 mg/kg) et le docétaxel (20 mg/kg). Ces résultats suggèrent que ce médicament est un candidat prometteur de la chimiothérapie contre le cancer du sein humain.

Mots-clés: DPT; phase G2/M; cytotoxicité; DPT- β -CD; xénogreffe; VP-16; docétaxel.