

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Ecole Nationale Polytechnique
Département du Génie de l'Environnement
Thèse de Doctorat
En Génie de l'Environnement

Présentée par :

M^r Bouhenna Mustapha Mounir

Ingénieur d'état en biologie option Génie Biologique de l'USTHB

Magister en Génie de l'Environnement option Biotechnologies
Environnementales de l'ENP

Intitulé

**EFFETS DES DERIVEES DE LA
CHITINE, DES COMPOSES SPIRO ET
DES DERIVES COUMARINIQUES SUR
DES LIGNEES CANCEREUSES
HUMAINES**

Soutenue publiquement le 23/01/2018 devant le jury composé de :

Président :	GRIB HOCINE	Professeur	ENP
Rapporteur :	MAMERI NABIL	Professeur	ENP
Examineurs :	ABDI NADIA	Professeur	ENP
	CHIKHI NASSIMA	Maitre de Conférences	ENV
	BAKOUR RABAH	Professeur	USTHB
	HARRAT ZOUBIR	Professeur	IPA

ENP 2018

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Ecole Nationale Polytechnique
Département du Génie de l'Environnement
Thèse de Doctorat
En Génie de l'Environnement

Présentée par :

M^r Bouhenna Mustapha Mounir

Ingénieur d'état en biologie option Génie Biologique de l'USTHB

Magister en Génie de l'Environnement option Biotechnologies
Environnementales de l'ENP

Intitulé

**EFFETS DES DERIVEES DE LA
CHITINE, DES COMPOSES SPIRO ET
DES DERIVES COUMARINIQUES SUR
DES LIGNEES CANCEREUSES
HUMAINES**

Soutenue publiquement le 23/01/2018 devant le jury composé de :

Président :	GRIB HOCINE	Professeur	ENP
Rapporteur :	MAMERI NABIL	Professeur	ENP
Examineurs :	ABDI NADIA	Professeur	ENP
	CHIKHI NASSIMA	Maitre de Conférences	ENV
	BAKOUR RABAH	Professeur	USTHB
	HARRAT ZOUBIR	Professeur	IPA

ENP 2018

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, ainsi que tous ceux qui m'ont apporté leur soutien durant ces cinq années de doctorat.

Tout d'abord, je remercie Monsieur Nabil Mameri, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour les très précieux conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail dont il a assuré la direction.

Mes remerciements s'adressent, également, à Monsieur Khaldoun Bachari, Directeur du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) pour avoir rendu possible ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements au Professeur Marc Diederich pour m'avoir donné l'opportunité non seulement de travailler dans son laboratoire, mais aussi de m'avoir offert d'excellentes conditions de travail et de m'avoir prodigué de précieux conseils.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Professeur Walter Luyten pour l'aide précieuse et la confiance qu'il m'a accordées en m'accueillant au sein de son laboratoire, en m'intégrant facilement dans son équipe et en mettant à ma disposition tout ce dont j'avais besoin pour mon travail.

J'aimerais également remercier le Docteur Bart Landuyt, Monsieur Sven Verguts pour leur aide précieuse dans le traitement des données du système de « celle sine » et Monsieur Zjef Nackaerts pour son assistance technique.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Patrizia Agostinis et à son équipe de laboratoire pour leurs précieux conseils théoriques et techniques, en particulier dans le test Western blot.

Que Monsieur Rabah Bakour, Professeur à l'U.S.T.H.B, avec qui j'ai eu de fructueuses discussions, veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude.

Que Monsieur H.Grib, Professeur à l'ENP, Madame N. Abdi, Professeur à l'ENP, Madame N. Chiki, Maître de Conférences à l'ENSV, et Monsieur le Docteur, Z.Harrat, Directeur de l'Institut Pasteur d'Algérie, trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir bien voulu accepter de participer au jury de ce travail malgré leurs nombreuses occupations.

Je voudrais également remercier Mademoiselle Barbora Orlikova, Ph.D., pour son excellente supervision, pour ses conseils attentionnés qui ont été extrêmement précieux pour mon étude à la fois théorique et pratique

J'associe également à ces remerciements Monsieur Oualid Talhi, Maître de recherche au CRAPC, pour ses encouragements et pour m'avoir gracieusement permis d'utiliser et de travailler sur ses molécules.

Je remercie aussi l'ensemble des membres de mon laboratoire, les membres du laboratoire du Professeur Marc Diederich en Corée, les membres du laboratoire du Professeur Walter Luyten en Belgique, pour leur aide et leur coopération.

Je ne saurais oublier l'attitude sympathique à mon égard et les facilités qui m'ont été accordées par le personnel de l'ENP, du CRAPC et de l'I.P.

Je remercie toutes les personnes qui ont apporté leur aide pour le bon déroulement de mon projet de thèse, notamment, Madame N.Eddaikra, M^r M.Kerat, Hamida, M^rA.Chami, M^{elle} I.Aribei M^r C.Bensouici et M^{elle} L.Boularas.

Je ne saurais oublier l'attitude sympathique, le soutien et l'encouragement constants de mes amis et de mes proches , plus particulièrement de ma mère, de mon père et de ma sœur : Par leur compréhension, leur patience et leurs sacrifices, ils m'ont permis d' arriver là où je suis aujourd'hui.

Merci à vous tous !

الملخص:

في هذا العمل، تم دراسة التأثير المضاد للسرطان لمشتقات الكيتين: الكيتوزان و نواتج تفككه و كذلك تأثير مجموعتين من تصنيعه كيميائيا : المجموعة الأولى مكونة من ستة جزيئات السبيرو 4-9 [لاكتون-سيكلوهكسانون] والمجموعة الثانية مكونة من تسعة مشتقات كرومون والكومارين (1-9)، ضد مختلف خلايا سرطانية بشرية. أظهرت النتائج أن المركبات سبيرو 4 و 9 اثرت بشكل كبير على سلامة وتكاثر خطوط الخلايا k562 وU937. أظهر المركب 4 إمكانية تثبيط تفعيل NF- κ B الناتجة عن تحفيز TNF ألفا بطريقة تعتمد على الجرعة. وقد أظهرت المركبات 1، 2، 8 و 9 القدرة على تثبيط انتشار الخلايا الأكثر إثارة للاهتمام من بين مجموعة مشتقات الكرومون والكومارين. المركب 8 تسبب في موت خلوي مبرج (الاستماتة) للخلايا HCT-116 بطريقة تعتمد على الجرعة والزمن، كما يمكن أن يرى من نتائج تقنية قياس التدفق الخلوي وتقنية لطخة ويسترن.

الكلمات الدالة: التأثير المضاد للسرطان، موت خلوي مبرج، مشتقات الكومارين، السمسة، XCELLIGENCE.

Abstract:

In this study, the anti-cancer activity of chitin derivatives: chitosan and chiosan oligosaccharide, well as that of two groups of molecules chemically synthesized: a first group of six spiro molecules [lactone-cyclohexanone] 4-9 compounds spiro and a second group of nine chromone and coumarin derivatives (1-9) was assessed against different human cancer cell lines. The results showed that among them, 4 and 9 down-regulated cancer cell viability and proliferation. Compound 4 inhibited TNF α -induced NF- κ B activation in a dose-dependent manner. Compounds 1,2,8 and 9 showed the most interesting proliferation inhibition potential of the cell lines among the chromone and coumarin derivatives group. Compound 8 induces apoptotic cell death in HCT-116 cells in a dose and time dependent manner, as can be seen from the results of flow cytometry and Western blotting.

Key words: Anti tumoral activity, apoptosis, coumarine derivatives, cytotoxicity, XCELLIGENCE.

Résumé :

Dans ce travail, l'effet anti cancéreux des dérivés de la chitine: le chitosane et les chitosane oligosaccharides, ainsi que celui de deux groupes de molécules synthétisées chimiquement : un premier groupe de six molécules spiro [lactone-cyclohexanone] 4-9 et un deuxième groupe de neuf dérivés chromone et coumarin (1-9), a été évalué envers différentes lignées cancéreuses humaines. Les résultats ont montré que les composés spiro 4 et 9 affectaient significativement la viabilité et la prolifération des lignées cellulaires K562 et U937. Le composé 4 a montré un potentiel d'inhibition de l'activation du NF- κ B induite par le TNF α d'une manière dose-dépendante. Les composés 1,2,8 et 9 ont montré le potentiel d'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires le plus intéressant parmi le groupe des dérivés chromone et coumarine. Le composé 8 a induit la mort cellulaire par apoptose aux cellules HCT-116, d'une manière dépendante de la dose et du temps, comme on peut le constater avec les résultats de la cytométrie en flux et du Western blot.

Mots-clés : Activité anti-tumorale, apoptose, dérivés coumariniques, cytotoxicité, XCELLIGENCE.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Abbreviations

I- Introduction	17
II- Etude bibliographique.....	20
II-1- Le cancer.....	21
II-1-1- Epidémiologie.....	21
II-1-2- C'est quoi le cancer ?.....	24
II-2- Leucémies.....	29
II-2-1- La leucémie myéloïde chronique (LMC).....	30
II-2-2- La leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	31
II-2-3- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).....	33
II-2-4- La leucémie aiguë lymphoïde (LAL).....	34
II- 3- Mort cellulaire.....	36
II-3-1- Apoptose.....	37
II-3-1-1- Phénotype apoptotique.....	37
II-3-1-2- Mécanisme de l'apoptose.....	39
II-3-1-2- 1- Voie extrinsèque.....	39

II-3-1-2- 1- Voie intrinsèque.....	40
II-4- Les caspases.....	41
II-5- Régulation de l'apoptose par la voie NF-kB.....	44
5-1- Les protéines NF-kB/Rel.....	45
II-5-2- Les protéines IκB.....	47
II-5-3- Mécanismes d'activation du NF-kB.....	48
II-6- Analyse cellulaire en temps réel par mesure d'impédance.....	50
II-6-1- Principe.....	50
II-7- La cytométrie en flux.....	52
II-8- Chitine et chitosane.....	52
II-8-1- Définition et structure chimique de la chitine	52
II-8-2- Les dérivés de la chitine.....	54
II-9- Benzopyrane.....	55
II-9-1-1- Chromone.....	55
II-9-1-2- Coumarine.....	57
II-10- Composés spiro.....	58
III- Matériels et méthodes.....	62
III-1- Les composés.....	63
III-1-1- Les dérivés de la chitine.....	63
III-1-2- Les composés Spiro.....	66

III-1-3- Dérivés chromone et coumarin.....	67
III-2- Culture cellulaire et test de cytotoxicité	70
III-2- 1 Caractéristiques des lignée cellulaires.....	70
III-2- 2- Conditions de culture et d'entretien des différentes lignées cellulaires.....	70
III-2- 2- 1-Lignées en suspension (K562 et U937).....	70
III-2- 2- 2- Lignées adhérentes.....	72
III-3- Transfection et système rapporteur luciférase.....	74
III-3- 1- Principe des gènes rapporteurs.....	74
III-3- 2- Principe du système rapporteur luciférase.....	75
III-3- 3- Transfections.....	75
III-3- 4- Transfections.....	76
III-4- Mesure de l'activité caspases 3-7	77
III-5- Western Blot.....	80
III-6- Double marquage à l'annexine V/Iodure de Propidium.....	81
IV- Résultats et discussion.....	84
IV -1- Effet du chitosan et du chitoooligosaccharide (COS) sur la viabilité et la prolifération cellulaire des lignées leucémiques K562	85
IV -2- Effet des composés spiro 4-9 sur la viabilité et la prolifération cellulaire des lignées leucémiques K562 et U937.....	91
IV -3- Effets du composé 4 et 9 sur l'activité de NF-kB activé par le TNF α dans les cellules K562.....	97
IV -4- L'effet du composé 4 sur l'induction de l'apoptose caspase-dépendante dans	

les cellules K562 et U937.....	100
IV -5- Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur l'impédance en fonction du temps sur les lignées cellulaires adhérentes.....	102
IV -6- Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des lignées cellulaires adhérentes.....	129
IV -7- Analyse de l'apoptose	133
IV -8- Analyse de corrélation entre les résultats obtenus par cytotoxicité et ceux obtenus avec FACS et western blot.....	138
V-conclusion et perspectives.....	139
VI- Références bibliographiques.....	142

Liste des figures

Figure 01 : Évolution estimée du nombre de cas de Cancer en Algérie.....	21
Figure 02 : Cancers Hommes : Répartition de l'incidence par tranches d'âges.....	22
Figure 03 : Cancers Femmes : Répartition de l'incidence par tranches d'âges.....	22
Figure 04 : Les formes de cancers les plus fréquents chez l'homme en Algérie Année 2010.....	23
Figure 05 : Les formes de cancers les plus fréquents chez la femme en Algérie Année 2010.....	24
Figure 06 : Translocation réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 qui aboutit à la formation du chromosome Philadelphie.....	30
Figure 7 : Structure et classification des caspases de l'apoptose.....	43
Figure 8 : Membres de la famille Rel/NF-kB/IkB chez les mammifères.....	46
Figure 09: Famille des protéines IkB.....	47
Figure 10: Les trois voies d'activation de NF-kB.....	50
Figure 11 : Représentation schématique de la surveillance en temps réel des cellules adhérentes par le système RTCA (xCELLigence, ACEA Biosciences).....	51
Figure 12: Structures du D-glucose, du D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine.....	53
Figure 13: Structure de la chitine.....	53
Figure 14: Structure du chitosane	54
Figure 15 : Types de benzopyranes	55
Figure 16 : La structure générale et la numérotation des chromones.....	56
Figure 17 : Certains des systèmes de numérotation utilisés de la Chromone	56
Figure 18 : Réaction de Perkin	57
Figure 19 : Structure de l'alcaloïde spirocyclique	59
Figure 20 : Spirocétals.....	59

Figure 21 : La Horsfiline.....	60
Figure 22 : Chitosane 1,2.....	64
Figure 23 : Chitosane oligosaccharide lactate	65
Figure 24 : NucleoCounterR NC-100™.....	73
Figure 25 : Principe de la technologie xCELLigence	74
Figure 26: Principe de la transfection transitoire	75
Figure 27 : Système d'électroporation « Gene Pulser II » (Biorad).....	76
Figure 28 : Clivage par la caspase-3/7 du substrat luminogène contenant la séquence DEVD.....	78
Figure 29: Schéma du protocole du test Caspase-Glo® 3/7.....	79
Figure 30 : Attune® Acoustic Focusing Cytometer	82
Figure 31: Microscope à fluorescence Carl Zeiss	82
Figure 32 : Effets des différentes concentrations en acide acétique sur la prolifération des cellules K562.....	87
Figure 33 : : Effet des différentes concentrations du chitosane 1(A), du chitosane 2 (B) et du COS (3) sur la prolifération cellulaire des cellules k562.....	88
Figure 34 : Effets des différentes concentrations en acide acétique sur la viabilité des cellules K562.	89
Figure 35 : Effet des différentes concentrations du chitosane 1(A), du chitosane 2 (B) et du COS (3) sur la viabilité cellulaire des cellules k562.....	90
Figure 36: Effet des composés spiro 4-9 sur la viabilité cellulaire des cellules K562 par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan.	92
Figure 37: Effet des composés spiro 4-9 sur la prolifération cellulaire des cellules K562 (A et B) U937 (C et D) par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan.	95
Figure 38: Effet des composés spiro 4-9 sur la viabilité des cellules K562 (A et B) et U937 (C et D) par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan.	97
Figure 39: Effets des composés 4 et 9 sur l'activation de NF-kB par TNFα chez les cellules K562.....	99

Figure 40: Induction de l'activité caspase 3/7 par le composé 4 dans les lignées cellulaires leucémiques.....	101
Figure 41 : Ecart-type relatif de $ Z $ pendant 24 heures après l'ajout de Gossypol à une culture de cellules HepG2.....	103
Figure 42: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules HTC-116.....	107
Figure 43: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules HepG2.....	110
Figure 44: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules Hek293t.....	113
Figure 45: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules B16.....	116
Figure 46: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentration sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules MCF-7.....	119
Figure 47: L'effet des dérivés coumariniques et chromones à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules Caco 2.....	122
Figure 48: L'effet des dérivés coumariniques et chromones à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules A549.....	125
Figure 49: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules HCT116.....	129
Figure 50: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules HEK293t.....	129
Figure 51: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules B16.....	130
Figure 52: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules HepG2.....	130
Figure 53: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules MCF-7.....	131
Figure 54: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules A549.....	131
Figure 55: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules CaCo2.....	132
Figure 56: Détection des cellules apoptotiques en fonction du temps par la	

technique de coloration à l'annexine V-FITC/ iodure de propidium (PI), par FACS.....	137
---	------------

Liste des tableaux

Tableau 01 : Stéréotype phénotypique des cancers.....	26
Tableau 02 : Stéréo-génotype moléculaire du cancer.....	29
Tableau 03 : Principaux agents anticancéreux utilisés dans le traitement des LAL de l'adulte et leur mécanisme d'action.....	35
Tableau 04: Structures des spiro[lactone-cyclohexanone] 4-9.....	66
Tableau 05: Structures des composés Chromone et Coumarin 1-9	68
Tableau 06: Valeurs d'IC₅₀ de l'inhibition des lignées cellulaires cancéreuses par les composés 1-9.....	126

ABBREVIATIONS

AA	Acide Acétique
ABC	ATP binding cassette
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
Act D	Actinomycine D
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis inducing factor
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ALL	Acute lymphoid leukemia
AML	Acute myeloid leukemia
AMP	Adenosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ATP	Adenosine triphosphate
Bad	Bcl-associated death
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated x protein
Bcl-2	B-Cell lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region
c-ABL	Abelson pro-oncogene
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cystein-dependent aspartate-specific protease expression
C.elegans	Caenorhabditis elegans
CDC25	Cell division cycle 25

CDC25C	Cell division cycle 25 C
Cdk	Cyclin dependent kinase
Cdki	Cyclin dependent kinase inhibitor
CD40	Cluster of differation 40
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CML	Chronic myeloid leukemia
CO	Controle
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX(s)	Cyclooxygénase(s)
C-term	Carboxy-terminale
DED-D ₄ /D	Death effector domain
Disc	Death-Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E2F	Elongation 2 factor
EBV	Epstein Barr Virus
EGCG	Epigallocatechin gallate
EGF	Epithelial growth factor
EGTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ETO	Etoposide
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein
FAS (CD95)/ APO-1	Fatty acid synthase/ cluster of differentiation 95
FBS	Foetal bovin serum
GNT	Goniothalamine
HMWC	High-molecular-weight chitosan

H ₂ O	Eau
H ₂ O mQ	Eau milliQ
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50
IFN- γ	Interferon gamma
IKK	Inhibitor of κ B kinase
I κ B	Inhibitor of κ B
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
K562	Chronic myelogenous leukemia cancer cell line
KH ₂ PO ₄	Dipotassium phosphate
LMWC	Low-molecular-weight chitosan
LPS	Lipopolysaccharide
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
mL	Millilitre
mM	millimolaire
mm	millimetre
MMWC	Medium-molecular-weight chitosan
MPER	Mammalian Protein Extraction Reagent
Na ₂ HPO ₄	Disodium hydrogen phosphate
NF- κ B	Nuclear factor kappa B (NF- κ B)
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS-T	Phosphate-buffered saline Tween
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonucleic acid

RMPI	Roswell Park Memorial Institute
S	Seconde
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylenediamine
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNF α receptor-associated death domain protein, tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRAF _{1/2}	TNF α receptor-associated factor 1/2
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol
UV	Ultraviolet
μ g	microgramme
μ L	microlitre
μ M	micromolaire
U937	Histiocytic lymphoma cell line

I- Introduction :

Les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde; en 2012, on comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie [1]. Bien que l'incidence du cancer soit en augmentation dans la plupart des régions du monde, les taux d'incidence demeurent les plus élevés dans les régions les plus développées, mais la mortalité est relativement beaucoup plus élevée dans les pays en développement, faute de détection précoce et d'accès aux traitements. Une modification profonde du mode de vie collectif et individuel (augmentation du tabagisme, du stress, de la sédentarité, de l'urbanisation..) et d'un mode alimentaire déséquilibré sont à l'origine de l'émergence des Maladies Non Transmissibles (MNT) dont le cancer.

En Algérie, dans le cadre de la planification sanitaire du pays en 1975, le cancer avait été identifié comme le 17ème problème de santé. C'est seulement au cours des années 2000 que les spécialistes ont pris conscience de l'ampleur du problème [2]. Le constat établi a été que l'approche médicale restait centrée sur le curatif et qu'il n'existait pas de réflexion stratégique sur l'analyse factuelle concernant le patient et son environnement ainsi que sur la prévention. De plus, les grandes mutations et innovations scientifiques, technologiques et économiques sont actuellement tellement rapides et profondes qu'elles nécessitent une vigilance soutenue pour qu'à l'avenir, et en cas de besoin, l'Algérie puisse s'adapter rapidement.

C'est pour ces raisons que Monsieur le Président de la République a érigé la lutte contre le cancer en une grande priorité nationale et l'a inscrite en tant que chantier présidentiel à un niveau de mobilisation sans précédent. C'est dans le cadre de cette mobilisation, que se sont inscrits les deux rapports d'évaluation de 2013 dont les recommandations ont conduit tout naturellement à l'élaboration d'un "Plan National Cancer 2015-2019" [2].

Différents types de cancers peuvent être distingués selon la nature du tissu atteint. Ainsi, s'il s'agit de cellules épithéliales, le terme « carcinome » est utilisé pour désigner la tumeur. S'il s'agit de tissu de soutien (tissus conjonctifs), de tissus osseux, cartilagineux ou musculaire le terme « sarcome » est employé.

Le cancer peut aussi affecter les cellules du sang et ces cancers regroupent les lymphomes et les leucémies (ou leucoses). D'après les données de l'observatoire européen du cancer de 2008, les lymphomes et les leucémies étaient encore parmi les cancers les plus

fréquents en Europe. D'autres part, l'incidence de ces cancers est encore associée à un taux de mortalité élevé, d'où l'intérêt de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les plantes ont toujours été une excellente source d'agents biologiquement actifs utilisés dans la médecine traditionnelle. Les phytomédicaments égyptiens (comme la myrrhe, cassia, le thym, le henné, le genévrier, le ricin, le carvi, la marjolaine et la menthe verte), les plantes médicinales chinoises et la médecine ayurvédiques ont été utilisés depuis l'antiquité pour traiter différentes maladies et affections humaines [3].

Les médicaments anticancéreux actuellement utilisés sont principalement d'origine naturelle ou semi-synthétique dérivés de produits naturels. La littérature a révélé que 69% des agents anticancéreux approuvés depuis 1980-2002, sont d'origine ou développés à partir de sources naturelle [4].

Aussi, avons - nous entamé dans le cadre de la thèse de magister (2008-2012) un travail portant sur : « l'effet de la chitine et de ses dérivés sur les lignées cancéreuses humaines Hep2 et RD».

Les résultats obtenus nous ont poussés à élargir notre spectre de prospection parmi les familles de molécules obtenus par synthèse à partir de molécules connues pour leurs effets thérapeutiques en général et anticancéreux en particulier.

Ainsi, nous nous sommes intéressés dans la présente étude, à d'autres dérivés de la chitine mais aussi à d'autres groupes de molécules, connus pour leurs effets anticancéreux, à savoir: Les spirocycliques, les lactones, les chromones et les coumarines.

En effet, ces familles de molécules représentent des groupes intéressants de chémotypes dérivés de plantes avec un fort potentiel anticancéreux. Les spiro-lactones sont des molécules rencontrées dans une large gamme de produits naturels issus de plantes, champignons, insectes, sécrétions, toxines des mollusques et autres organismes vivants.

Beaucoup de ces composés affichent diverses propriétés biologiques attractives telles que les propriétés antimicrobiens, cytostatiques ou activités cytotoxiques, et sont généralement utilisés comme agents antibiotiques.

Etant donné les différents effets secondaires qu'engendre l'actuelle chimiothérapie ainsi que les médicaments anti tumoraux chimio-préventifs, la découverte de nouveaux médicaments, en particulier d'origine naturelle devient impératif. Les coumarines naturelles et synthétiques ont attiré une grande attention en raison de leur large gamme de propriétés biologiques, telles que les anticancéreux, anti-mutagènes, anti-inflammatoires, antibactériens et les activités antifongiques.

Cependant, les composés naturels ont généralement tendance à être moins puissants lorsqu'ils sont utilisés pour la prévention et le traitement du cancer. Pour cela, de nouvelles stratégies doivent être envisagées pour obtenir de nouveaux composés plus efficaces.

En plus des méthodes traditionnelles et classiques de criblage des plantes médicinales, des algues marines ou d'autres sources naturelles, de nouvelles approches dans ce domaine, telle que la «reverse pharmacognosie», devraient être couplées avec le «criblage à haut débit», le «criblage virtuel et les bases de données in silico» afin de trouver de nouveaux composés anticancéreux plus efficaces avec une toxicité inférieure et une activité supérieure.

En effet, si les connaissances de la chimie et du criblage à haut débit sont combinées, l'identification de nombreux composés actifs et sélectifs seraient possibles [5].

De notre part, nous avons utilisé une autre stratégie afin d'augmenter l'efficacité des agents anti tumoraux, et afin de lutter plus efficacement contre le cancer. Cette stratégie consiste à utiliser des composés après avoir subi des modifications sur leurs structures chimiques actives.

Basé sur le principe de la combinaison dans la conception de médicaments, le couplage de la coumarine avec différentes molécules bioactives est l'un des moyens les plus efficaces.

Ces dernières années, l'une des méthodes adoptées pour traiter le cancer est la combinaison de la chimiothérapie avec l'utilisation d'agents possédant différents mécanismes d'action. Par conséquent, une seule molécule contenant plus d'un pharmacophore, chacun avec différents modes d'action, pourrait être bénéfique pour le traitement du cancer.

Plusieurs groupes de recherche, qui ont adopté cette approche, ont récemment utilisé des molécules hybrides en couplant des coumarines avec différentes molécules bioactives, telles que le resvératrol, le maléimide et l'acide alpha-lipoïque; ces études ont abouti à de nouveaux composés présentant des activités antiplaquettaires, antioxydantes et anti-inflammatoires.

Dans notre étude, nous avons évalué l'effet antiproliférative et le potentiel d'inhibition du NF-kB de nos composés spiro, composés synthétiques, sur deux lignées de cellules leucémiques humaines différentes (U937 et K562). Aussi nous avons testé un deuxième groupe de molécules: Les dérivés chromone et coumarin pour leurs effets anticancéreux sur différentes lignées cancéreuses humaines avec la technique Real Time Cell Analyzer (xCELLigence).

II- Etude bibliographique

II-1- Le cancer :

II-1-1- Epidémiologie :

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans le monde. En 2015, 8,8 millions de personnes sont mortes du cancer, ce qui représente presque un décès sur 6 à l'échelle mondiale [1]. La fréquence des cancers pourrait augmenter de 50 % dans le monde, avec 15 millions de nouveaux cas par an en 2020.

A l'horizon 2030, il est prévu que le nombre de décès par cancer dans le monde s'élève à 13,1 millions [1].

En Algérie l'augmentation de l'incidence de cette maladie qui est passée de 80 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 1990 à plus de 107 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 2014 (c.a.d 41870 cas en 2014) est significative et il est prévisible qu'elle va progresser, pouvant atteindre rapidement 50.000 cas par an (Figure 01) [2]



Figure 01 : Évolution estimée du nombre de cas de Cancer en Algérie. [2]

Actuellement, l'âge moyen pour tous les cancers est de 54 ans. Cet âge est bas comparé à l'âge médian des cancers dans les pays développés (62 ans en moyenne).

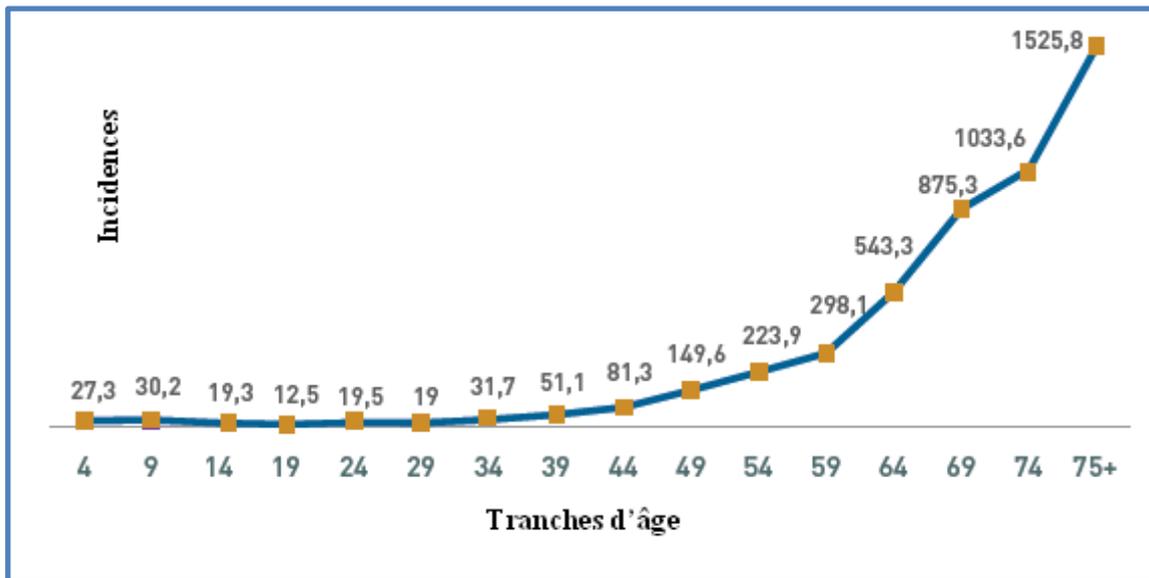


Figure 02 : Cancers Hommes : Répartition de l'incidence par tranches d'âges (Incidence pour 100.000 - Année 2010) [2]

La répartition des cancers par tranches d'âges souligne bien la tendance observée depuis le début de leur enregistrement, à savoir, un nombre de cas plus élevé chez les femmes, une apparition plus précoce du cancer chez les femmes (39 ans) que chez les hommes (49 ans) [2] et une diminution du nombre de cas à partir de 65 ans chez les femmes, âge auquel commence l'ascension de l'incidence masculine.

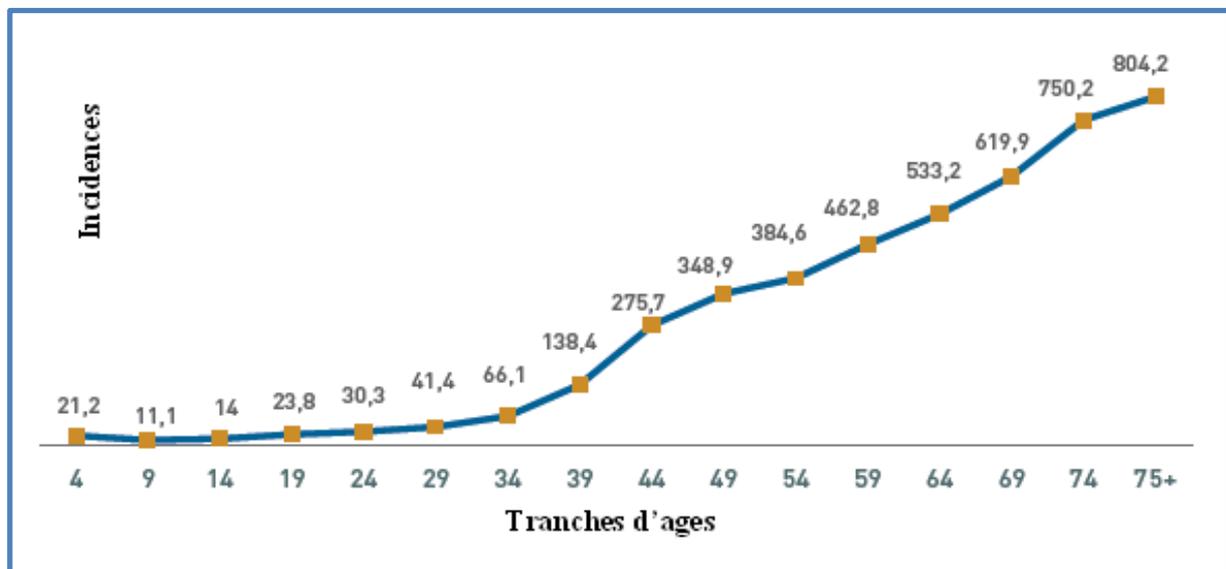


Figure 03 : Cancers femmes : Répartition de l'incidence par tranches d'âges (Incidence pour 100.000 - Année 2010) [2]

Les formes de cancer les plus fréquentes chez l'homme (Figures 04) sont ceux du poumon, du colo-rectum, de la vessie, de la prostate et de l'estomac. Ils constituent 52,5% de tous les cancers masculins.

Le cancer du poumon, à lui seul, représente environ 15% des cancers masculins. Ceci confirme et consolide les tendances depuis 2001 avec la prédominance, chez l'homme, des cancers liés au tabagisme (poumon - vessie), du cancer de la prostate qui connaît une augmentation rapide depuis le début des années 2000 et des cancers digestifs notamment colorectaux. L'élévation de l'incidence des cancers de la prostate se confirme. Il est, aujourd'hui, le 3ème cancer chez l'homme [2].

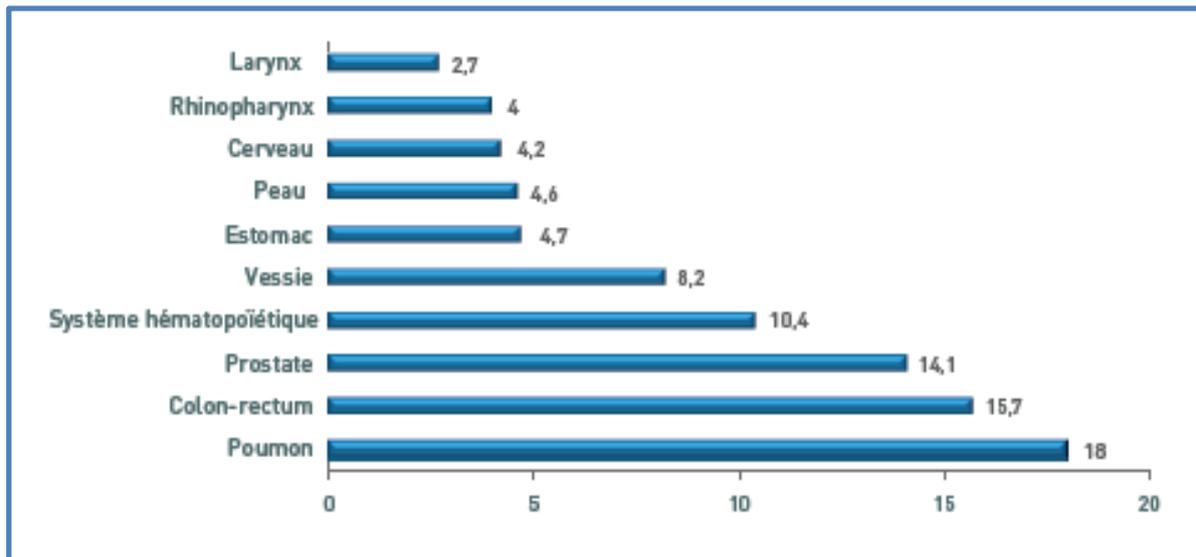


Figure 04 : Les formes de cancers les plus fréquents chez l'homme en Algérie
Année 2010 [2]

Les formes de cancer les plus fréquentes chez la femme (Figures 05) sont celles du sein, du colo rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, et de l'ovaire. Ils constituent 68,2% de tous les cancers féminins.

Les cancers du sein (40,45%) et du col de l'utérus (12,5%) totalisent, à eux deux, 52,95% de tous les cancers féminins [2].

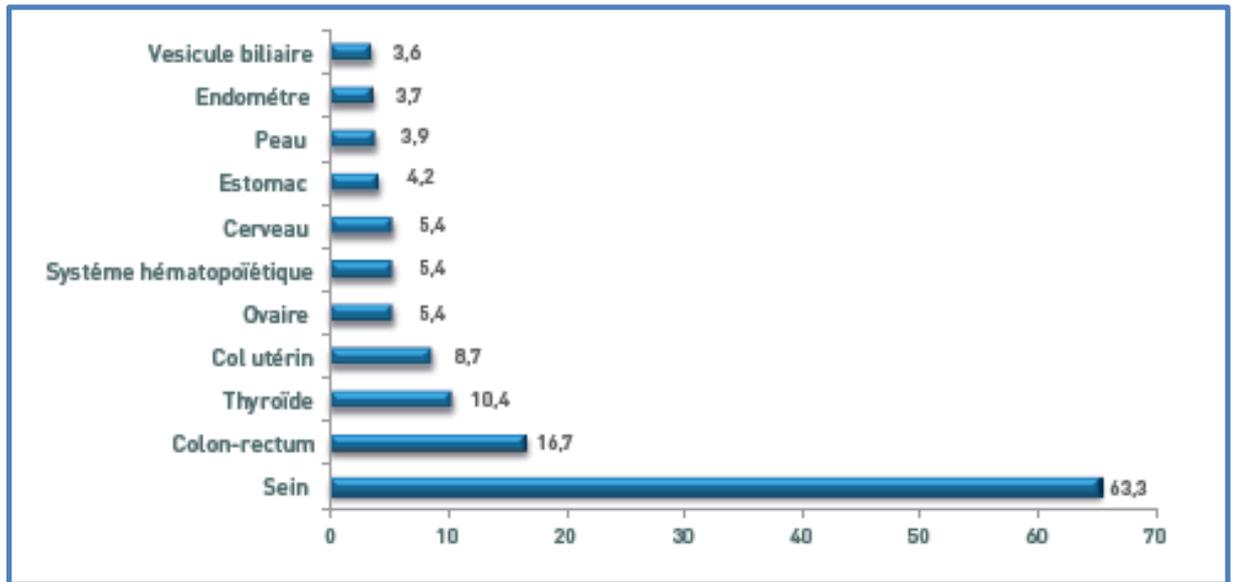


Figure 05 : Les formes de cancers les plus fréquents chez la femme en Algérie
Année 2010 [2]

Par ailleurs, de plus en plus d'enfants et d'adolescents sont touchés par le cancer. L'incidence du cancer augmente, tous les ans, de 1% chez les enfants et de 1,5% chez les adolescents.

Les formes de cancer les plus fréquentes chez l'enfant sont celles du système hématopoïétique, des ganglions lymphatiques, de l'encéphale, de l'os et du rein. Ils constituent 59,4% de tous les cancers de l'enfant de sexe masculin et 58,3% de tous les cancers de l'enfant de sexe féminin.

II-1-2- C'est quoi le Cancer ?

Le développement d'un cancer consiste en la transformation d'une cellule normale en une cellule maligne, par des déficiences dans les mécanismes qui contrôlent habituellement la croissance et la prolifération des cellules. Au cours du développement normal et tout au long de la vie adulte, des systèmes intriqués de contrôle génétique régulent l'équilibre entre naissance et mort des cellules en réponse à des signaux qui soit induisent la prolifération, soit l'inhibent, soit mènent à la mort des cellules. La perte de la régulation cellulaire qui conduit à la plupart ou à tous les cas de cancer est due à une lésion génétique. Le cancer se manifeste par une augmentation de la masse cellulaire, c'est-à-dire une tumeur. Dans certains cancers, la

tumeur primaire donne lieu à la dissémination de cellules qui envahissent d'autres tissus pour former des métastases [6].

Les cellules cancéreuses ont des propriétés morphologiques distinctes des cellules normales. Celles-ci constituent le fondement du diagnostic histologique des états néoplasiques, mais elles varient selon le tissu concerné. Malgré ces différences, les cellules cancéreuses manifestent en culture un certain nombre de traits communs qui caractérisent ce qu'on appelle la cellule «transformée».

Les principales caractéristiques phénotypiques des cellules transformées mise en culture sont :

- *Caractéristiques morphologiques :*

La transformation maligne d'une cellule se manifeste généralement par des modifications de la morphologie: Cellules arrondies à noyau généralement volumineux et plus réfringentes à l'examen microscopique. Ces changements phénotypiques indiquent que des modifications se sont produites au niveau des composants du cytosquelette de la cellule. [7]

- *La perte de l'inhibition de contact :* Alors que les cellules normales cessent de se multiplier lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules transformées continuent à se diviser au-delà de ce stade, s'empilent sur plusieurs couches et forment des **foyers** ;

- *La perte de la dépendance vis-à-vis de l'ancrage:* Contrairement aux cellules normales, sauf les cellules hématopoïétiques qui croissent en suspension, qui ont besoin de s'attacher à la surface d'un support solide pour croître et se diviser. Les cellules cancéreuses sont devenues capables de croître en suspension dans un milieu semi-solide, comme l'agar mou ;

- *L'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance :* Contrairement aux cellules normales, les cellules transformées sont capables de pousser dans un milieu sans sérum (le sérum fœtal de veau, généralement utilisé, apporte un grand nombre de facteurs de croissance protéiques ou peptidiques). Cette autosuffisance traduit le fait que ces cellules sont généralement capables de sécréter dans le milieu leurs propres facteurs de croissance (autocrine).

- *La croissance illimitée, c'est-à-dire l'immortalité:* Contrairement aux cellules normales qui sont programmées pour ne se diviser qu'un nombre limité de fois (50 divisions pour des fibroblastes de fœtus; moins de 50 divisions pour des fibroblastes d'adultes), les cellules transformées sont capables de se diviser **indéfiniment**.

Cette propriété fondamentale peut être dissociée des autres, notamment de la tumorigénicité, et exister seule dans des lignées «précancéreuses».

- *La tumorigénicité* après injection dans un organisme immuno-tolérant

Tous les stigmates phénotypiques ci-dessus énumérés, notamment la tumorigénicité, ne sont pas obligatoirement présents simultanément dans toutes les cellules cancéreuses.

Leur possible dissociation est en faveur de l'intervention d'une multiplicité de facteurs, ce que tendent à confirmer les expériences d'oncogènes *in vitro*. D'ores et déjà, on retiendra la notion d'une dissociation possible entre l'**immortalisation** et la **transformation** proprement dite. Ces principes sont récapitulés dans le tableau 1 [8]

Tableau 01 : Stéréotype phénotypique des cancers

Critère biologique	Cellule normale	Cellule cancéreuse
Signaux de croissance	Dépendance	Indépendance (autosuffisance)
Signaux d'arrêt de croissance	Sensibilité	Insensibilité
Apo ptose	Sensibilité	Résistance
Potentiel répliatif	Limité à un certain nombre de mitoses	Illimité
Angiogenèse	Contrôlée	Permanente
Pouvoir invasif et métastatique	Absent	Présent

Les anomalies biochimiques de la cellule cancéreuse :

De nombreuses anomalies ont été décrites, touchant par exemple le métabolisme (prédominance de la glycolyse anaérobie malgré la présence d'oxygène, ou effet Warburg), et les protéines des systèmes membranaires (défaut de fibronectine, anomalie du cytosquelette, anomalies d'expression des antigènes de surface, défaut d'adhésion). Maintenant que les gènes impliqués dans les processus oncogénétiques sont de mieux en mieux connus, leurs produits spécifiques peuvent être étudiés. [8]

Toute fois, notre compréhension actuelle du cancer passe désormais par une vision moléculaire des étapes de la transformation maligne, étapes qui sont rythmées par des événements dans lesquels interviennent, au premier chef, les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et d'autres gènes impliqués dans l'apoptose, la réparation des lésions de l'ADN, l'angiogenèse...

C'est ce qui a conduit Hanahan et Weinberg à proposer une liste des propriétés acquises par les cellules des tumeurs humaines (Tableau1). [7]

Les gènes de cancer et leur pathologie [8] :

Les cancers résultent de mutations survenant dans un certain nombre de gènes exerçant normalement des fonctions essentielles très étroitement régulées pour la vie et la mort de la cellule. On les appelle «**gène de cancer**» parce que dans leur version mutée ils pervertissent de manière irréversible des fonctions cellulaires primordiales (Tableau 2). [8]

Dans certains cas, les mutations rendent le gène affecté hyperactif. Ces mutations ont un effet dominant; il suffit qu'une copie du gène soit mutée pour que le trouble apparaisse.

Le gène mutant est appelé **oncogène** ; le gène normal correspondant est alors appelé proto-oncogène. Pour d'autres gènes, le danger réside dans des mutations qui détruisent la fonction du gène. Ces mutations sont généralement récessives, les deux copies du gène doivent être perdues ou altérées pour que l'effet soit visible; le gène affecté est un **gène suppresseur de tumeur**. [9].

Oncogène :

Classiquement, un oncogène (du grec = onkos = tumeur) est une version altérée d'un gène (proto-oncogène) qui est normalement impliqué dans la prolifération ou la croissance cellulaire. Les oncogènes agissent d'une façon dominante (Une seule copie est nécessaire à leur activité) et affranchissent la cellule de contraintes qui régulent sa prolifération. De concert avec d'autres événements (inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs), ils participent à la transformation maligne des cellules. La contribution des oncogènes à la transformation maligne d'une cellule est un gain de fonction par rapport aux proto-oncogènes dont ils sont dérivés. Par extension de sens, tout gène dont l'expression dérégulée contribue à l'acquisition du phénotype malin peut être considéré comme un oncogène.

Il apparaît clairement que les oncogènes, en devenant aptes à transformer des cellules, ont acquis une fonction nouvelle par rapport aux proto-oncogènes dont ils sont issus; ce qu'on appelle un «**gain de fonction**».

Cette caractéristique distingue les oncogènes de l'autre famille majeure des gènes du cancer, les gènes suppresseurs de tumeur (Initialement désignés anti-oncogènes) qui perdent leur fonction lorsque chacune des copies portées par chaque allèle est délitée ou inactivée.

En raison des circonstances de leur découverte, et aussi parce que les proto-oncogènes dont ils dérivent occupent des positions stratégiques dans les voies de signalisation

mitogéniques, les oncogènes ont d'abord été considérés comme des agents perturbateurs de la prolifération cellulaire, engageant la cellule vers une perte de contrôle de cette fonction. Par la suite, des observations nombreuses ont souligné le caractère trop restrictif de cette conception.

En conséquence, la définition des oncogènes doit être élargie: Un oncogène est un gène qui stimule, à différents niveaux, l'acquisition d'un phénotype malin par une cellule. Selon cette définition sont oncogènes :

- Des gènes qui exercent une pression positive sur la prolifération ;
- Des gènes qui protègent la cellule des mécanismes apoptotiques et assurant sa survie ;
- Des gènes qui, par leurs effets angiogéniques, concourent au développement d'une tumeur ;
- Des gènes qui facilitent la dissémination des cellules tumorales et l'apparition de métastases.

Toutes ces situations sont le fait d'altérations mutationnelles des proto-oncogènes mais aussi de tout événement qui induit une surexpression du gène normal en des lieux et des moments inappropriés.

Gènes suppresseurs de tumeurs :

Le concept de gènes suppresseurs de tumeurs (GST) est né en 1971 [10], mais la découverte du premier GST n'est survenue qu'en 1986-1987, plus de dix ans après la découverte des oncogènes.

Les anti-oncogènes ont été initialement décrits comme une classe de gènes pour lesquels la perte de l'expression normale est impliquée dans le développement d'une tumeur maligne [11]. Cette définition implique que les deux allèles d'un anti-oncogène soient mutés ou inactivés, contrairement aux oncogènes pour lesquels il y a gain de fonction liée à la mutation d'un allèle dominant au niveau cellulaire.

Les anti-oncogènes peuvent, le plus souvent (mais pas toujours), subir aussi bien des mutations germinales que des mutations somatiques et être alors impliqués dans les prédispositions héréditaires aux cancers. La prédisposition héréditaire au cancer est le plus souvent dominante.

Avec la notion d'anti-oncogènes est apparu le concept de gènes suppresseurs de tumeurs (GST). Si l'absence d'expression d'un gène est impliquée dans l'oncogenèse, c'est que, à l'inverse, l'expression physiologique de ce gène a des propriétés suppressives de tumeur dans les cellules normales. Ainsi, les anti-oncogènes ont été appelés gènes suppresseurs de tumeurs, puis le terme GST, par habitude de langage, a prévalu chez les scientifiques [12]

Tableau 02 : Stéréo-génotype moléculaire du cancer [8]

Catégorie de gène de cancer	Allèle normal	Allèle muté
Oncogènes	Activés selon les besoins de la cellule	Activé en permanence (GOF dominant)
Gènes suppresseurs de tumeurs	Vigilance active en permanence	Inactivé (LOF récessif)
Gènes de stabilité Génomique	Vigilance active en permanence	Inactivé (LOF récessif)

II-2- Leucémies :

Le terme de leucémie a été proposé par le médecin allemand Rudolf Virchow en 1847, [13] pour désigner des maladies où le sang était constitué en grande partie d'une purée blanche (du grec leukos, blanc et haima, sang) lui donnant un aspect laiteux. Les leucémies sont caractérisées par une prolifération anarchique des précurseurs des cellules sanguines qui conduit à une perturbation de l'hématopoïèse, c'est-à-dire le mécanisme de production des cellules du sang qui se déroule dans la moelle osseuse. Les leucémies sont classées en fonction du stade et du niveau de différenciation de ces précurseurs. Les leucémies lymphoïdes concernent les cellules lymphocytaires alors que les leucémies myéloïdes concernent les cellules granuleuses. Les leucémies sont qualifiées d'aiguës si la prolifération des cellules leucémiques est rapide. Cette rapidité peut être liée à un stade de différenciation précoce. Par contre, si la prolifération des cellules leucémiques est lente, la leucémie est qualifiée de chronique. Cette différence avec la leucémie aiguë peut s'expliquer si le stade de différenciation des cellules tumorales est avancé. Ainsi, quatre types de leucémies peuvent être distingués [14] :

- La leucémie myéloïde chronique (LMC)
- La leucémie lymphoïde chronique (LLC)
- La leucémie aiguë myéloïde (LAM)
- La leucémie aiguë lymphoïde (LAL)

II-2-1- La leucémie myéloïde chronique (LMC) :

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif chronique traduisant une prolifération clonale de la cellule souche hématopoïétique primitive et caractérisé par une prolifération prédominante de la lignée granuleuse, par la présence d'une anomalie chromosomique quasi spécifique, le chromosome Philadelphie (Ph) ou de son équivalent moléculaire, le réarrangement *bcr-abl*, et par une évolution clinique en trois phases : Chronique, accélérée et de transformation aigue (TA). Sa fréquence représente 15% de toutes les leucémies de l'adulte, inférieure à celle des leucémies aiguës. L'âge médian au diagnostic est 50 ans [15].

La présence du chromosome particulier dénommé : « chromosome de Philadelphie » résulte d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22 (Figure 06). Le point de cassure sur le chromosome 9 se situe en 9q34, au niveau de l'oncogène *abl*. Le point de cassure sur le chromosome 22 se situe en 22q11, à un niveau variable sur une région dite *bcr* (breakpoint cluster region).

Ce type de leucémie peut se transformer après quelques années en leucémie myéloïde aiguë. La présence du chromosome de Philadelphie n'est pas un critère exclusif de la leucémie myéloïde chronique et peut être détectée dans d'autres types de leucémies comme par exemple la leucémie lymphoïde aiguë [16].

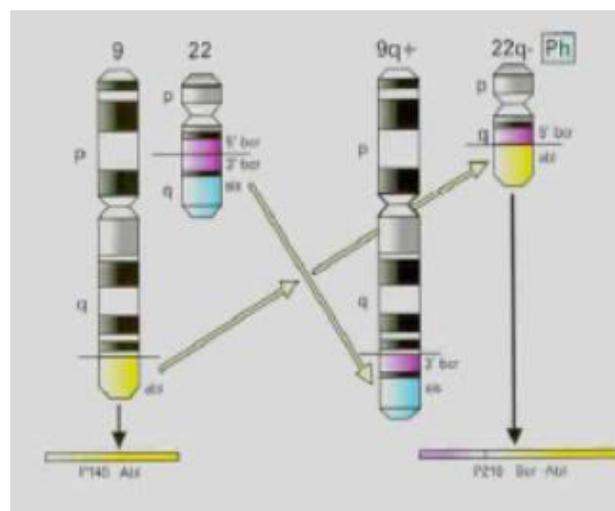


Figure 06 : Translocation réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 qui aboutit à la formation du chromosome Philadelphie. [17]

Traitement :

Chimiothérapie classique :

- L'hydroxyurée (Hydréa[®]), inhibiteur de la synthèse de l'ADN, est le plus souvent prescrite, *per os*, à dose adaptée à la leucocytose.

- Le busulfan (Myleran[®]), agent alkylant est de maniement plus délicat et son efficacité est retardée de 2 à 3 semaines. Ses effets secondaires sont surtout l'insuffisance gonadique et le risque de fibrose pulmonaire pour le traitement de longue durée.

Dans les deux cas il est nécessaire :

- D'associer au début du traitement une prophylaxe de l'hyperuricémie par allopurinol, hyperdiurèse et alcalinisation des urines ;
- De surveiller régulièrement l'hémogramme pour adapter la posologie.

Interféron α recombinant :

Il permet la disparition des signes cliniques et la normalisation de la leucocytose ; il peut réduire voir éradiquer les cellules Ph⁺ et prolonger significativement la survie, devenant le traitement initial de choix chez la plupart des patients. L'adjonction d'hydroxyurée au début du traitement par IFN permet de diminuer la dose d'IFN et d'en améliorer la tolérance.

Imatinib (Glivec[®]) :

C'est un inhibiteur compétitif sélectif puissant de l'activité tyrosine kinase de la protéine bcr-abl. [15].

Allogreffe de cellules souches :

Elle est la seule à pouvoir éradiquer de façon durable le clone leucémique. Cependant, elle n'est accessible qu'à 30% des patients (Les facteurs limitatifs étant l'âge, la compatibilité HLA, la tolérance à la procédure, l'ancienneté du diagnostic). [15].

II-2-2- La leucémie lymphoïde chronique (LLC) :

La leucémie lymphoïde chronique est la forme la plus courante de leucémie chez les adultes dans les pays occidentaux. LLC est assez rare chez les individus de moins de 45 ans.

En fait, plus de 95 pour cent des patients atteints de LLC sont âgés de plus de 50 ans. La LLC est définie par l'augmentation permanente du nombre de lymphocytes du sang (au-

dessus de $4 \times 10^9/l$). Elle concerne le plus souvent des lymphocytes B. Elle est caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation, dans le sang, la moelle, les ganglions et la rate, de cellules lymphocytaires B exprimant le déterminant antigénique CD5 et qui sont bloquées en phase G0 du cycle cellulaire. [15].

Traitement :

Monochimiothérapie :

- Le chlorambucil (Chloraminophène[®]) reste le médicament le plus utilisé dans les LLC, de façon continue ou intermittente, seul ou associé aux corticoïdes.

- Le cyclophosphamide (Endoxan[®]), est aussi efficace que le Chloraminophène, mais moins fréquemment utilisé en raison d'une toxicité supérieure [15].

Polychimiothérapie :

- Catmini-CHOP (cyclophosphamide, oncovin,doxorubicine, prednisone), le CAP (cyclophosphamide,docorubicine,prednisone).

- Analogues des purines :

- La fludarabine.
- La pentostatine (2-déoxycycoformycine)
- La 2-chlorodéoxyadénosine (2-CdA)

Anticorps monoclonaux :

Le rituximab (Mabthera[®]) est Ac chimérique anti CD20. Il n'est efficace, dans la LLC,qu'associé à d'autres drogues : rituximab- fludarabine ou rituximab- fludarabine- cyclophosphamide. [15].

Grefe de cellules souches :

Ses indications sont rares.

II-2-3- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) :

On regroupe habituellement sous ce terme les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM γ), promyélocyaires (LAPM), myélomonocytaires (LAMM), monoblastiques (LAMO), les érythroleucémies (EL) et, plus récemment, les leucémies aiguës à mégacaryoblastes (LAMega). [18]

Les LAM sont des affections rares, atteignant tous les âges et également les deux sexes. On observe un pic de fréquence au-dessous de 5 ans chez l'enfant et une augmentation régulière de celle-ci avec l'âge chez l'adulte.

On connaît des facteurs favorisants :

- Des facteurs génétiques : Anomalies chromosomiques constitutionnelles (mongolisme, syndrome de Bloom, maladie de Fanconi), déficits immunitaires constitutionnels ;
- Les irradiations atomiques, accidentelles, thérapeutiques ;
- Les toxiques professionnels : benzène et dérivés (Imprimerie, caoutchouc, pétrochimie, industrie de la chaussure, peintures), insecticides et herbicides.
- Certaines hémopathies non malignes (aplasie médullaire, maladie de Marchiafava-Micheli), qui comportent un risque accru d'évolution en LAM. [15].

La symptomatologie clinique est très polymorphe, parfois très riche, parfois très réduite. Elle est représentée par des signes d'insuffisance médullaire traduisant le retentissement de la prolifération tumorale sur les lignées myéloïdes normales et par des manifestations tumorales traduisant l'infiltration leucémique des organes hématopoïétiques et, éventuellement, d'autres organes.

Traitement : **Traitement d'induction** :

Chez les adultes âgés de 18 à 60 ans, l'approche thérapeutique comporte plusieurs phases. La première phase est une chimiothérapie d'induction dont l'objectif principal est l'obtention de la rémission complète qui est définie par un taux de blastes médullaires inférieur à 5 % dans une moelle de richesse normale, avec la récupération hématologique sanguine (plaquettes supérieures à 100 G/L et polynucléaires neutrophiles supérieurs à 1 G/L). Le standard de la chimiothérapie correspond à l'administration de 7 jours d'aracytine et 3 jours d'anthracyclines. Selon les schémas, les doses d'aracytine peuvent varier, ainsi que le type d'anthracycline. Certains protocoles comportent l'adjonction d'étoposide. La chimiothérapie d'induction permet d'obtenir des taux de rémission complète de 80 % à 90 % chez les sujets jeunes. [19]

Options thérapeutiques en post-induction

Une fois la rémission complète obtenue, un traitement complémentaire dit de consolidation est nécessaire afin de poursuivre la réduction de la masse tumorale.

Une ou deux cures de chimiothérapie de consolidation comportant de l'aracytine et des anthracyclines peuvent être réalisées. Les traitements sont conditionnés par les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires de la LAM [19].

II-2-4- La leucémie aiguë lymphoïde (LAL) :

Les leucémies aiguës lymphoïdes ou lymphoblastiques (LAL) sont des hémopathies malignes aiguës correspondant à une prolifération monoclonale, à point de départ médullaire, de lymphoblastes, cellules lymphoïdes immatures, s'accompagnant constamment d'une insuffisance médullaire.

Particulièrement fréquentes chez l'enfant entre 2 et 10 ans, les LAL représentent la maladie maligne la plus rencontrée en pédiatrie.

Un deuxième pic de fréquence se situe chez l'adulte âgé, autour de 70 ans.

Chez l'enfant, des facteurs génétiques sont reconnus comme favorisant: Anomalies chromosomiques constitutionnelles (mongolisme, syndrome de Bloom), déficits immunitaires congénitaux (ataxie-télangiectasie, syndrome de Wiskott-Aldrich). Elles peuvent aussi succéder à un épisode d'aplasie médullaire transitoire, réalisant le tableau de l'«aplasie faussement curable de l'enfant». [15]

Traitement : Traitement symptomatique :

Il consiste en :

- Transfusions de culots globulaires phénotypés si 'Hb est inférieure à 8 g/dl ;
- Transfusions de culots plaquettaires si la thrombopénie est profonde ou s'il existe un syndrome hémorragique ;
- Correction d'une CIVD ;
- Prophylaxie anti-infectieuse avec isolement en chambre propre, décontamination intestinale par une antibiothérapie non absorbable ;
- Antibiothérapie à large spectre puis adaptée aux anti-biogrammes, associée ou non aux antifongiques pour lutter contre les infections ou pour fièvre isolée non documentée ;

- Prévention et traitement des troubles métaboliques, en particulier rénaux dans les formes hyperleucocytaires lors du début du traitement cytoréducteur, par hyperdiurèse, alcalinisation des urines, allopurinol. [15].

Traitement : Un traitement curatif est proposé à tous les sujets âgés de moins de 60 ans. Il repose sur une polychimiothérapie administrée lors de la cure d'induction. Cette induction est suivie d'une consolidation, puis d'une intensification et/ou d'un traitement d'entretien. La rémission complète à l'issue de l'induction s'évalue de la même façon que dans les LAM.

Les études, d'abord pédiatriques, puis chez les adultes, ont permis d'établir la valeur pronostique de la réponse précoce au traitement (Cortico - et chimio-sensibilité). Cette approche permet une adaptation du traitement en cas de réponse insuffisante.

Une meilleure utilisation des agents anti leucémiques et surtout l'intensification des traitements inspirée des traitements pédiatriques ont permis d'obtenir des taux de rémission complète supérieurs à 80 %, mais surtout de diminuer l'incidence des rechutes. La survie globale des patients reste cependant inférieure à 50 %. Les mécanismes d'action des agents cytotoxiques actuellement utilisés dans le traitement des LAL de l'adulte figurent dans le **tableau 03**.

Tableau 03 : Principaux agents anticancéreux utilisés dans le traitement des LAL de l'adulte et leur mécanisme d'action. [19]

Agent cytotoxique	Mécanisme d'action
Glucocorticoïdes: Prednisone, dexaméthasone	Trans-régulation de l'expression des gènes par fixation sur le promoteur du complexe glucocorticoïde/glucaocorticoïde récepteur
Anthracyclines : Daunorubicine, doxorubicine, idarubicine	Liaison à l'ADN par intercalation entre les brins de la double hélice entraînant un blocage de l'ADN polymérase et la formation d'un complexe avec la topo-isomérase II
Méthotrexate	Inhibition de la dihydrofolate réductase et de la thymidine synthétase entraînant un défaut de synthèse de thymidine
Aracytine	Inhibition compétitive de l'ADN polymérase par incorporation dans l'ADN de l'Arac, analogue de base nucléotidique
Alkylants : Cyclophosphamide	Altération de la structure et de la fonction de l'ADN par fixation sur le double brin ou fragmentation
Asparaginase	Inhibition de la synthèse protéique par hydrolyse et déplétion intracellulaire de l'asparagine et de la glutamine
Vincristine, vindésine	Inhibition de la mitose par fixation sur les tubulines du fuseau mitotique
Épipodophyllotoxines : Etoposide	Inhibition de la mitose, inhibition de la topo-isomérase II
Thiopurines : 6-mercaptopurine	Diminution de la synthèse des purines

II- 3- Mort cellulaire :

Le terme « mort cellulaire » désigne l'ensemble des événements conduisant à la destruction de la cellule. La mort cellulaire est une partie essentielle du développement normal et continue à l'âge adulte. Chaque jour, des milliards de cellules meurent d'une mort altruiste afin d'assurer la fonctionnalité de l'organisme entier. Ainsi, nous gardons la même taille que parce que la division cellulaire équilibre exactement la mort cellulaire.

Au cours du développement, la mort cellulaire aide à sculpter des organes ou à séparer les doigts et les orteils. Elle élimine également les structures qui servaient jadis une fonction, mais ne sont plus nécessaires, comme la queue d'un têtard pendant la métamorphose des amphibiens. La plupart des neurones meurent au cours du développement avant d'avoir une chance de fonctionner dans le système nerveux. La mort cellulaire élimine également les lymphocytes les plus nouvellement formés, en particulier ceux qui sont inutiles ou dangereux, en ciblant les auto-antigènes. Les Neutrophiles, par exemple, sont produits en continu dans la moelle osseuse, mais la grande majorité meurt en quelques jours. Ce cycle apparemment futile de la prolifération cellulaire et la mort cellulaire sert à maintenir un approvisionnement de cellules qui peuvent être facilement mobilisables en cas de besoin [20]

Historiquement, les trois types de mort cellulaire ont été distingués des cellules de mammifères par des critères morphologiques.

L'apoptose, encore appelée mort cellulaire de type I, est définie par des changements caractéristiques de la morphologie nucléaire, y compris la condensation de la chromatine et la fragmentation, le retrait global de la cellule, un bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation de corps apoptotiques qui contiennent du matériel nucléaire ou cytoplasmique.

La mort cellulaire par autophagie, également connu sous le nom de type II mort cellulaire, se caractérise par une accumulation massive de la double membrane contenant des vacuoles, appelées autophagosomes qui fusionnent ensuite avec vacuoles lysosome.

La mort des cellules par Nécrose, mieux connu sous le nom de type III, est souvent défini de manière négative comme la mort dépourvue des caractéristiques du type processus I et II [21].

II-3-1- Apoptose :

Le mot apoptose provient d'une locution grecque signifiant "chute des feuilles" et était déjà utilisée par Hippocrate de Kos (460-377 av. J.C.) pour décrire la décomposition post-mortem des corps ("chute des os"). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui met en jeu de nombreux acteurs protéiques pro et anti-apoptotiques.

II-3-1-1- Phénotype apoptotique :

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire.

Des modifications morphologiques et une fragmentation de l'ADN caractéristiques :

Une cellule mourant par apoptose présente des modifications morphologiques caractéristiques qui commencent par une condensation du cytoplasme et de la chromatine nucléaire. La membrane plasmique bourgeonne transitoirement, puis la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui sont reconnus et ingérés par les cellules environnantes. Ces modifications morphologiques s'accompagnent d'une fragmentation de l'ADN qui, dans sa forme la plus typique, est internucléosomale, générant des fragments de 180 à 200 paires de bases. Dans un gel d'agarose, ces fragments ont un aspect caractéristique en échelle. Toutes les cellules ne sont pas capables de fragmenter l'ADN de cette façon, certaines se limitant à des fragments de 50, voire 300 kbp (Ces fragments sont détectés par électrophorèse en champ pulsé).

Mécanismes moléculaires des changements nucléaires:

Les molécules responsables de modifications nucléaires sont en partie connues. La fragmentation de la chromatine est attribuée à la migration nucléaire d'une flavoprotéine mitochondriale, Aif (apoptosis inducing factor), et à la protéine Acinus qui est active lorsqu'elle est clivée par la caspase 3. La fragmentation de l'ADN est attribuée à la migration nucléaire de l'endonucléase G, initialement mitochondriale, et à la nucléase Cad (caspase activated DNase, aussi connue chez l'homme sous le nom de Dff40) qui est libérée de son inhibiteur (Icad/Dff45) lorsqu'il est clivé par la caspase 3. D'autres endonucléases, par exemple la L-DNase II issue de la maturation de la protéine Lei (leucocyte elastase inhibitor), peuvent intervenir dans cette fragmentation.

Modifications biochimiques de la membrane plasmique :

La membrane cellulaire garde sa cohésion tout au long du processus d'apoptose mais elle bourgeonne transitoirement (notamment sous l'influence du clivage de la kinase Rock-1 par les caspases) et sa composition biochimique change. Le plus caractéristique de ces changements biochimiques est l'externalisation de la phosphatidylsérine, un phospholipide anionique initialement situé sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Cette externalisation implique l'inhibition de l'aminophospholipide translocase et l'activation d'une scramblase tandis que l'implication des caspases (via le clivage de protéines du cytosquelette) est plus controversée. La sphingomyéline se déplace en sens opposé et devient accessible aux sphingomyélinases qui la dégradent. Enfin, la nature des hydrates de carbone exposés à la surface de la cellule se modifie.

Phagocytose des corps apoptotiques :

Cette phagocytose est le fait de cellules professionnelles, les macrophages, ou de cellules amateurs comme les hépatocytes, les cellules dendritiques ou les fibroblastes. Elle comporte une étape de reconnaissance puis une étape d'ingestion. Les cellules vivantes émettent des signaux de répulsion vis-à-vis des macrophages avec lesquels elles interagissent par leurs protéines membranaires CD31 respectives. Cette interaction est interrompue au cours de l'apoptose. La phosphatidylsérine, les glycanes et les autres modifications biochimiques de la membrane cellulaire sont alors autant de signaux «mange-moi!» adressés à la cellule phagocytaire qui reconnaît la cellule apoptotique par l'intermédiaire d'un complexe moléculaire faisant intervenir notamment les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, le récepteur de la phosphatidylsérine, les molécules CD36 et CD14 ainsi que le récepteur à tyrosine kinase «Mer».

Protéolyse intracellulaire :

Des protéases, principalement les caspases, induisent le clivage limité de protéines intracellulaire, cytoplasmiques ou nucléaires. Il s'agit de protéines impliquées dans les fonctions aussi variables que la régulation du cycle cellulaire, la formation du cytosquelette (fodrine, actine), la signalisation intracellulaire (protéine kinase C δ , MEKk), la réparation de l'ADN [poly (ADP-ribose) polymérase ou Parp] ou l'apoptose (Acinus, Icad, Bcl-2).

Elle permet tantôt l'inactivation (Parp) de la protéine cible. On estime entre 100 et 200 le nombre de protéines clivées au cours de l'apoptose.

II-3-1-2- Mécanisme de l'apoptose :

Le processus apoptotique peut être subdivisé en trois étapes: Stimulation, prise de décision et exécution. Au cours de la phase de stimulation, la cellule reçoit un signal pro-apoptotique, qui déclenche une voie de signalisation particulière à chaque stimulus. Ensuite, la cellule intègre le signal reçu et le convertit ou non en une réponse effectrice. Lorsque la décision de s'engager dans la voie de mort cellulaire est prise, la cellule entre dans la phase de dégradation et exécute la sentence en activant des enzymes cataboliques. On peut également classer le processus apoptotique dans les cellules de mammifères en fonction des signaux empruntée. On parle alors soit de *voie extrinsèque*, dont le prototype est la mort induite par trimérisation du récepteur Fas/CD95 au niveau de la membrane plasmique, soit de *voie intrinsèque*, induite par divers agents qui aboutissent tous à une perturbation de la structure et de la fonction mitochondriales.

Quelle que soit la classification adoptée, il apparaît clairement que deux acteurs principaux orchestrent les modifications morphologiques et biochimiques qui accompagnent le processus apoptotique : D'un côté des protéases à cystéines, appelées caspases et, l'autre, les mitochondries dont la perméabilité membranaire est altérée pendant l'apoptose, ce qui entraîne le relargage de protéines apoptogènes depuis l'espace inter-membranaire. [22]

II-3-1-2- 1- Voie extrinsèque :

Cette voie met en jeu des interactions entre des ligands et leurs récepteurs de surface. Ces récepteurs de la superfamille du TNF (*tumor necrosis factor*) également appelés récepteur de mort, sont des récepteurs membranaires qui transmettent un signal de mort après la liaison avec leur ligand. Ils possèdent dans leur portion intracytoplasmique C-terminale, une région conservée appelée domaine de mort (death domain, DD). On distingue actuellement sept récepteurs de mort : Tnf-R1 (p55/CD120a), Fas (Apo-1/CD95), p75NGF, les deux récepteurs de Trail, DR4 (Trail-R1/Apo-2) et DR5 (TrailR2/Killer/Trick2) ainsi que DR3 et DR6 [23].

Ces récepteurs activés vont être à l'origine d'un signal intracellulaire responsable du processus apoptotique. La voie extrinsèque nécessite la formation d'un complexe protéique appelé « DISC » (death inducing silencing complex) au niveau du domaine intracellulaire du récepteur membranaire. Ce complexe est composé de protéines adaptatrices qui se lient au domaine de mort (DD) du récepteur. Pour le récepteur du TNF α , il s'agit de TRADD (TNF receptor-associated death domain) et pour le récepteur du ligand Fas, il s'agit de la protéine FADD (Fas-associated death domain). Ces complexes vont permettre le recrutement de la

pro-caspase-8 et son activation. La caspase-8 active va permettre l'activation de la pro-caspase-3 par clivage, qui permet de passer à la phase effectrice de l'apoptose [24-26].

La voie extrinsèque est fréquemment déclenchée par le système immunitaire à cause de la production de cytokines comme le TNF α ou FasL.

Le TNF (pour Tumor Necrosis Factor ou facteur nécrosant des tumeurs) fut le premier ligand de mort découvert au sein de cette famille. Il se lie à deux récepteurs, le TNFR1 et le TNFR2, mais seul le TNFR1 possède un DD. Toutefois, la liaison du TNF sur le TNFR1 n'induit pas nécessairement la mort de la cellule, la plupart du temps au contraire, elle induit des voies de signalisation en faveur de la survie cellulaire. Le TNFR1 a ainsi été impliqué dans la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que la production de cytokines proinflammatoires, *via* l'expression de gènes dépendant notamment du facteur de transcription NF-kB.

Ainsi, expérimentalement il est souvent nécessaire, d'associer au TNF un inhibiteur de la transcription ou de la traduction pour induire la mort, contrecarrée par les voies de survie également activées. Certains des gènes dont l'expression est activée par NF-kB sont en effet anti-apoptotiques.[27]

II-3-1-2- 1- Voie intrinsèque :

La voie intrinsèque de l'apoptose fait intervenir les protéases caspases, les protéines de la famille Bcl-2 et la molécule adaptatrice Apaf-1. Elle s'organise autour de la mitochondrie.

Quand il s'agit d'une réponse à l'induction de dommages à l'ADN, l'activation de cette voie met souvent en jeu la protéine p53, un facteur de transcription, fréquemment muté, délété ou inactivé dans les cellules cancéreuses. La voie intrinsèque implique une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, qui permet le relargage d'une série de molécules solubles qui, lorsqu'elles quittent cet espace, induisent la mort de la cellule. Cette perméabilisation est un évènement très finement régulé par les membres de la famille d'une protéine nommée Bcl-2 (pour B-cell-lymphoma-2).

La perméabilisation est fréquemment précédée, accompagnée ou suivie d'une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$).

Le facteur inducteur de l'apoptose « **AIF** », la protéine inhibitrice des protéines activatrices de l'apoptose, nommée selon leurs fondateurs **Diablo** [28] ou Smac [29] (Smac/Diablo, pour Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding

protein with Low pI) et le **cytochrome C** sont parmi les principaux facteurs impliqués dans cette voie intrinsèque. Une fois libéré par la mitochondrie, le cytochrome C s'associe au facteur d'activation des protéases apoptotiques Apaf-1, qui s'unit à la procaspase 9 en présence d'ATP pour former l'apoptosome [30].

Dans ce complexe, la caspase 9 est activée et clive les protéases «effectrices» (caspases 3, 6 et 7) qui entraînent l'activation de la mort cellulaire par apoptose [31].

II-4- Les caspases :

C'est grâce au travail de génétique moléculaire effectué sur le nématode *Caenorhabditis elegans* depuis 1980 que les premiers gènes régulateurs de l'apoptose ont été mis en évidence [32].

En effet, au cours de son développement, cet invertébré est sujet à une MCP très stricte: Sur les 1090 cellules qu'il est amené à développer, 131 meurent par apoptose. La recherche de mutants, qui affectent la mort cellulaire chez *C. elegans*, a permis de distinguer deux groupes.

Dans le premier groupe, aucune des 131 cellules qui meurent normalement au cours de l'ontogenèse ne disparaît.

Dans le second groupe, les cellules qui normalement survivent au cours du développement, meurent. Par conséquent, l'animal meurt au cours de l'embryogenèse. L'analyse des mutations responsables de ces phénotypes révéla que seulement trois étaient affectés. Ces gènes furent appelés *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* (*cell death abnormal*). Les protéines Ced-3 et Ced-4 se sont révélés pro-apoptotiques, alors que la protéine Ced-9 est anti-apoptotique. Par la suite, les gènes homologues de *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* ont été clonés chez les mammifères et chez l'homme.

Ainsi, par exemple, la première protéine homologue de Ced-3 identifiée est-elle la protéase ICE (enzyme de conversion de l'interleukine 1 β), dans le premier rôle connu a été le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β . Les similarités qui existait entre Ced-3 et la protéase ICE (appelée par la suite caspase 1) étaient les premiers indices que le programme de mort cellulaire dépendait de clivages protéolytiques [33].

Rapidement, plus d'une dizaine de caspases homologues à Ced-3 ont été identifiées chez les mammifères et une classification s'est imposé [22].

Elles sont synthétisées sous forme de zymogènes, appelés pro-caspases, qui doivent être clivés au niveau de résidus aspartates pour générer l'enzyme active. Ce clivage élimine un prodomaine N-terminal et libère une sous-unité longue comportant la cystéine essentielle à

l'activité de l'enzyme (séquence QACXG) et une sous unité courte d'environ 10 KDa. Les sous-unités longues et courtes s'hétérodimérisent et l'enzyme active est un tétramère formé de deux sous-unités longues et deux sous-unités courtes.

On distingue trois groupes de caspases:

- Le premier regroupe des enzymes (caspase 1,4 et 5) qui sont plus impliquées dans la maturation de cytokines (IL-1,IL-18) que dans l'apoptose.

- Le second rassemble les caspases «effectrices» (caspase 3,6 et 7) qui clivent les protéines intracellulaires au cours de l'apoptose.

- Le troisième est celui des caspases «initiatrices» (caspase 8, 9 et 10) qui active la cascade protéolytique.

Ces dernières se caractérisent par un prodomaine très long (plus de 100 acides aminés) alors que celui des caspases effectrices comporte entre 10 et 40 acides aminés. Cela est dû au fait que le prodomaine des caspases initiatrices contient des motifs d'interaction protéine/protéine appelés DED (death effector domain : pro-caspase 8 et 10) ou CARD (caspase recruitment domain : procaspase 1, 2,4 et 9) leur permettant d'être recrutées par des molécules adaptatrices au niveau de complexes protéines-protéines dans lesquels elles s'auto-activent (Modèle dit «de proximité»).

Les caspases fonctionnent alors en cascade protéolytique (La caspase initiatrice active les caspases effectrices). Certaines caspases peuvent aussi être activées par une sérine protéase libérée dans la cellule cible d'un lymphocyte T cytotoxique, le granzyme B.

La spécificité des caspases pour leur substrat est déterminée par la nature des quatre résidus en situation C-terminale par rapport à l'aspartate du site de clivage, en particulier le résidu en position P4.

Par exemple, les caspases du premier groupe reconnaissent des séquences de type WEXD, celles du troisième groupe des séquences de type L/VEXD et les caspases 3 ou 7 des séquences de type DXXD.

L'activité des caspases peut être inhibée par des modifications post-traductionnelles (Phosphorylation, nitrosylation de la cystéine du site actif, myristoylation) ou par interaction avec certaines protéines de la famille Iap (inhibitor of apoptosis proteins) telles que Xiap, c-Iap 1 et c-Iap 2.

Ces protéines interagissent avec la procaspase 9 ou les caspases 3,7 et 9 actives. Elles pourraient induire leur ubiquitinylation et leur dégradation par le protéasome 26S (Figure 07) [23]

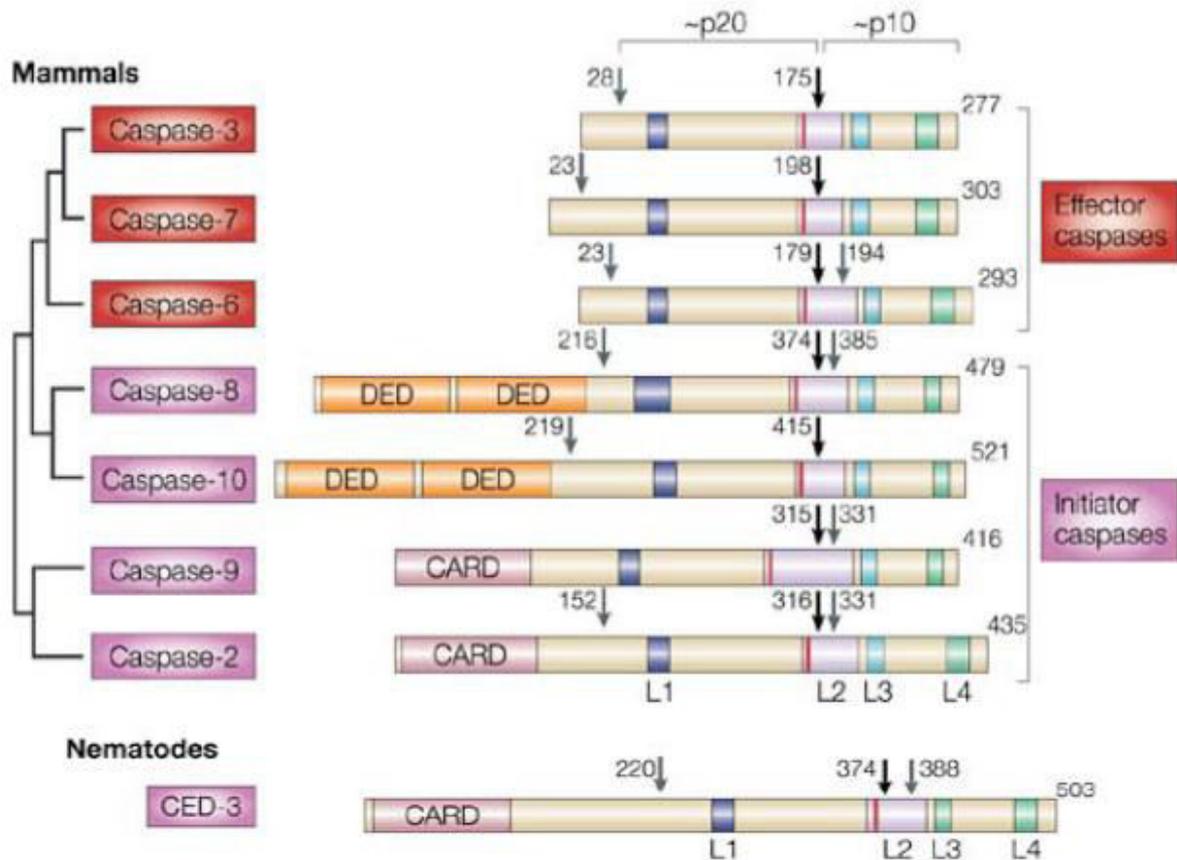


Figure 7 : Structure et classification des caspases de l'apoptose. Les caspases effectrices (du groupe III) (en rouge) possèdent un prodomaine court contrairement aux initiatrices (du groupe II) (en mauve). Les caspases initiatrices (du groupe I) possèdent deux domaines DED en tandem (caspases 8 et 10) ou un domaine CARD (caspases 2 et 9). Les flèches noires indiquent le premier site de clivage entre les domaines p10 et p20 et les flèches grisées constituent des sites additionnels de clivage. La cystéine catalytique est représentée par un trait rouge. CED3, la première caspase identifiée chez *C. Elegans* est la seule nécessaire pour l'apoptose. Elle contient un domaine CARD et joue le rôle à la fois de caspase initiatrice et effectrice [34]

II-5- Régulation de l'apoptose par la voie NF- κ B:

En 1986, un facteur nucléaire a été découvert dans les cellules B grâce à sa capacité à favoriser la transcription de la chaîne légère kappa (κ) des immunoglobulines [35]. Il a, dès lors, été nommé NF- κ B (Nuclear Factor- κ B).

L'implication du gène *NF- κ B* (Nuclear Factor- κ B) dans l'oncogenèse remonte à la découverte du v-onc-v-rel qui a été identifié pour la première fois comme l'agent causal de leucémies et de lymphomes particulièrement agressifs chez le poulet.

Le facteur de transcription NF- κ B est un élément clé dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative mais aussi dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire [36-38].

En réponse à différents stimuli, tels que des infections microbiennes et virales, ou encore des cytokines inflammatoires, une activité kinase IKK (I κ B kinase) catalyse la phosphorylation d'une protéine inhibitrice de la famille I κ B lié à NF- κ B. Il s'ensuit une ubiquitinylation, puis la dégradation de la protéine et la libération de NF- κ B qui peut être transloquée dans le noyau pour y stimuler des gènes cibles.

Ces dernières peuvent être regroupées en quatre catégories:

- Gènes immunorégulateurs et promouvant l'inflammation;
- Gènes anti-apoptotiques;
- Gènes régulant positivement le cycle cellulaire.
- Gènes exerçant une régulation négative de NF- κ B qui peut donc promouvoir une prolifération incontrôlée, limiter sinon supprimer l'apoptose et augmenter le potentiel angiogénique et métastatique d'une tumeur.

Parmi les gènes stimulant la prolifération, le gène de la cyclin D1 possède, dans son promoteur, un site de liaison κ B dont l'induction stimule, pendant la grossesse, la prolifération des cellules épithéliales de la glande mammaire.

Les gènes contrôlés par NF- κ B et intervenant dans l'apoptose sont des inhibiteurs de la voie du facteur pro-apoptotique TNF α . On trouve, parmi eux, des inhibiteurs de caspases de la famille cIap, la protéine c-Flip qui inhibe Flice, des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-X_L, A1/BFL1). Ainsi s'explique la capacité de NF- κ B à induire une résistance accrue aux agents anti-tumoraux ou aux radiations ionisantes qui induisent des lésions dans l'ADN. Similairement, des cellules qui ont subi des altérations de leur génome seront protégées par une expression inappropriée de NF- κ B qui s'oppose aux effets de p53. NF- κ B intervient aussi sur le caractère invasif des cellules tumorales en stimulant des chimiokines qui stimulent

la migration cellulaire. Il peut également stimuler des gènes de metalloprotéases qui possèdent des sites kB dans leurs promoteurs. Enfin, NF- κ B régule l'expression d'IL8 qui promeut l'angiogenèse et VEGF (Vascular endothelial growth factor) [39]

5-1- Les protéines NF- κ B/Rel :

La famille de protéines NF- κ B/Rel comporte cinq membres chez les mammifères (Figure 14): NF- κ B1/p50 (et son précurseur p105), NF- κ B2/p52 (et son précurseur p100), p65 (RelA), RelB et c-Rel. Le NF- κ B est composé d'homo- ou d'hétérodimères formés de combinaisons variées de ces cinq sous-unités, dont le plus commun et le plus étudié est le dimère p50/p65 [37,40]

Chaque membre de la famille NF- κ B/Rel contient, dans sa partie N-terminale, un domaine d'homologie Rel (RHD, Rel Homology Domain) de +/- 300 acides aminés. Ce domaine contient le signal de localisation nucléaire (NLS) et est responsable de la liaison à l'ADN (Figure15), de la dimérisation et de l'association avec I κ B. Dans un complexe du NF- κ B, chacune des protéines apporte une partie du site de liaison à l'ADN. La séquence consensus de liaison sur laquelle se lie NF- κ B est constituée de 10 paires de bases 5'-GGGRNNYYCC-3' (où R est une purine, Y une pyrimidine et N n'importe quelle base) qui peut varier légèrement. Ces deux éléments conduisent à la liaison préférentielle de certains dimères pour certains sites NF- κ B contenus dans les promoteurs de gènes et confèrent une spécificité de réponse différente d'un gène à l'autre [40-44].

Les protéines NF- κ B ont été groupées en deux classes. La première comprend NF- κ B1 et NF- κ B2 qui sont exprimés, respectivement, sous forme des précurseurs p105 et p100. Ils possèdent dans leur partie C-terminale des répétitions ankyrine servant de région d'interaction. Ce domaine est responsable de l'inhibition du dimère NF- κ B duquel ils font partie. Ces précurseurs appartiennent donc à la famille des inhibiteurs I κ Bs. Pour former les protéines actives p50 et p52, les répétitions ankyrine doivent être clivées. La seconde classe comprend p65 (RelA), RelB et c-Rel qui ne subissent pas de phénomène de maturation protéolytique. Seuls les membres de la classe 2 possèdent un domaine transactivateur (TAD, transcription activation domain) situé dans la région C-terminale. Ce domaine est responsable de leur capacité à activer la transcription des gènes cibles. De cette manière, les homodimères p50/p50 et p52/p52 sont transcriptionnellement inactifs et peuvent même être répresseurs en empêchant, par compétition, des dimères transcriptionnellement actifs (p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65, p65/c-Rel ou p52/RelB) de se lier à leur site kB sur l'ADN [40,43,44].

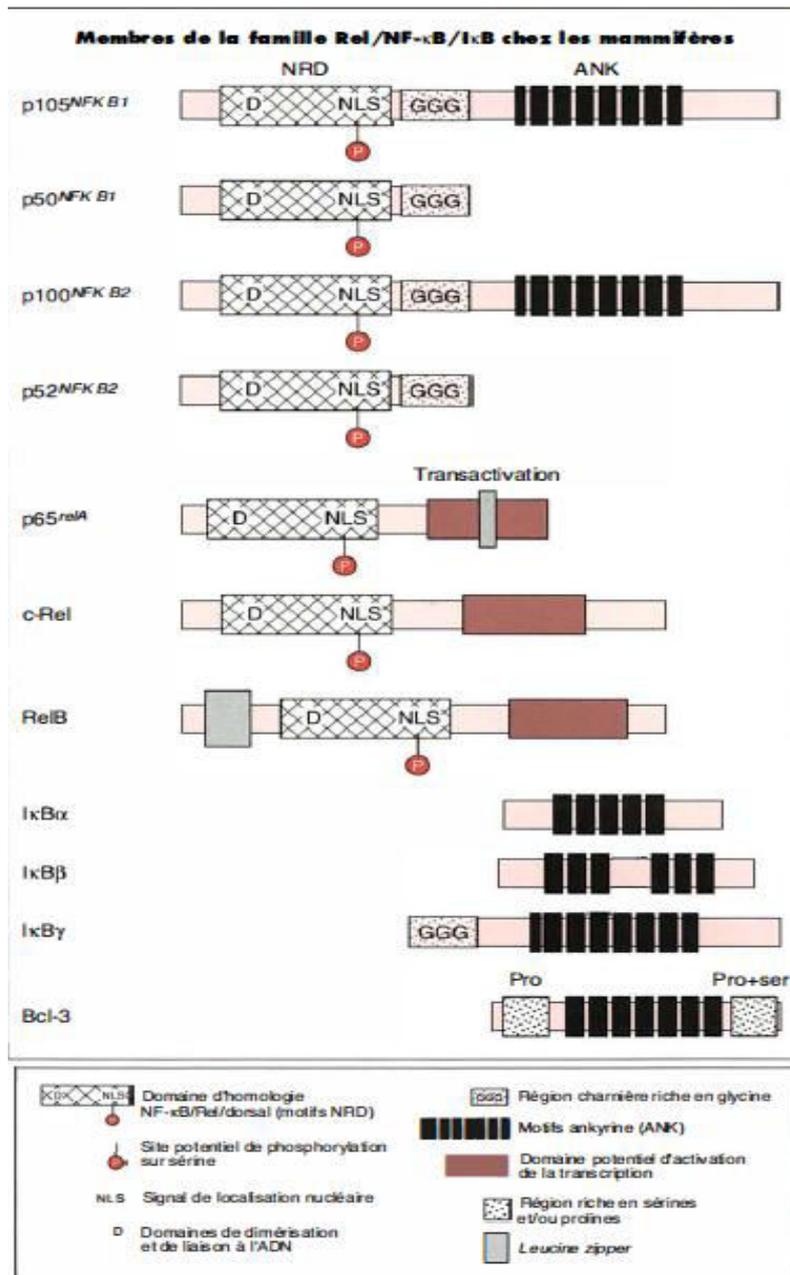


Figure 8 : Membres de la famille Rel/NF- κ B/I κ B chez les mammifères. Les protéines de la famille Rel/NF- κ B/I κ B identifiées chez les mammifères sont organisées en domaines. La majorité des gènes correspondants ont été clonés chez l'homme à l'exception de RelB, I κ B α et I κ B γ clonés uniquement chez la souris à l'heure actuelle. NRD : motif d'homologie de NF- κ B, Rel et du morphogène Dorsal de la drosophile ; NLS : nuclear localization signal, signal de localisation nucléaire ; D : domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN; ANK : motifs d'homologie avec l'ankyrine ; P: site potentiel de phosphorylation ; GGG : région charnière riche en glycine. Le domaine potentiel d'activation de la transcription est indiqué en rouge. (Activation du système de facteurs de transcription Rel/NF- κ B m/s)[45]

II-5-2- Les protéines I κ B :

Les protéines I κ B dont les plus communes sont I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ [40], sont des protéines régulatrices caractérisées par la présence de plusieurs régions ARD « Ankyrin Repeat » de 33 aa qui permettent les interactions protéines-protéines (Figure 09). D'une manière intéressante, p100 et p105 possèdent également ce domaine ARD qui peuvent fonctionner comme des protéines I κ Bs Like, et peuvent ainsi subir une dégradation protéolytique pour générer les protéines p52 et p50 respectivement. Un autre membre non usuel de la famille I κ B est le BcL3 qui, tout en restant spécifiquement lié aux homodimères p50 et p52, induit l'expression des gènes NF- κ B dépendant, ce qui contraste complètement avec la fonction inhibitrice des autres protéines I κ B.

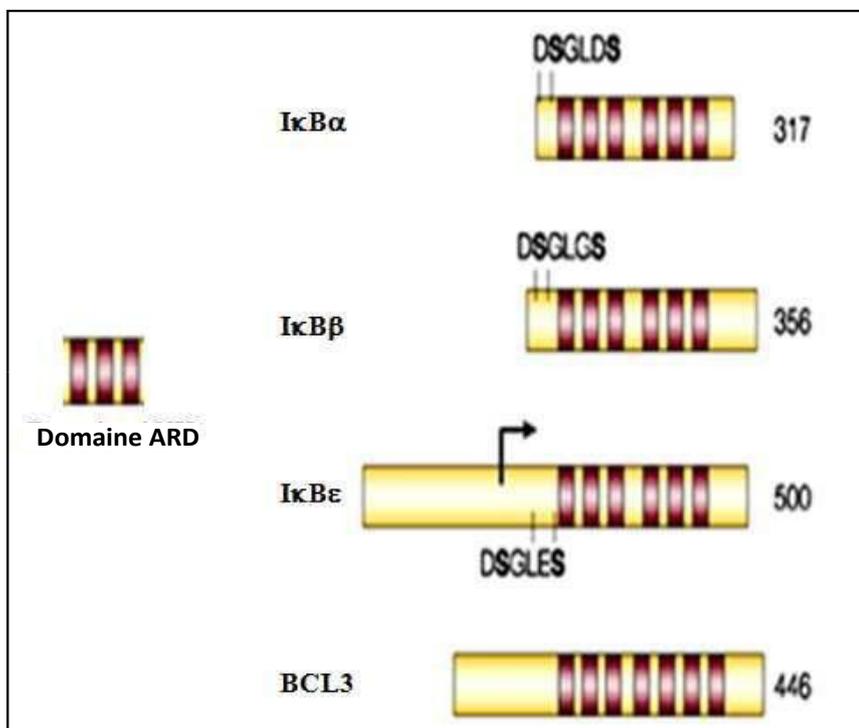


Figure 09: Famille des protéines I κ B [51]

Le schéma classique admet que la protéine I κ B α retient NF- κ B dans le cytoplasme en masquant leur signal de localisation nucléaire (NLS). Cependant des études récentes montrent que la localisation cytoplasmique du complexe NF- κ B inactif est en effet le résultat d'une navette continue entre le cytoplasme et le noyau [46,47]. Des études structurales et biochimiques ont montré que seulement un des deux NLS du dimère NF- κ B est masqué par I κ B α dans un complexe NF- κ B/I κ B α , ce qui permet au complexe de basculer quand même vers le noyau [48,49]. En même temps, le signal d'export nucléaire (NES) localisé dans la

région N-terminale de la protéine I κ B α permet d'expulser le complexe hors du noyau, et puisque le processus d'export est plus efficace que le processus d'import, la localisation nucléaire du complexe NF- κ B/I κ B α inactif ne peut être détectée que lorsque le NES est bloqué par la leptomycine B. De la même manière, le complexe NF- κ B/I κ B ϵ est capable de voyager activement entre le cytoplasme et le noyau [50].

Par contre le complexe NF- κ B/I κ B β est toujours retenu dans le cytoplasme car I κ B β masque les NLS des deux sous-unités NF- κ B simultanément [52].

L'implication biologique de la navette permanente du complexe entre le cytoplasme et le noyau n'a pas encore été déterminée. Il a été démontré que I κ B α régule l'activation transitoire du facteur de transcription NF- κ B, alors que I κ B β maintient une activation permanente [53]. En effet, I κ B α est rapidement dégradée en réponse à un stimulus, et grâce à la présence d'un élément de réponse NF- κ B sur le promoteur de son gène, elle sera rapidement synthétisée [54]. Les protéines I κ B α néo synthétisées peuvent ensuite rentrer dans le noyau grâce à leur séquence NLS intrinsèque, et déplacer NF- κ B de son site de liaison à l'ADN et ainsi le transporter vers le cytoplasme. Contrairement à I κ B α , I κ B β est moins sensible aux signaux de dégradation. En effet il a été rapporté qu'une interaction sélective entre κ B-Ras endogène et I κ B β permet l'inhibition de la dégradation de I κ B β pendant l'activation de NF- κ B [55]. Par ailleurs, ne possédant pas de NLS endogène et n'étant pas inductible par NF- κ B, I κ B β néo-synthétisée est incapable de déplacer NF- κ B de son promoteur ou de le faire sortir du noyau, d'où une activation prolongée de ce facteur de transcription.

Pour la plupart des stimuli, excepté les rayons UV et H₂O₂, la dégradation d'I κ B est une étape essentielle pour la libération de NF- κ B et par conséquent son activation [56]. Une étape cruciale dans ce processus est la phosphorylation de la protéine I κ B sur les sérines N-terminales (Ser32 et Ser36 pour I κ B α), médiée par le signalosome. Une fois phosphorylée, I κ B α est ensuite ubiquitynilée sur les Lys21 et Lys22 par la β -TRCP « β -transducing repeat-containing protein », puis dégradée via le protéasome.

II-5-3- Mécanismes d'activation du NF- κ B :

Trois voies distinctes, mettant en jeu différentes kinases, conduisent à l'activation de NF- κ B.

La première voie, dite «**classique**», est activée par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α . Elle conduit au recrutement de différentes protéines adaptatrices dont TRADD «TNF receptor associated death protein», TRAF2 «TNF receptor associated factor 2» et RIP «receptor interacting protein» au niveau de la membrane plasmique.

La formation de ce complexe est suivie du recrutement et de l'activation du signalosome, complet constitué essentiellement des kinases IKK.

Ce complexe va permettre la phosphorylation de I κ B α liée au complexe NF- κ B1 (p50/p65), sur les Ser32 et 36 et par conséquent son ubiquitinylation et sa dégradation via le protéasome, le facteur de transcription p60/p65 ainsi libre est ensuite transloqué dans le noyau où il va pouvoir exercer son activité de transactivation de l'expression des gènes NF- κ B dépendants.

La seconde voie, dite «**alternative**», est NIK et IKK- α dépendante. Elle est activée par des ligands tels que la lymphotoxine B, le CD40 ou des virus tels que HTLV1 ou l'EBV. Le recrutement membranaire de TRAF 2,3 et 6, qui à leur tour recrutent et activent la kinase NIK, permet l'activation d'un homodimère IKK α .

Cet homodimère va phosphoryler p100, et seule la région homologue d'I κ B- α sur la protéine sera clivée par le protéasome pour donner p52. L'hétérodimère p52/RelB peut alors être transloqué dans le noyau. Dans les deux cas la phosphorylation de la molécule inhibitrice est essentielle à l'activation du facteur NF- κ B.

La troisième voie est dite «**atypique**», car elle est indépendante des kinases IKK. Elle est activée suite à l'altération de l'ADN par les UV.

Dans ce cas, la phosphorylation de I κ B- α se fait sur le groupement C-terminale grâce à une Caseine kinase 2 (CKII) qui est une serine thréonine kinase elle-même activée par la p38 MAP kinase.

Un stress oxydatif peut également conduire à l'activation de NF- κ B suite à la phosphorylation de la Tyr42 par la protéine Syk.

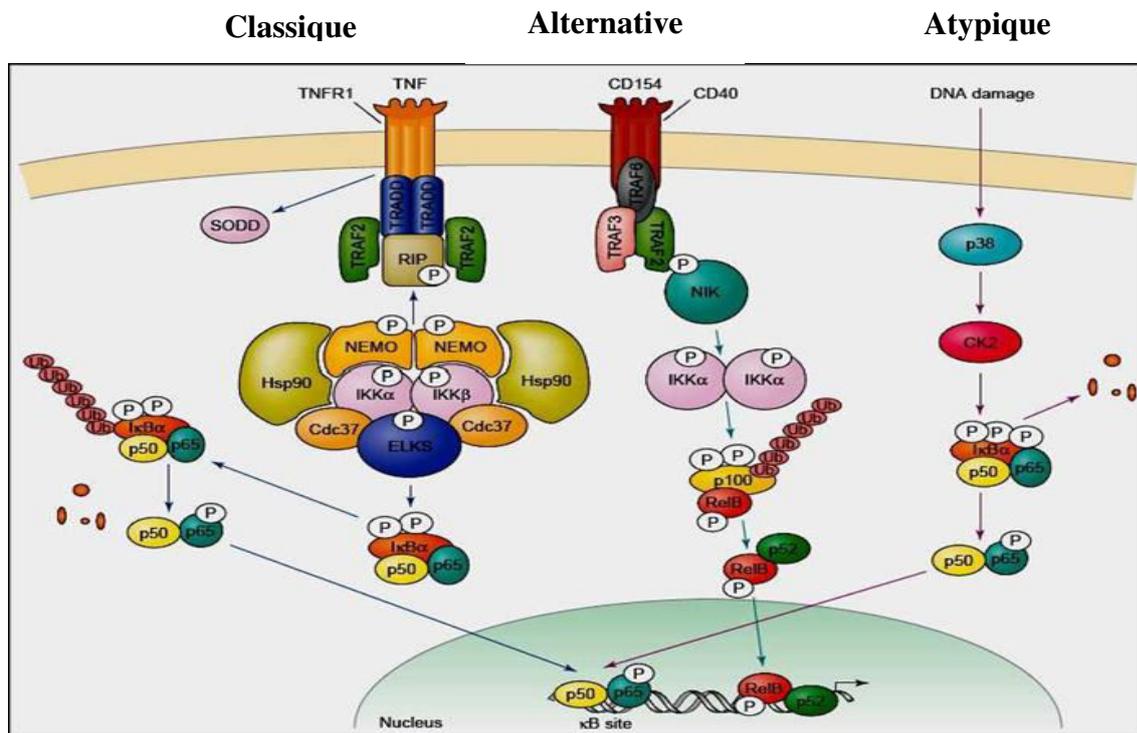


Figure 10: Les trois voies d'activation de NF-κB [57]

II-6- ANALYSE CELLULAIRE EN TEMPS RÉEL PAR MESURE D'IMPÉDANCE

II-6-1- Principe :

La technologie xCELLigence (ACEA Biosciences Inc.) permet un suivi dynamique du comportement cellulaire en temps réel et en continu sans marquage exogène. Alliance de la microélectronique et de la biologie cellulaire, cette technologie est basée sur une mesure d'impédance, les cellules poussant sur un support de microélectrodes d'or en modifiant le flux électronique. Une mesure d'impédance peut être réalisée fréquemment (i.e. 15 secondes étant l'intervalle minimal entre deux mesures) permettant ainsi de caractériser avec une grande précision aussi bien les événements précoces que tardifs de la réponse cellulaire. Le spectre d'applications les plus développées sur ce système concerne l'étude de la prolifération, la viabilité, la différenciation, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire, en passant par l'étude des changements de morphologie cellulaire ou l'analyse fonctionnelle de récepteurs (GPCR, RTK) avec des applications directes dans de nombreux domaines (notamment en cancérologie, neurologie, cardiologie, toxicologie, immunologie et virologie...). Un suivi

quotidien de la morphologie cellulaire, notamment indicatrice de la nature du phénomène observé (détachement cellulaire, mort cellulaire, transition épithélio-mésenchymateuse, différenciation...) est également possible grâce à l'utilisation du microscope dédié à l'utilisation de microplaques.

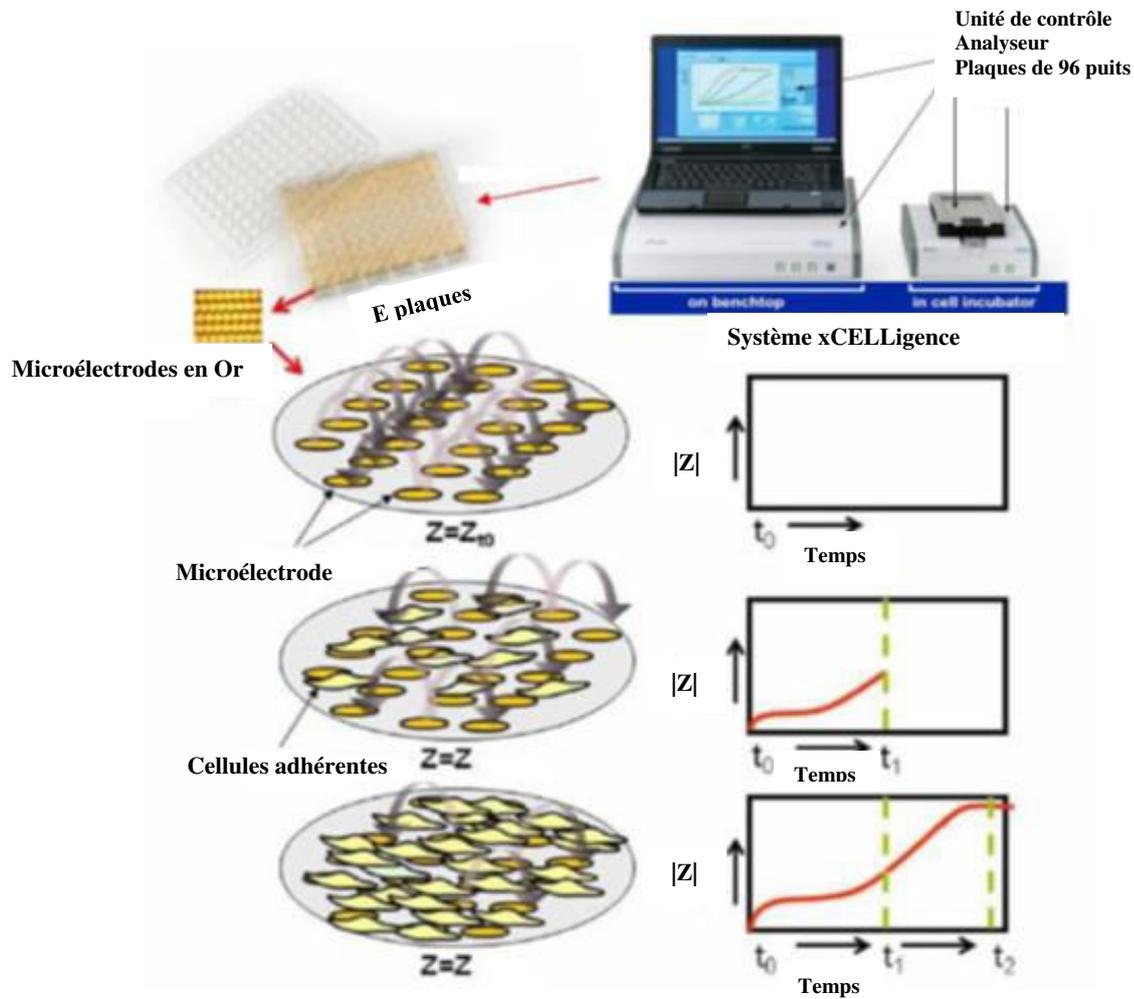


Figure 11 : Représentation schématique de la surveillance en temps réel des cellules adhérentes par le système RTCA (xCELLigence, ACEA Biosciences)

II-7- La cytométrie en flux :

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse de cellules, véhiculées à grande vitesse jusqu'à une chambre d'analyse traversée par des faisceaux lasers. L'interaction des cellules avec la lumière permet de caractériser et de classifier les cellules selon différents critères tels que la taille, la forme, la complexité ou la présence d'une molécule révélée par un composé fluorescent. L'utilisation de molécules fluorescentes (fluorochromes) couplées à des anticorps, protéines ou molécules permettent la détection spécifique des composants cellulaires ou leur intégration. Les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée (Emission > excitation).

L'émission de fluorescence est canalisée et véhiculée par fibre optique jusqu'à une série de détecteurs (photomultiplicateurs) placés en aval des filtres (sélection chromatique). Il est ainsi possible d'identifier des sous-types cellulaires en fonction de leurs propriétés physiques et leurs caractéristiques fluorescentes puis de les isoler et éventuellement les trier.

En réalisant une analyse quantitative multiparamétrique, à l'échelle de la cellule individuelle ou de sous-populations au sein d'échantillons hétérogènes, la cytométrie en flux est ainsi devenue une méthode de référence dans la recherche sur le cancer.

La cytométrie en flux permet de réaliser des études dose-réponse rapidement et très précisément en analysant plusieurs marqueurs de façon simultanée. Il est ainsi possible en une seule expérience de tester l'efficacité d'un composé sur la viabilité, les mécanismes de mort cellulaire, le potentiel mitochondrial, les dommages à l'ADN ou encore la prolifération, et de croiser ces paramètres avec la détection de marqueurs moléculaires, membranaires véritables signatures de sous-types cellulaires ou de molécules intra-cellulaires.

II-8- Chitine et chitosane :

II-8-1- Définition et structure chimique de la chitine :

La chitine est un polymère linéaire qui a une structure similaire à la cellulose, mais c'est un aminopolysaccharide ayant des groupements acétamide en position C-2 à la place des hydroxyyles [58]. Sa structure chimique est un enchainement d'unités monomères N-acétyl- β -D-glucosamine reliées par une liaisons glycosidique(1 4). La nomenclature définit cette structure comme celle d'un poly [β -(1 4)-2- acétamido-2-déoxy-D-glucopyranose]. En réalité, la chitine commerciale contient également des monomères D-glucosamine.

En fait, le terme chitine est donné à tout copolymère formé d'unités constitutives *N*-acétyl-*D* glucosamine et *D*-glucosamine, dont le DA est supérieur à 50%.

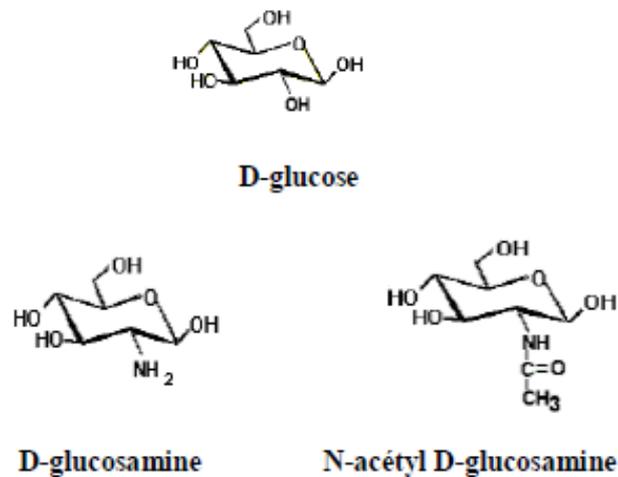


Figure 12: Structures du D-glucose, du D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine.

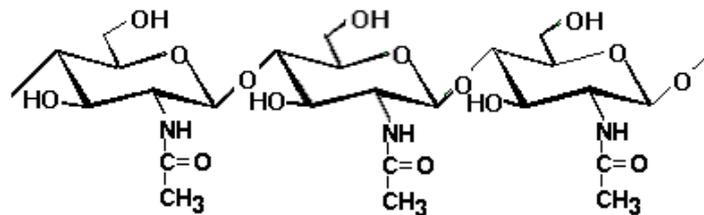


Figure 13: Structure de la chitine

L'analyse aux rayons X montre que la chitine est une substance polymorphe qui se rencontre sous trois formes : α , β , γ et dont la différence réside dans l'orientation des chaînes polysaccharidiques [59], le degré d'hydratation, la taille de la cellule unitaire et le nombre de chaîne de chitine par cellule unitaire [60,61].

II-8-2- Les dérivés de la chitine :

Le chitosane :

Le chitosane est un copolymère cationique, constitué d'unités de β (1-4) 2-amino-2-desoxy-D-glucose (D-glucosamine) et β (1-4) N-acétyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose [62-64].

La désacétylation en milieu basique de la chitine permet d'obtenir le chitosane qui est un copolymère linéaire à arrangement aléatoire d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons β (1-4). Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes [65]. Le terme chitosane est donné à tout copolymère dont le DA est inférieur à 50%. Ainsi, chaque lot est caractérisé par la fraction de groupements N-acétamide résiduels (DA) ou par la quantité relative de groupements acétylés retirés à la macromolécule de chitine lors de sa préparation (DD). Les propriétés du chitosane seront donc dépendantes du DD et de la MM, masse qui est souvent très élevée comme pour tous les polysaccharides.

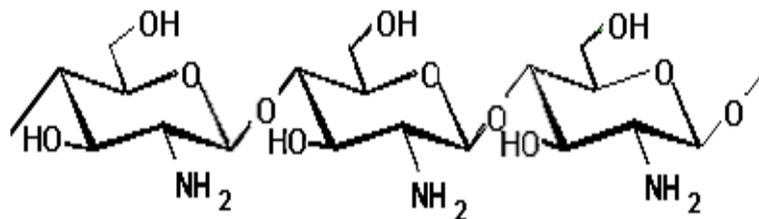


Figure 14: Structure du chitosane

Le chitosane a deux avantages majeurs par rapport à la chitine : sa solubilité dans les acides faibles et l'existence de groupements amines (sites actifs pour de nombreuses réactions chimiques) [66].

Le chitosane est retrouvé dans la plupart des zygomycètes. Il est extrait directement à partir de *Mucor rouxii* [67].

Les oligomères de la chitine et du chitosane:

Comme tous les polysaccharides, la chitine et le chitosane peuvent être dépolymérisé par des agents hydrolytiques par rupture des liaisons glycosidiques. La dégradation de la chitine et du chitosane mène à la production d'oligomères ayant différents degrés de polymérisation et des propriétés biologiques spécifiques. Parmi les méthodes de préparation des oligomères, on peut citer : la dépolymérisation mécanique [68], l'hydrolyse chimique [69,70] et l'hydrolyse enzymatique [71].

Intérêts des chitooligosaccharides :

Les oligomères de chitosane présentent plusieurs avantages par rapport au chitosane non dépolymérisé. Leurs faibles poids moléculaires les rendent solubles dans l'eau et les solutions d'oligomères ont une viscosité plus faible que les solutions de chitosane. De plus, contrairement au chitosane qui agit comme une fibre, les oligomères sont facilement absorbés à travers l'intestin, et passent rapidement dans le système sanguin [72].

II-9- Benzopyrane:

Les composés organiques qui comportent une structure bicyclique résultant de la fusion d'un noyau benzénique et d'un noyau de pyrane sont appelés benzopyranes (Figure 15). Les deux classes de benzopyranes sont représentées sur la figure 15 (La double liaison dans le cycle de pyran de 1-benzopyrane peut aussi être en position 2,3).

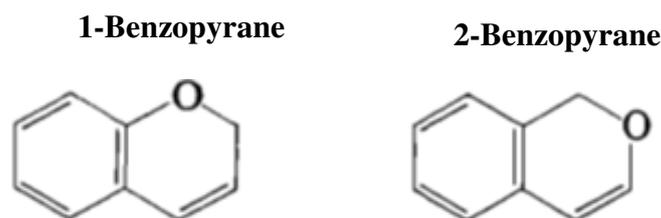


Figure 15 : Types de benzopyranes [73]

Ces composés sont importants parce que beaucoup d'entre eux se trouvent dans les plantes et ont une importance biologique considérable, en particulier comme médicaments.

II-9- 1-1-Chromone :

Le chromone (ou 1-benzopyran-4-one) est un dérivé du benzopyrane avec un groupe céto substitué sur le noyau pyran. Le noyau chromone, le 1-benzopyran-4-one (Figure 16), est présent dans la structure de plusieurs flavonoïdes, tels que les flavones, les flavonols et les

isoflavones. Ses dérivés sont appelés les chromones. Les chromones se retrouvent quasiment partout dans le règne végétale.

Le terme «chromones» est utilisé pour les composés chimiques qui contiennent cette structure (Figure 16). Le mot chromone peut être dérivé du mot grec chroma, qui signifie "couleur", ce qui indique que de nombreux dérivés de chromone présentent une large variation de couleurs.

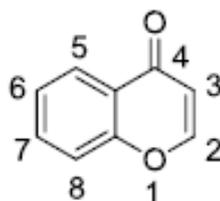


Figure 16 : La structure générale et la numérotation des chromones [73]

Depuis la découverte des 1-benzopyranes à la fin du XIX^e siècle, leur nomenclature a changé plusieurs fois. Par exemple, la désignation des positions dans le système cyclique de la chromone manquait d'uniformité dans les premières littératures (Figure 17). Certains des systèmes de numérotation utilisés par les premiers travailleurs [74] sont représentés en **A**, **B**, **C**, **D** (Figure 17). Une variété de noms a été utilisée pour la chromone [75] au cours des années, par exemple : benzo- γ -pyrone [74,76], γ -benzopyrone [77], pheno- γ -pyrone [78], 2,3 benzopyrone [79], 4-oxo[1,4-chromen] [79], 4-oxochromen [80], et 4H-1-benzopyran-4-On [81].

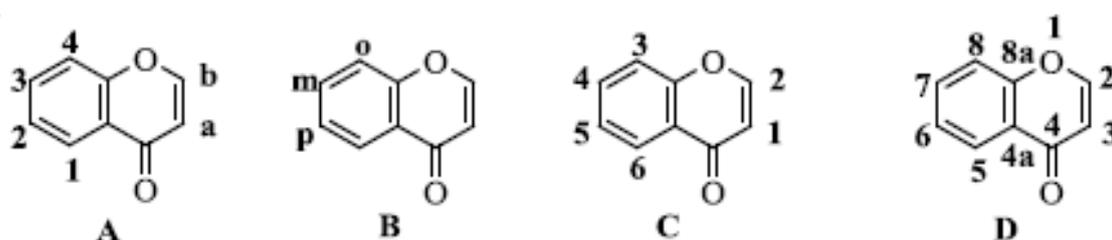


Figure 17 : Certains des systèmes de numérotation utilisés de la Chromone [73]

Ce dernier a été adopté par Chemical Abstracts depuis le début de 1972 pour tous les chromones. Maintenant, la plupart des noms "triviaux" comme chromone ont été remplacés par des noms systématiques qui sont plus pratique pour l'informatisation des indices.

Les produits naturels et synthétiques à base d'un motif chromone présentent diverses activités biologiques. Les dérivés de chromone sont très abondants dans la nature et présentent un large spectre d'activité pharmacologique comme anti-bactérien, anti-fongique

[82,83], anti-cancer [84], anti-oxydant [85], anti-HIV [86], anti -ulcers [87], immunostimulants [86], biocides [89], la cicatrisation des plaies [90], anti-inflammatoires [91], immuno-stimulation [92]. De nombreux dérivés de chromone sont également photoactifs, et peuvent être utilisés facilement dans diverses réactions photo-induites offrant divers composés hétérocycliques.

II-9- 1-2-Coumarine :

Les coumarines (ou 2H-1-benzopyran-2-one) sont des molécules distribuées dans l'ensemble des végétaux supérieurs. Le nom coumarine vient de « cumaru », qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odoranta*; appartenant à la famille Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. Ces composés sont très importants car beaucoup existent à l'état naturel.

Les coumarines sont des composées obtenues par lactonisation de l'acide orthocoumarique. Ces coumarines, une fois hydroxylés sur le noyau aromatique, sont des composés phénoliques à structures variables. Elles sont généralement substituées en C7 par un hydroxyle.

Ces composés ont été isolés par A. Vogel en 1820, à partir des fèves de Tonka. Puis, il a été synthétisé en 1868 par W. H. Perkin, (réaction de Perkin), à haute température, à partir du salicylate de sodium et de l'anhydride acétique $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ en présence d'une base faible $(\text{CH}_3\text{COONa})$ (Figure 18)

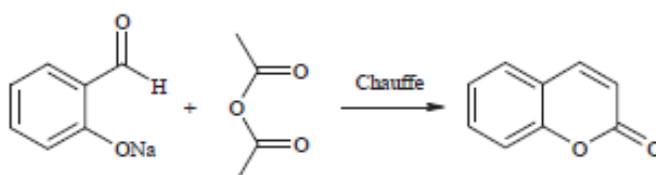


Figure 18 : Réaction de Perkin [93]

Elles sont à la base de plusieurs molécules douées d'activités biologiques qui possèdent un grand domaine d'application en pharmacie, en agroalimentaire et en cosmétique. Cette famille de molécule est largement utilisée en médecine thérapeutique. En effet, les coumarines possèdent un large spectre d'activités. De nombreuses coumarines présentent des activités anti thrombotique [94], anti tumorale, antivirale [95], anti inflammatoire [96] ou antimicrobienne [97]. Elles sont impliquées dans des mécanismes de défense des plantes qui

font suite à différents types de stress engendrés par les bioagresseurs, et possèdent entre autre une activité antimicrobienne [98,99]. Certaines coumarines telles que la scopolétine sont probablement impliquées dans la réduction du stress oxydatif cellulaire [100].

Elles sont également responsables d'un goût légèrement sucré chez de nombreuses variétés de plantes comme le mélilot [101-103], le tabac [104] et de nombreux aliments [103].

Activité anticancéreuse des coumarines :

Les recherches biologiques des coumarines ont révélé l'engouement d'innombrables voies par lesquelles les coumarines agissent comme agents anticancéreux.

Les coumarines visent un certain nombre de voies dans le cancer telles que l'inhibition de la kinase [105,106], l'arrêt du cycle cellulaire [107], l'inhibition de l'angiogenèse [108,109], l'inhibition de la protéine de choc thermique (HSP90) [110], l'inhibition de la télomérase [111], l'activité antimittotique [112], l'inhibition de l'anhydrase carbonique [113], l'inhibition des transporteurs de monocarboxylates [114], l'inhibition de l'aromatase et l'inhibition de la sulfatase [115].

De plus, de telles recherches ont contribué à la dérivation des études de relation structure-activité (SAR) qui ont conduit à la découverte d'une substitution variée du noyau de coumarine, ce qui a permis d'améliorer / élargir le continuum d'activité.

II-10-Composés spiro :

Les composés spirocycliques ont un système structural de deux anneaux disposés orthogonalement l'un à l'autre en raison de l'hybridation sp^3 du spiro-carbone central, qui peut être ajusté chimiquement en introduisant divers motifs hétérocycliques imitant ceux trouvés dans les biomolécules, comme l'ADN et les protéines afin d'augmenter leur capacité à interagir avec les systèmes biologiques [116,117].

Les composés spirocycliques, et en particulier ceux qui comprennent un motif hétérocyclique sont connus pour être des agents médicaux, en témoigne les différents modèles d'alcoïdes naturels et produits pharmaceutiques [118].

En effet, la fonctionnalité spiro est connue depuis longtemps pour être présente dans les composés phytochimiques tels que les alcoïdes, les lactones ou les terpénoïdes.

L'alcoïde spirocyclique l'histrionicotoxine (A) (Figure 19), isolé à partir d'extraits de peau de la grenouille à fléau, *Dendrobates histrionicus*, trouvé en Colombie, est un antagoniste très puissant des récepteurs nicotiniques [119].

Les spirocétals sont les sous-unités de nombreuses substances naturelles d'intérêt biologique telles que les phéromones d'insectes, les antifeedants et les antibiotiques polyéthers [120].

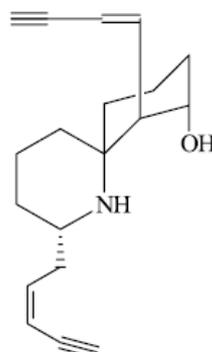


Figure 19 : Structure de l'alkaloïde spirocyclique [119]

Une série de spirocétals (Figure 20) a été isolée de *Chrysanthemum coronarium*, un légume commun du sud de la Chine [121]. Certains de ces composés se trouvent avoir une activité spasmolytique et antiphlogistique [122,123]. Des spiroacétals insaturés tels que le 1,6 dioxaspiro [4.4] nona-3,8-diène [124] 1,5 et le 1,6-dioxaspiro [4,5] décane [125] ont également été isolés d'*Artemisia* sp.

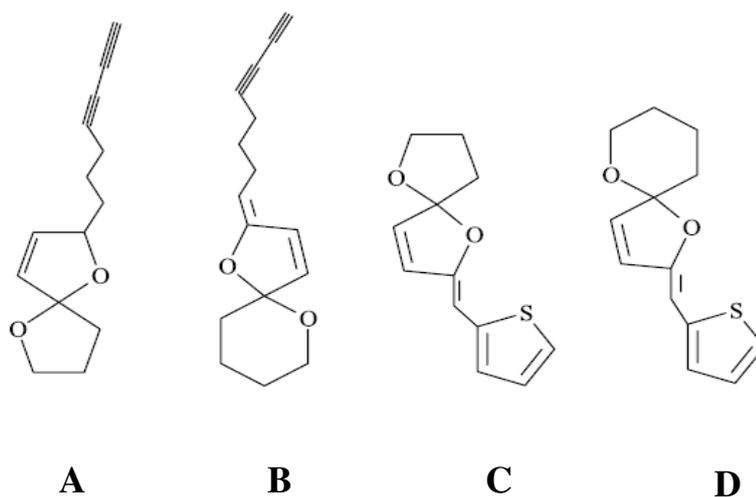


Figure 20 : Spirocétals [121]

La fonctionnalité Spiro reste également un outil structural principal pour la création de puissants agents antitumoraux et anticancéreux moléculaires utilisés dans la chimiothérapie de dernière génération. La nature fournit des structures de spiro remarquables, comme en

témoigne la découverte de nouveaux modèles de triterpénoïdes spiro-bicycliques qui se sont révélés cytotoxiques contre les lignées cellulaires de cancer du sein humain. Le système cyclique spiro [pyrrolidin-3,3'-indole] est un motif structurel récurrent dans un certain nombre de produits naturels tels que la vinblastine et la vincristine qui fonctionnent comme cytostatiques et sont d'une importance primordiale dans la chimiothérapie anticancéreuse [126]. Les dérivés du spiro-oxindole trouvent de larges applications biologiques en tant qu'agents antimicrobiens, antitumoraux et antibiotiques et inhibiteurs du récepteur NK-1 humain [127-129]. La Horsfiline (Figure 21), un alcaloïde d'oxindole contenant un noyau spiro- [indole-pyrrolidone], a été isolé par Bodo et ses collègues de *Horsfieldia superba* [130], un arbre de Malaisie dont les extraits sont couramment utilisés en médecine locale.

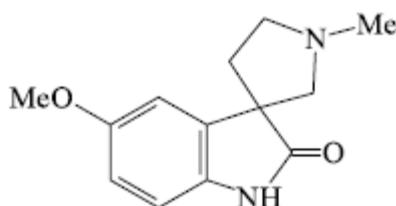


Figure 21 : La Horsfiline [130]

Les alcaloïdes contenant un noyau spiro- [indole-pyrrolidine] sont des agents cytostatiques spécifiques au cycle cellulaire qui arrêtent la mitose et la métaphase en agissant comme des poisons fusants. Ils se révèlent également utiles dans la chimiothérapie anticancéreuse [131].

Les spirolactones sont considérés comme des précurseurs de synthèse pour de nombreux produits naturels bioactifs et agents pharmaceutiques, telle que la Braziline, l'Hématoxyline, Ripariochromene Clausenin [132], Variocolin [133], Mévinoline [134], Biyouyanagin A [135] et β -Vetivone [136].

Au cours des trois dernières décennies la synthèse des composés spiro lactone [137] a reçu une attention considérable en raison de leurs caractéristiques de conformation [138], et leurs implications structurelles dans les systèmes biologiques [139]. De ce fait, cette unité est considérée comme une classe importante de substances naturelles caractérisées par ses propriétés physique et biologique très remarquable [117,140,141]. En effet, les systèmes spiro[cycle-lactone] [142] contenant un atome de carbone sp^3 , qui sont communs à deux cycles, sont structurellement intéressants [142,143]. L'atome chiral du carbone spiro offre une structure asymétrique de la molécule, lui conférant ainsi des activités biologiques très

intéressantes [117,140], ce qui explique l'intérêt croissant à la synthèse et l'étude des effets biologiques de ces composés durant ces dernières décennies.

Cependant, la faible disponibilité naturelle des composés spiro en général et spiro lactones en particulier, a incité les chercheurs à s'appuyer sur ces matrices moléculaires pour optimiser les nouvelles structures chimiques à base de spiro capables de bioactivité significative.

III- Matériels et méthodes

III-1- Les composés :

Dans ce travail, trois types de molécules ont été utilisées :

- Les dérivés de la chitine.
- Les composés Spiro.
- Dérivés Chromone et Coumarine

III-1-1- Les dérivés de la chitine :

Ces molécules proviennent de Sigma Aldrich.

- **Chitosane 1 : Chitosane provenant de la carapace de crevette, $\geq 75\%$ (désacétylé), Chitine désacétylée, Poly(D-glucosamine)**

Préparation :

Préparée par le désacétylation alcaline de chitine obtenue à partir des coquilles de crevettes (*Pandalus borealis*). La chitine est fabriquée industriellement par broyage carapaces de crevettes, puis en lavant les solides avec des acides pour éliminer la matière inorganique et protéinique. La chitine purifiée est désacétylée au chitosane par traitement avec une base forte telle que l'hydroxyde de sodium. Le chitosane résultant peut être davantage purifié par préparation de solutions dans de l'acide suivie par une neutralisation et la précipitation.

Forme des gels avec des anions multivalents. Donne des solutions claires qui sèchent à, des films transparents solides.

Applications :

Chitosane, dérivé de coquilles de crevettes, chitine désacétylée (poly β -1,4-D-glucosamine), peuvent être utilisés comme un polyélectrolyte biomatériau biocompatible, antibactérienne et respectueux de l'environnement avec une variété d'applications, y compris des utilisations dans le traitement de l'eau, la chromatographie, les additifs pour les cosmétiques, le traitement des textiles pour l'activité antimicrobienne, nouvelles fibres pour les textiles, les papiers photographiques, films biodégradables, des dispositifs biomédicaux, et les implants de microcapsules pour une libération contrôlée dans l'administration de médicaments. Il peut être dérivé d'étendre ses utilisations.

- **Chitosane 2** : Chitosane de faible poids moléculaire (Chitine désacétylée, Poly(D-glucosamine)).

Description :

Polyélectrolyte biocompatible, Désacétylé à 75% 85%, antibactérienne et respectueux de l'environnement avec une variété d'applications, y compris le traitement de l'eau, la chromatographie, les additifs pour les cosmétiques, le traitement des textiles pour l'activité antimicrobienne, nouvelles fibres pour les textiles, les papiers photographiques, films biodégradables, des dispositifs biomédicaux, et les implants de microcapsules pour la libération contrôlée de médicament livraison.

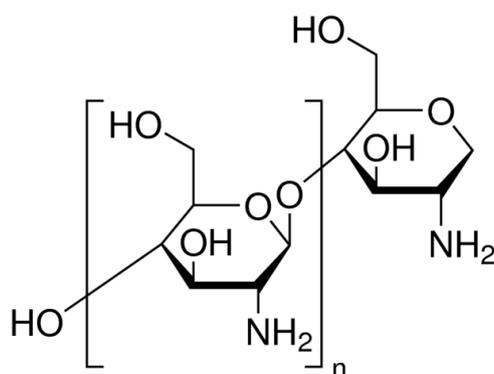


Figure 22 : Chitosane 1,2

- **Chitosane oligosaccharide lactate** :

Formule linéaire : $(C_{12}H_{24}N_2O_9)_n$

Application :

Traitement de l'eau pour les polluants métalliques organiques et lourds, les dispositifs biomédicaux, des emballages biodégradables, finissage textile pour les tissus perméables à l'eau, les produits cosmétiques.

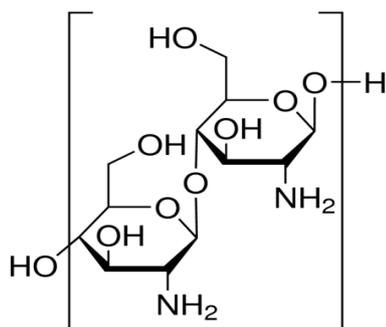


Figure 23 : Chitosane oligosaccharide

1-Test de solubilité du chitosane et du chitooligosaccharide (COS) dans de l'acide acétique :

Pour préparer une solution d'acide acétique dilué à 0,5%, nous avons commencé à préparer 10 ml d'acide acétique à 2%.

10 mg de chitosane et de chitooligosaccharides (Cos) ont été dilués dans un 1ml d'acide acétique (99%) à différentes concentrations : 0,1%, 0,2%, 0,5%,1% sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante.

Nous avons remarqué que la dissolution de nos molécules s'est faite à partir d'une concentration d'acide acétique à 0,5%.

Dans un deuxième temps nous avons essayé d'augmenter la concentration de nos molécules : Nous avons commencé par utiliser 10 mg de nos composés dans 100µl d'Acide acétique à 0,5%, le résultat été négatif, jusqu'à arriver à une concentration de 10 mg/500 µl.

2-Test de viabilité des cellules K562 avec l'acide acétique, le chitosane et le chitooligosaccharide (COS):

Parallèlement au test de solubilité, un test de viabilité (Avec la technique Bleu de Trypan) d'acide acétique et des trois molécules: Chitosane 1, chitosane 2 et COS envers les cellules K562 a été effectué.

Pour le test de viabilité de l'acide acétique, nous avons préparé une gamme de 6 concentrations différentes en prélevant 6 volumes différents d'une solution d'acide acétique de 0,5% (1 µl, 5 µl, 10 µl, 100µl, 200 µl); les résultats étaient relevés après 8h, 24h, 48h, 72h de traitement.

Pour le test du Bleu de Trypan, nous avons, d'abord, observé et compté les cellules K562. Nous avons trouvé une concentration égale à 452000 cellules/ml.

Un volume de 1ml a été déposé à chaque puits d'une microplaque de 24 puits.

Nous avons aussi préparé quatre (04) concentrations différentes de nos trois (3) molécules: 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml et 500 µg/ml. Les résultats étaient relevés après 8h, 24h, 48h, 72h de traitement.

III-1-2- Les composés Spiro :

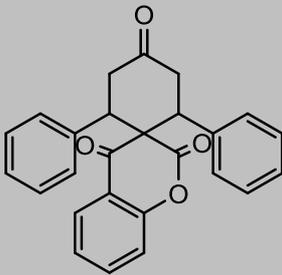
Les composés Spiro nous ont été fournis par O. Talhi, chercheur au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC).

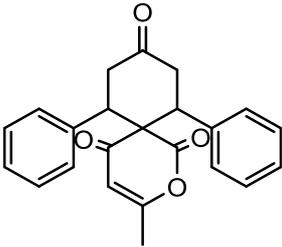
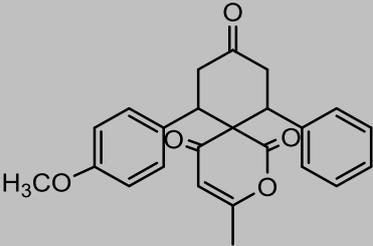
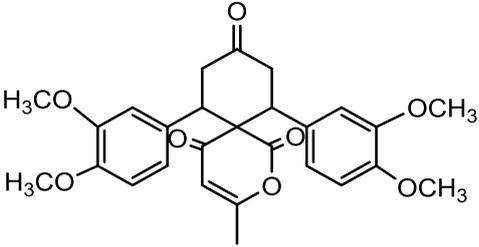
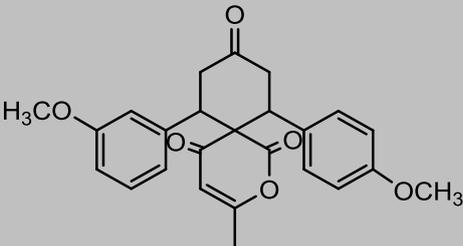
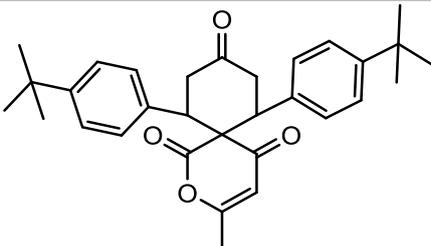
Préparation d'une solution stock des composés Spiro:

On pèse d'abord les échantillons puis on effectue plusieurs tests de solubilité afin de trouver la concentration adéquate à la dissolution de nos molécules dans le DMSO.

Les composés spiro (Tableau 4) ont été solubilisés dans du DMSO à 100% pour obtenir une concentration de la solution mère à 100 mM. La solution mère a été conservée et aliquotée à -20 ° C. Les cellules témoins (cellules K562) ont été traitées avec des quantités équivalentes de DMSO.

Tableau 04: Structures des spiro [lactone-cyclohexanone] 4-9.

Composé	Structure	Poids moléculaire (g/mol)
4		396.43

5		360.40
6		390.42
7		480.50
8		420.45
9		472.61

III-1-3- Dérivés Chromone et Coumarine :

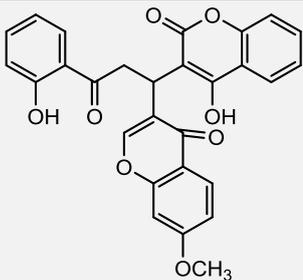
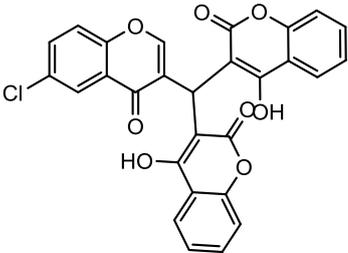
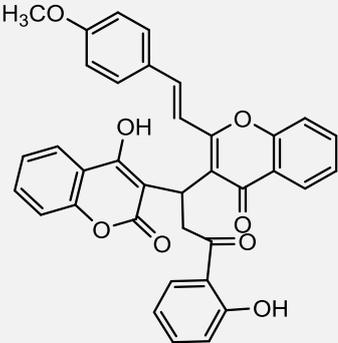
Les composés Chromone et Coumarine nous ont été fournis par O. Talhi, chercheur au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC).

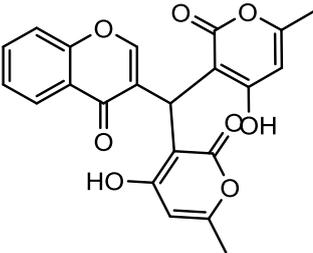
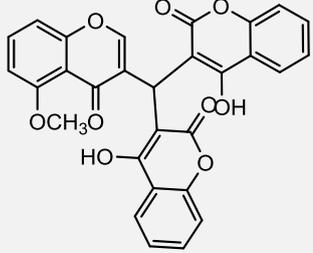
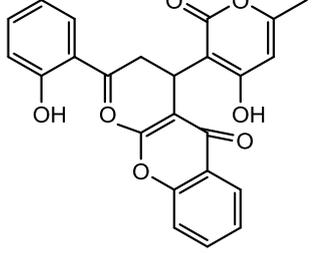
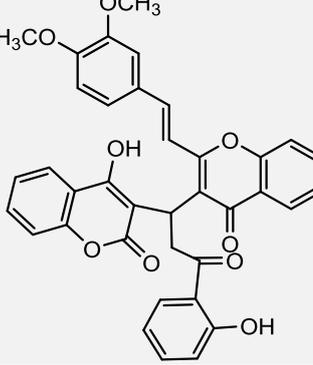
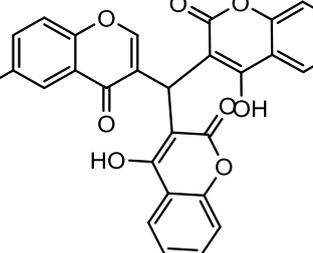
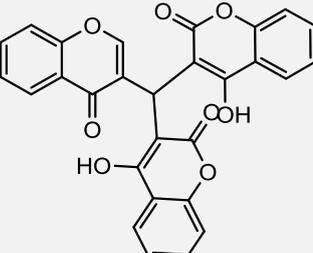
Préparation d'une solution stock des composés Chromone et Coumarine :

On pèse d'abord les échantillons puis on effectue plusieurs tests de solubilité afin de trouver la concentration adéquate à la dissolution de nos molécules dans le DMSO.

Après cette opération, on entame un criblage afin de sélectionner les molécules potentiellement intéressantes; pour cela, des tests de cytotoxicité sur des lignées cancéreuses humaines sont effectués.

Tableau 05: Structures des composés Chromone et Coumarine 1-9

Composé	Structure	Formule	PM(g/mole)
1		$C_{28}H_{20}O_8$	484.46
2		$C_{28}H_{15}ClO_8$	514.87
3		$C_{36}H_{26}O_8$	586.59

4		$C_{22}H_{16}O_8$	408.36
5		$C_{29}H_{18}O_9$	510.45
6		$C_{25}H_{20}O_7$	432.42
7		$C_{37}H_{28}O_9$	616.62
8		$C_{29}H_{18}O_8$	494.45
9		$C_{28}H_{16}O_8$	480.42

III-2- Culture cellulaire et test de cytotoxicité :

III-2- 1- Caractéristiques des lignées cellulaires :

La lignée U937 a été établie à partir de cellules malignes prélevées dans l'épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytique diffus en 1974 [144]. Ces cellules ont des propriétés de monocytes et expriment des marqueurs de cette lignée comme le récepteur au facteur C3 du complément.

La lignée K562 est une lignée continue établie à partir des cellules d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique terminale, prélevée dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans [145]. Il s'agit de cellules indifférenciées, capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes: Erythroïde, granulocytaire, monocyttaire. Les K562 se caractérisent par le chromosome de Philadelphie qui résulte de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Au cours de cette translocation, le protooncogène c-Abl normalement présent sur le chromosome 9 fusionne avec le gène BCR (break point cluster region) situé sur le chromosome 22 [146]. Le gène hybride qui résulte de cette translocation conduit à la synthèse d'une protéine de fusion BCR-ABL à activité tyrosine kinase constitutive [147].

MCF-7 : *Michigan Cancer Foundation-7* : sont des cellules épithéliales qui proviennent d'effusions pleurales d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome du sein.

HCT-116 : *Human COLORECTAL CARCINOMA cell line.*

Hek-293t : *Human Embryonic Kidney 293 cells.*

HepG2 : *Human liver hepatocellular carcinoma cell line.*

B16 : *Melanoma 4A5 cell Line.*

CaCo2 : *Caucasian colon adenocarcinoma cell Line.*

A549 : *Lung carcinoma cell line*: La lignée A549 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans. C'est la lignée communément utilisée par les laboratoires de recherche étudiant le cancer du poumon.

III-2- 2- Conditions de culture et d'entretien des différentes lignées cellulaires :

III-2- 2- 1-Lignées en suspension (K562 et U937):

- Conditions de culture cellulaire :

La culture cellulaire des lignées K562 et U937 a été effectuée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) ainsi que de 1 % d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) sous une atmosphère de 5% CO₂, à 37°C. La population cellulaire a été évalué à l'aide d'un hématimètre de type Malassez. Les cellules ont été collectées tous les 3 jours.

- Test de viabilité des cellules K562 et U937 :

Après observation des cellules sous microscope photonique et vérification de leur bon état, on procède au comptage des cellules en utilisant la technique Bleu de trypan. 1 ml de suspension cellulaire (300 000 cellules/ml) a été déposé dans chaque puits d'une plaque à 24 puits. L'effet du traitement des cellules K562 et U937 avec les composés spiro a été comparé aux échantillons contrôles, c'est à dire traités par le solvant seul (DMSO).

Pour le test de viabilité de nos molécules envers les cellules K562 et U937, on commence par un criblage afin de sélectionner les molécules potentiellement intéressantes ; pour cela, des tests de cytotoxicité sur des lignées cancéreuses humaines sont effectués. Après cette opération, on prépare pour chaque molécule une gamme de 5 concentrations différentes: 10 µM, 30 µM, 50 µM, 70µM, 100 µM ; les résultats étaient relevés après 8h, 24h, 48h, 72h de traitement.

- Bleu de Trypan :

La viabilité des cellules K562 et U937 a été évaluée par le test d'exclusion au bleu trypan après traitement des cellules avec différentes concentrations des composés spiro pendant 72h. Seules les cellules mortes ayant perdu leur intégrité membranaire, sont colorées par le bleu trypan alors qu'il est exclu des cellules vivantes. Les cellules négatives et positives au bleu trypan sont dénombrées à l'aide d'un hématimètre de type Malassez. Cette technique permet à la fois de déterminer la cytotoxicité d'un composé, mais également d'analyser la prolifération cellulaire.

Environ 20 µl de suspension cellulaire ont été échantillonnés et mélangés avec un volume égal de 20 µl bleu de trypan (0.4% dans du PBS).

Le nombre total de cellules vivantes a ensuite été compté en utilisant un hémocytomètre de type Malassez en microscopie optique.

L'activité cytotoxique a été calculée par la relation suivante:

$$\text{Viabilité (\%)} = 100 \times \frac{(\text{nombre de cellules viables})}{(\text{nombre de cellules totale (mortes+ viables)})}$$

III-2- 2- 2- Lignées adhérentes :

- Culture cellulaire :

Les lignées MCF-7, HCT-116, Hek-293t, HepG2, B16, CaCo-2 et A549 sont des cellules adhérentes cultivées en monocouche. Ces cellules sont détachées du fond de la boîte de culture à l'aide de trypsine, une protéase à sérine capable de cliver certaines protéines de surface et de la matrice extracellulaire.

L'action de la trypsine est inactivée par l'ajout de milieu de culture et la suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 350 g pendant 7 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu de culture. La population cellulaire est évaluée à l'aide d'un hématimètre de type Malassez et réensemencée à la concentration adéquate.

- Test de viabilité :

Après observation des cellules sous microscope photonique et vérification de leur bon état, on procède au comptage des cellules en utilisant le **chemometec nucleocounter nc-100** pour relever la viabilité des cellules.

Pour chaque molécule, on prépare une gamme de 5 concentrations différentes : 10 µM, 35 µM, 50 µM, 70µM, 100 µM. Les résultats étaient relevés après 24h de traitement.

Les cellules sont ensemencées et incubées pendant 24 h à 37°C à 5% de CO₂.

Le système **ACEA-XCELLIGENCE** a été utilisé pour le test de cytotoxicité.

- Comptage cellulaire avec le Chemometec nucleocounter nc-100 :

Le NucleoCounter® NC-100™ est un système de comptage automatique pour cellules de mammifères, qui utilise la méthode de coloration des noyaux par l'iodure de propidium et la microscopie à fluorescence, adapté dans un microscope à fluorescence compact mais hautement perfectionné et associé à une caméra CCD et un logiciel d'analyse d'image.

Pour le comptage, une NucleoCassette à usage unique contenant déjà l'iodure de propidium iodide, est chargée avec un petit volume de mélange échantillon/tampons, puis placée dans le compteur de cellules. Après 30 secondes, la concentration cellulaire totale estimée est affichée sur l'écran du NucleoCounter® NC-100™. Selon la préparation de l'échantillon, le résultat représente la concentration totale ou la concentration en cellules mortes. Le logiciel en option NucleoView peut afficher les résultats du calcul de viabilité avec des histogrammes du signal fluorescent et une photo de l'échantillon. Tous les résultats peuvent être transférés sur une feuille de calcul pour un traitement des données ultérieur.



Figure 24 : NucleoCounterR NC-100™

- ACEA-XCELLIGENCE:

Le Real Time Cell Analyzer (RTCA, ACEA Biosciences) est un système dédié au suivi temps réel du comportement des cellules adhérentes, basé sur la mesure d'impédance, permettant d'obtenir des informations quantitatives sur l'état biologique cellulaire (adhésion, prolifération, viabilité, morphologie) en continu, en temps réel et sans marquage.

Ce système est composé d'une station à placer dans l'incubateur, supportant la plaque 96 puits (E-plate 96) dont le fond est recouvert de microélectrodes en or.

Cette station est reliée au RTCA Analyzer qui enregistre et traite les signaux d'impédance, enregistrés au niveau de chaque puits, et analysés grâce à un logiciel d'exploitation spécifique.

Quand la plaque E-plate est posée dans la station RTCA, un courant électrique traverse le puits, donnant lieu à un signal d'impédance de référence (proche de 0).

En présence de cellules adhérentes au fond des puits, la résistance au passage du courant électrique augmente, donnant un signal **d'impédance cellulaire**.

Les variations d'impédance électrique sont représentatives du **statut cellulaire global**.

Plus le nombre de cellules est élevé, plus les valeurs d'impédance sont importantes.

Le Cell Index varie par ailleurs en fonction de la morphologie cellulaire, de la qualité des interactions cellulaires et des interactions entre cellules et support (l'adhésion cellulaire).

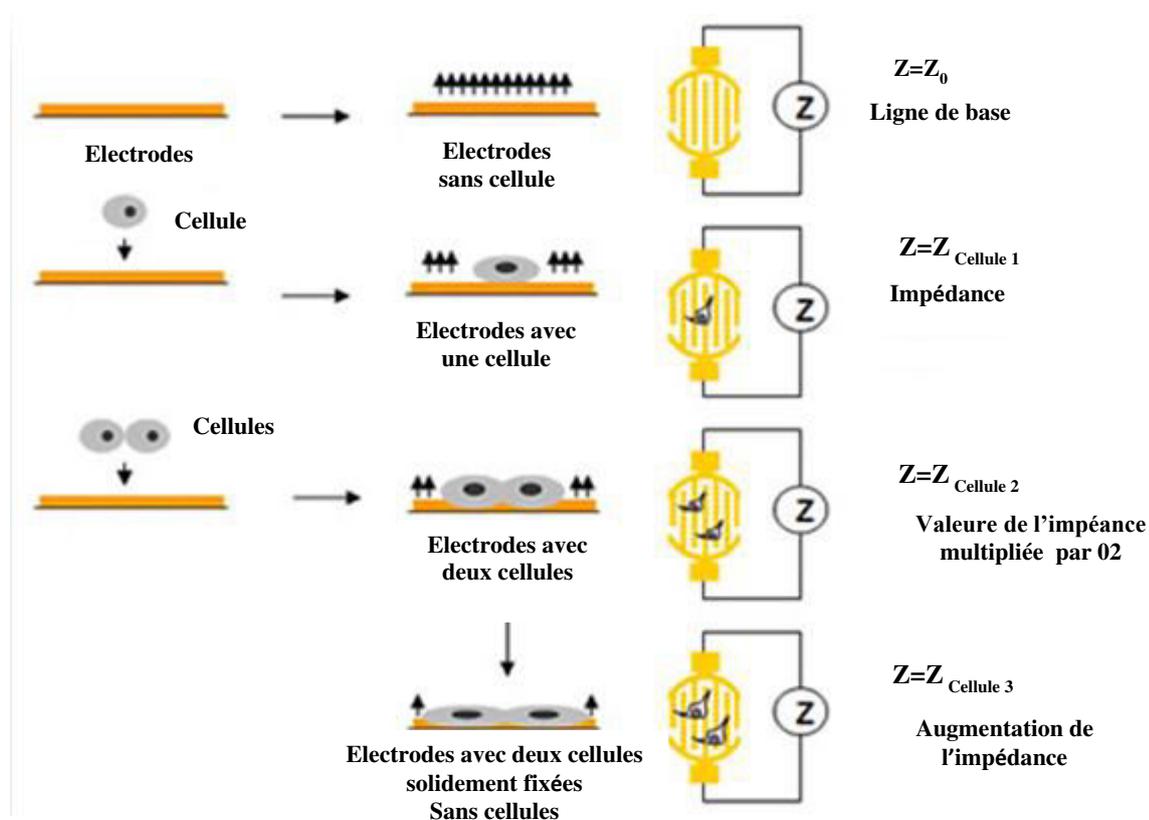


Figure 25 : Principe de la technologie xCELLigence

III-3- Transfection et système rapporteur luciférase :

III-3- 1- Principe des gènes rapporteurs :

Les systèmes de gènes rapporteurs sont largement utilisés en biologie moléculaire à de multiples applications. Brièvement, le concept de gène rapporteur repose sur le fait qu'une séquence nucléotidique introduite dans un système biologique génère un phénotype mesurable lorsqu'elle est exprimée. Au départ, les systèmes rapporteurs étaient surtout utilisés pour

l'analyse d'éléments génétiques agissant en cis, tels les promoteurs ou enhancers mais on les utilise maintenant à d'autres usages, telle l'analyse de facteurs de transcription.

III-3- 2- Principe du système rapporteur luciférase :

Un des systèmes rapporteurs les plus utilisés aujourd'hui est le système basé sur l'expression de la protéine bioluminescente luciférase. L'enzyme luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 pour générer de l'oxyluciférine et de la lumière à une longueur d'onde de 562 nm.

Dans le système rapporteur luciférase, on peut cloner un gène d'intérêt en amont du gène de la luciférase afin que l'expression de la luciférase devienne sous le contrôle de ce gène d'intérêt. L'activité transcriptionnelle du gène est alors mesurée par l'expression de la luciférase. La détection de l'activité luciférase est réalisée *in vitro*, après extraction protéique et ajout du substrat luciférine, d' O_2 et d'ATP.

III-3- 3- Transfections :

La technique de transfection transitoire réalisée par électroporation à l'aide du système « Gene Pulser II » (Biorad) avec les paramètres suivants: 250V and 500 μ F, applique une décharge électrique qui induit la formation de pores membranaires, par lesquels l'ADN plasmidique pénètre à l'intérieur de la cellule (Figure 27).

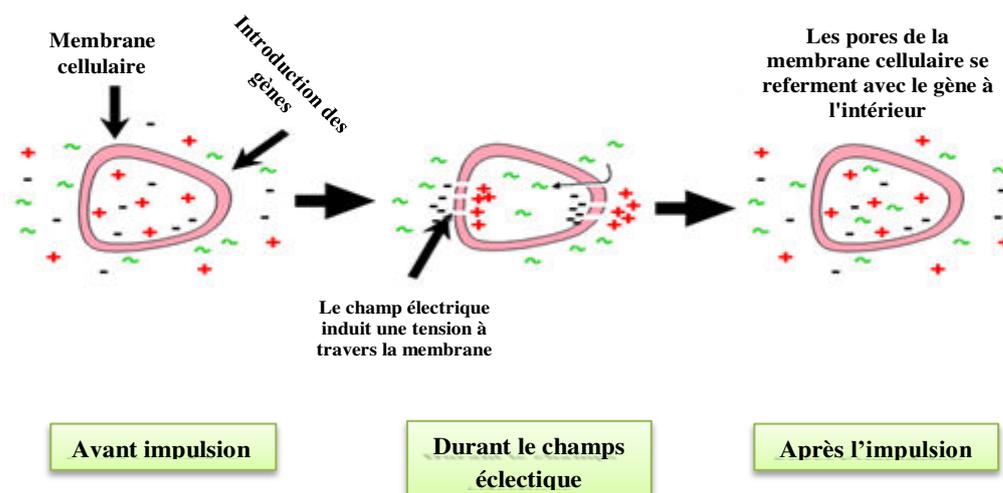


Figure 26: Principe de la transfection transitoire



Figure 27 : Système d'électroporation « Gene Pulser II » (Biorad)

III-3- 4- Transfections :

La transfection est réalisée par électroporation. La création de pores dans la membrane plasmique par un champ électrique permet à l'ADN plasmidique de pénétrer passivement dans le cytoplasme.

Pour chaque expérience, $3,75 \times 10^6$ cellules de la lignée K562 à une concentration de $1,5 \times 10^7$ cellules/ml sont électroporées avec 5 μ g de plasmide luciférase et de 5 μ g de plasmide Renilla dans les conditions suivantes: 250 V, 500 μ F dans un volume final de 250 μ l qui sont ajoutés aux cellules dans la cuvette d'électroporation.

Les cellules sont ensuite transférées dans du milieu complétement en SVF (10 %). Après 24h, les cellules sont resuspendues à 10^6 cellules/ml dans du milieu avec 10 % de SVF dans des puits de plaques de microtitration et traité pendant 2 heures avec le composé 4 ou 9, aux concentrations indiquées suivies de 6 h d'activation avec 20 ng / ml de TNF α .

Le Goniotalamin a été utilisé comme composé inhibiteur positif à la concentration de 7 μ M (ce qui correspond à la valeur de IC₅₀) [148].

Après les traitements, 75 μ l de DualGlo™ Luciferase Reagent sont ajoutés à chaque puits et après 10 min de temps d'incubation à 22 °C, l'activité luciférase est quantifiée par mesure de l'absorbance à 560 nm. 75 μ l de Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagent sont ensuite ajoutés et après 10 min de temps d'incubation à 22 °C, l'activité Renilla est quantifiée par mesure de l'absorbance à 560 nm.

Les émissions de lumière résultant de l'activité luciférase et Renilla sont mesurées dans un luminomètre Berthold par intégration du pic d'émission de lumière en 10s. Tous les résultats sont exprimés en unités de lumière arbitraire correspondant au rapport de l'activité luciférase / l'activité Renilla. Chaque résultat représente la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes de transfection.

III-4- Mesure de l'activité caspases 3-7:

Le principe de ce test tire parti des mécanismes réactionnels du métabolisme de la cellule: Les dosages d'apoptose exploitent certaines cascades enzymatiques qui sont nécessaires à la dégradation des protéines telles que le système des caspases. Dans notre cas, on a utilisé le «caspase 3/7 Glow assays» ; c'est un test luminescent qui mesure l'activité caspase 3 et 7.

Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) est un dosage luminescent qui mesure spécialement l'activité des caspase-3 et 7. Ce sont des protéases caractérisées par la présence d'une cystéine au niveau de leur site actif et leur capacité d'hydrolyser des chaînes polypeptidiques au niveau d'un acide aspartique ce qui est à l'origine de leurs noms. Il existe plusieurs classes de caspases, celles dites de classe II sont les caspases effectrices de l'apoptose (e.g caspases 3 et 7) qui jouent un rôle clé dans les cellules mammifères. La luminescence qui est fournie par un substrat contenant la séquence de DEVD térapeptide,est proportionnelle à la quantité d'activité de la caspase présente. Il repose sur les propriétés d'une luciférase thermostable (Ultra-Glo™), qui est formulée pour améliorer les performances sur une large gamme de conditions de dosage. Pour notre étude, les cellules ont été étalées et traitées dans des plaques de 96 puits, ensuite 100 μ l du réactif ont été ajouté après 24h du traitement. La détection de la luminescence était au moyen du spectrophotomètre (multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT).

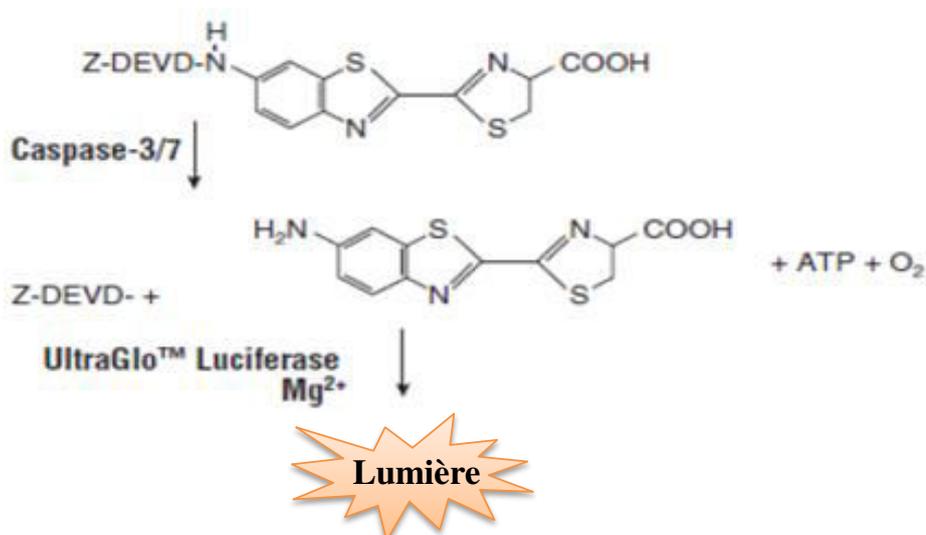


Figure 28 : Clivage par la caspase-3/7 du substrat luminogène contenant la séquence DEVD

Protocol :

La mesure de la caspase 3/7 activités a été évaluée par le kit Caspase-Glo®3/7 (Promega) suivant les instructions du fabricant. En bref, 3×10^5 cellules/ml ont été pré-traitées ou non pendant 1 h avec 50 μM de Caspase Inhibitor I (Z-VAD (OMe) -FMK, Calbiochem), suite à l'addition des composés 4 ou 9 aux concentrations suivantes : 10 μM , 30 μM , 50 μM , 70 μM et 100 μM pendant 24 h. Après la période de traitement, 75 ml d'une culture de cellules ont été mélangés avec 75 ml du réactif Caspase- Glo®3/7 et on été incubé à température ambiante pendant 1 h.

Ce substrat clivé relâche l'aminoluciférine, un substrat de la luciférase, produisant de la luminescence. La luminescence est proportionnelle à la quantité d'activité de la caspase présent. Les résultats sont exprimés en facteur de variation par rapport au témoin.

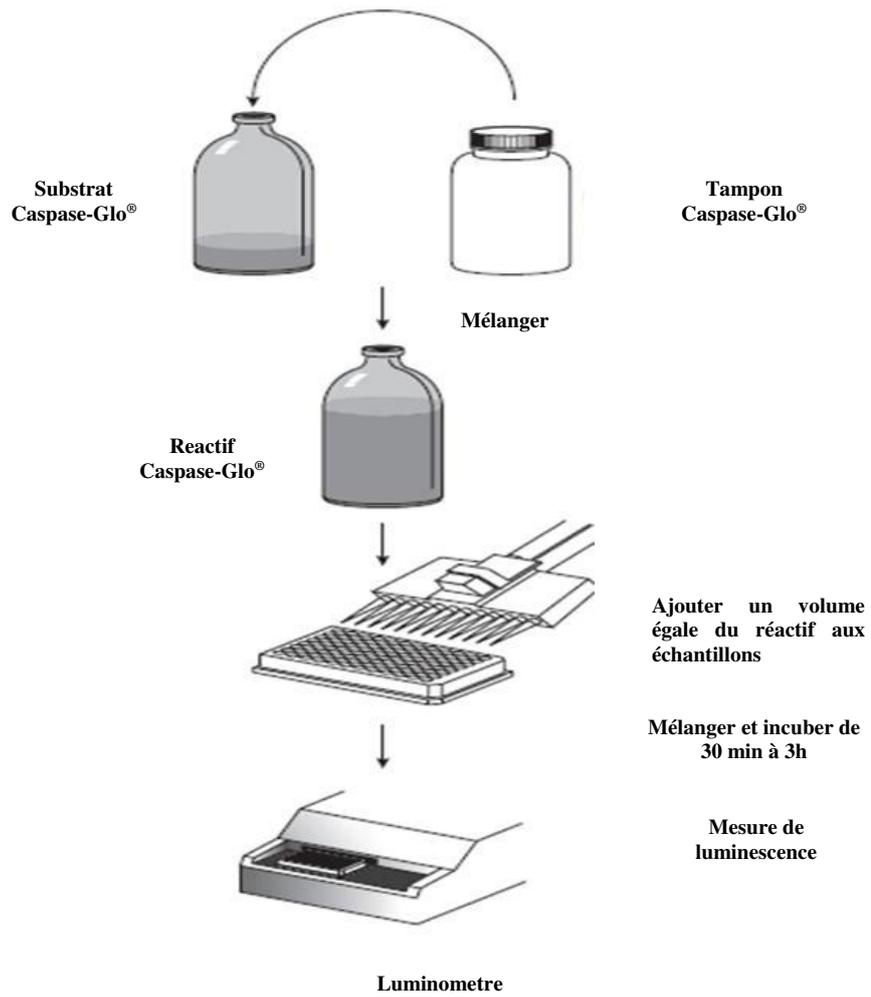


Figure 29: Schéma du protocole du test Caspase-Glo® 3/7

III-5- Western Blot :

Extractions de protéines totales :

Les protéines totales ont été extraites à partir de dix millions de cellules. Les cellules sont d'abord lavées au PBS deux fois puis lysées avec une solution M-PER((Mammalian Protein Extraction Reagent) mélangée à un cocktail d'inhibiteurs de protéases ainsi qu'avec un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases selon les instructions du fournisseur (Roche, Luxembourg, Luxembourg). Après l'ajout de la solution de lyse, les cellules ont été placées à 4°C sous agitation pendant quinze minutes puis les échantillons ont été centrifugés à 4°C à 15000g pendant 15 minutes. Le surnageant résultant de cette centrifugation contenant les extraits protéiques totaux a été récupéré. Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford [149].

Analyse de l'expression des protéines par Western Blot

20 à 50 µg de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE (10%), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Amersham). Les membranes sont saturées pendant 1 heure à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C, dans du phosphate buffered saline (PBS) dans lequel est ajouté 0,1% Tween 20 (PBS-T) additionné de 5% de lait ou 5% de BSA selon l'anticorps qui sera utilisé. Les membranes sont lavées avec du PBS-T et incubées avec les anticorps primaires suivants pendant la nuit à 4°C : anti-PARP (dilution 1:1000, Cell Signalling Therapeutic), anti-cleaved caspase-3 clone D175 (dilution 1:1000, Cell Signalling Therapeutics), anti-caspase3 (dilution 1:1000, Cell Signalling Therapeutics) and anti-beta-actin (1:1000, Sigma Aldrich).

Après plusieurs lavages dans du PBS-T, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire adéquat : anti-mouse IgG (H+L) (dilution 1:2000, thermo scientific) and anti-rabbit IgG (H+L) (dilution 1:2000, thermo scientific). Après incubation avec les anticorps, les membranes subissent un cycle de lavages dans du PBS-T. La détection des protéines se fait par chimioluminescence avec le système ECL (Pierce, Belgique).

III-6- Double marquage à l'Annexine V/Iodure de Propidium: Détection de la mort cellulaire par apoptose :

Principe :

La membrane cellulaire est formée d'une bi-couche lipidique dont certains composés sont négatifs. Lors de l'entrée d'une cellule dans un processus de mort programmée ou apoptose, les résidus phosphatidylsérine sont transloqués sur le versant extracellulaire, aboutissant à une perte d'asymétrie de la membrane.

L'annexine-V possédant une forte affinité pour ces résidus permet de détecter la phase précoce d'entrée en apoptose. Les colorants cationiques, tels que l'iodure de propidium, le bromure d'éthidium ou la 7-actinomycine (7-AMD), ne pénètrent pas les cellules à la membrane intacte. Cela permet ainsi la détection des cellules mortes ou en phase tardive d'apoptose. La combinaison de ces deux marqueurs permet de différencier les cellules vivantes (Annexine-V et IP négatives) des cellules en phase précoce d'apoptose (Annexine-V positives, IP négatives) ou en phase tardive d'apoptose (Annexine-V positives, IP positives).

Iodure de propidium et bromure d'éthidium :

L'iodure de propidium (PI) et le bromure d'éthidium (EB) sont des agents intercalants de l'ADN (sans spécificité de base), de structures chimiques similaires, ne traversant que les membranes cytoplasmiques endommagées. Ils permettent ainsi de mettre en évidence, des cellules apoptotique perméabilisées, hypodiploïdes.

Annexine V :

L'annexine V est une protéine, isolée pour la première fois à partir d'un placenta humain par Bohn et al [150], capable de se lier à la phosphatidylsérine. Pour les analyses, elle est conjuguée à un marqueur tel que la biotine ou la fluoresceine (FITC) [151-153]. Elle ne peut donc pas se lier aux cellules viables, ne présentant pas de phosphatidylsérine à la surface. Chez les cellules nécrotiques, au contraire, ceci est possible du fait de la perte d'intégrité de la membrane.

Cymomètre de flux utilisé: Attune® Acoustic Focusing Cytometer

Le cymomètre **Attune® Acoustic Focusing** est un cymomètre de paillasse qui utilise la pression acoustique pour confiner les particules injectées dans une ligne centrale compacte le long de l'axe du capillaire de telle sorte que l'échantillon passe à travers la cellule optique pour analyse.



Figure 30 : Cytomètre par méthode de focalisation acoustique Attune®

Microscopie à fluorescence :

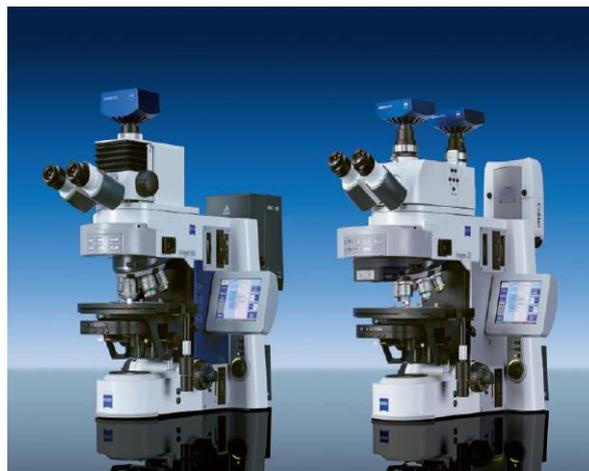


Figure 31: Microscope à fluorescence Carl Zeiss

- Protocol suivi :

Dans notre étude, nous avons testé le composé 8 avec les cellules HCT116 à différentes concentrations durant 48h.

1- Induction de l'apoptose par notre molécule pendant 48h de traitement.

2- Collection des cellules après la période d'incubation et lavage à froid avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS).

3- Re-centrifugation des cellules lavées, élimination du surnageant et remise en suspension des cellules dans 100 µl de tampon de liaison.

4- Ajout de 5 µl Annexin V FITC et 5 µl PI à chaque 100 µl de suspension cellulaire.

5- Incubation des cellules à température ambiante pendant 15 minutes. Après la période d'incubation, ajouter de 400 µl de tampon de liaison, mélanger doucement et conserver les échantillons sur de la glace.

6-Analyse des cellules colorées par cytométrie de flux le plus rapidement possible, mesure de l'émission de fluorescence à 530 nm (par exemple, FL1) et > 575 nm (par exemple, FL3)

7- Confirmation des résultats de la cytométrie de flux en visualisant les cellules sous un microscope à fluorescence, en utilisant des filtres appropriés pour la fluorescéine (FITC) et la rhodamine (TRITC) ou au Texas colorant RedR.

IV- Résultats et discussion

IV -1- Effet du chitosane et du chitooligosaccharide (COS) sur la viabilité et la prolifération cellulaire des lignées leucémiques K562:

Les résultats montrent, d'une part, l'optimisation de la solubilité des dérivés de la chitine dans des concentrations d'acide acétique non toxiques aux cellules k562 (Figures 32 et 34) et d'autre part, l'absence d'effet antiprolifératif de nos trois dérivés envers les cellules k562 (Figures 33 et 35).

En effet, la prolifération et la viabilité des cellules k562 ne sont pas affectées même avec des concentrations de 500 µg/ml malgré le fait que plusieurs travaux ont montré l'effet antiprolifératif des dérivés de la chitine envers des lignées cancéreuses humaines, entre autres les travaux que nous avons entrepris en 2012 [154] sur l'effet de la chitine et ses dérivés envers des cellules cancéreuses humaines. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats.

En effet, le comportement physiologique de ces composés et leurs propriétés sont fortement liés à leur variabilité structurelle et physicochimique intrinsèque en raison de leur origine naturelle et de leur processus de fabrication [155]. De plus, la modification chimique de ces polymères améliore leur solubilité dans l'eau ou dans les solvants organiques, ce qui améliore leur activité biologique et augmente le nombre d'applications biomédicales potentielles. La connaissance de la microstructure de ces composés est essentielle à la compréhension des relations structure-propriété-activité.

En effet, les propriétés biologiques de ces composés dépendent étroitement de leurs paramètres physicochimiques, en particulier de leur solubilité dans l'eau et d'autres solvants couramment utilisés. La plupart des propriétés caractéristiques du chitosane sont strictement liées à son poids moléculaire (MW) et à sa teneur élevée en résidus de glucosamine contenant des groupes amino primaires [156].

En comparaison avec le chitosane, la chitine, étant un matériau hautement insoluble et chimiquement plutôt non réactif, a beaucoup moins d'applications. En modifiant chimiquement les groupes amino primaires et hydroxyles libres de la chitine et du chitosane, leur solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques peut être améliorée [157-162].

Des matériaux à base de chitine/chitosane avec différentes structures montrent des activités biologiques différentes et toutes les activités biologiques n'ont pas été trouvées dans un type de chitine/chitosane [163].

La connaissance de la microstructure des échantillons de chitine et de chitosane est donc essentielle pour la compréhension des relations structure-propriété-activité, et un accent

particulier à cet égard devrait être placé sur les chitines/chitosanes utilisés dans les applications biomédicales [156,163-166].

L'activité anti tumorale de la chitine/chitosane est, elle aussi, affectée par les paramètres physicochimiques de ces polymères et en particulier par leur poids moléculaire.

En effet, l'activité anti tumorale se manifeste par la stimulation du système immunitaire (production de lymphokines, y compris les interleukines 1 et 2, stimulation de NK...) [167,168].

Jeon & Kim ont testé l'activité anti tumorale de trois types de COS (haut poids moléculaire allant de 6,5 à 12 kDa - HMWCOS, poids moléculaire moyen allant de 1,5 à 5,5 kDa - MMWCOS et faible poids moléculaire allant de 0,5 à 1,4 kDa - LMWCOS) contre le carcinome cervical solide (S180) et le carcinome utérin cervical n°14 (U14) du sarcome 180 [168].

L'efficacité de l'inhibition de la croissance tumorale pour les deux types de cellules tumorales chez la souris était la meilleure dans le cas de MMWCOS.

Maeda et Kimura ont étudié l'effet anti tumoral de trois chitosanes hydrosolubles de faible poids moléculaire (21 kDa, 46 kDa, 130 kDa) et diverses doses de chitosane de 650 kDa chez des souris porteuses de sarcome 180 [169]. Ils ont trouvé que LMWC (21 et 46 kDa) et aussi des oligosaccharides plus petits pouvaient activer le système immunitaire intestinal des animaux, empêchant ainsi la croissance tumorale. Mais aucun effet anti tumoral n'a été observé après l'administration orale d'échantillons de chitosane, même de faible poids moléculaire (46 kDa).

Les mêmes auteurs ont confirmé que le chitosane de haut poids moléculaire (650 kDa) prévient les effets indésirables de certains médicaments chimio thérapeutiques anticancéreux.

Qin et al. ont également testé l'activité anti tumorale de LMWC contre le sarcome 180, mais ils sont venus à des conclusions opposées. Ils ont noté que l'administration orale de chitosane LMW diminue le poids de la tumeur [167,170], bien que l'administration par injection intra péritonéale conduit à un taux inhibiteur plus élevé [170].

Il a été rapporté que plus le MW de LMWC était élevé, meilleur était l'effet de la tumeur inhibitrice [167].

Le résultat de l'oxydation du chitosane a l'effet opposé et une augmentation de la MW diminue l'activité anti tumorale [171]. L'influence de LMWC et de COS (y compris le pentamère, l'hexamère et les oligomères supérieurs) sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales ascites d'Ehrlich (EAT) et la néo vascularisation induite par une tumeur ont été étudiées [172].

Sur la base des résultats expérimentaux concernant l'inhibition de l'angiogenèse et l'induction de l'apoptose, il a été confirmé que les COS semblent être des composés angiogéniques et anti tumoraux plus puissants.

Wang et al. ont rapporté que les oligosaccharides de la chitine (DP 1-6) réduisaient également le nombre de cellules K562 (lignée cellulaire de leucémie érythromyélotoïde humaine) [173].

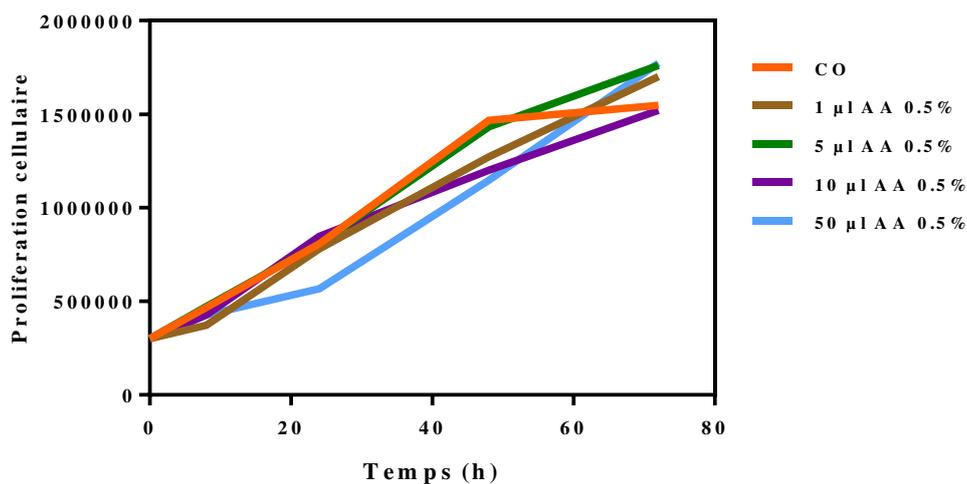


Figure 32 : Effets des différentes concentrations en acide acétique sur la prolifération des cellules K562. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

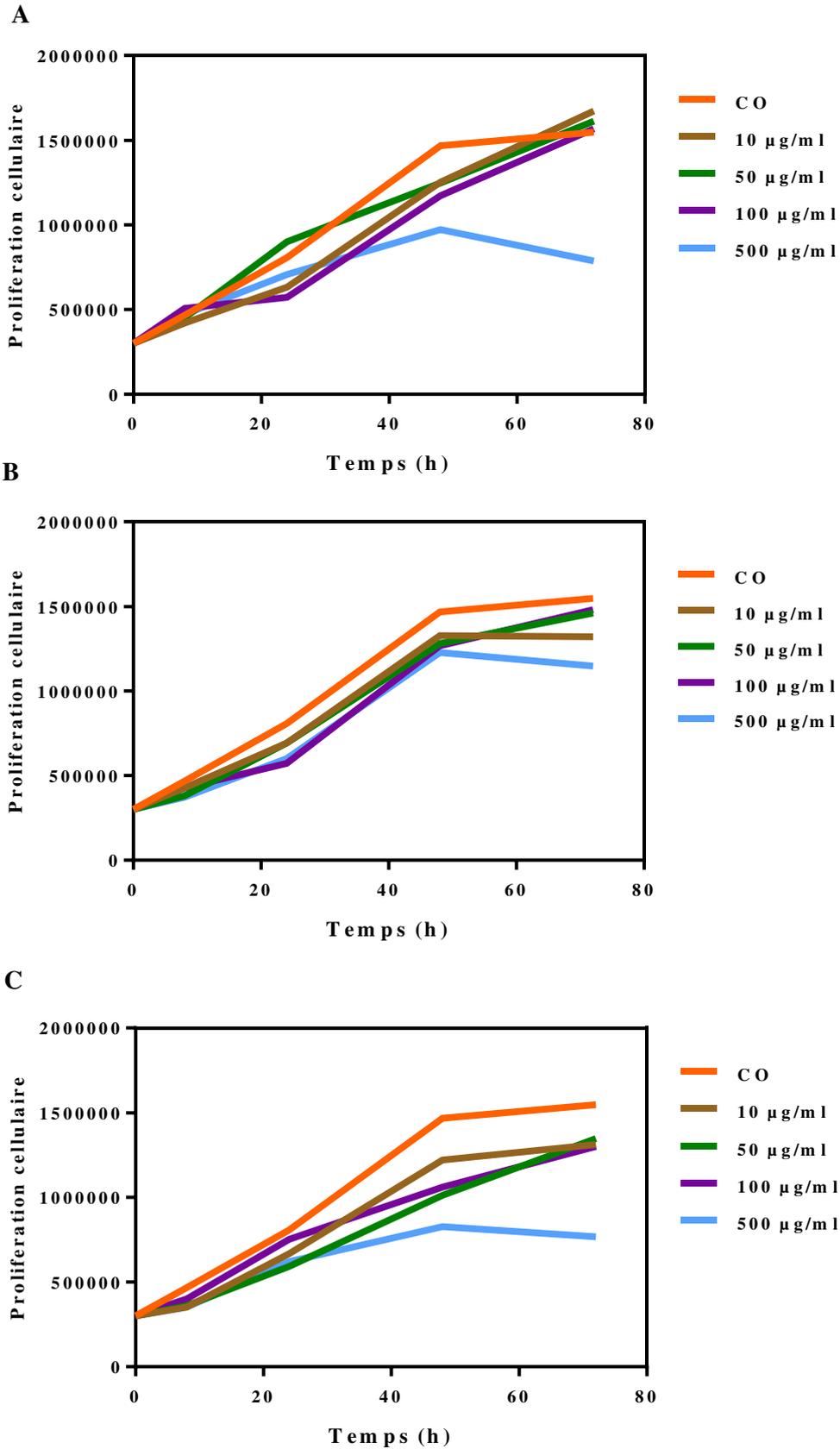


Figure 33 : Effet des différentes concentrations du chitosane 1(A), du chitosane 2 (B) et du COS (3) sur la prolifération cellulaire des cellules k562 Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

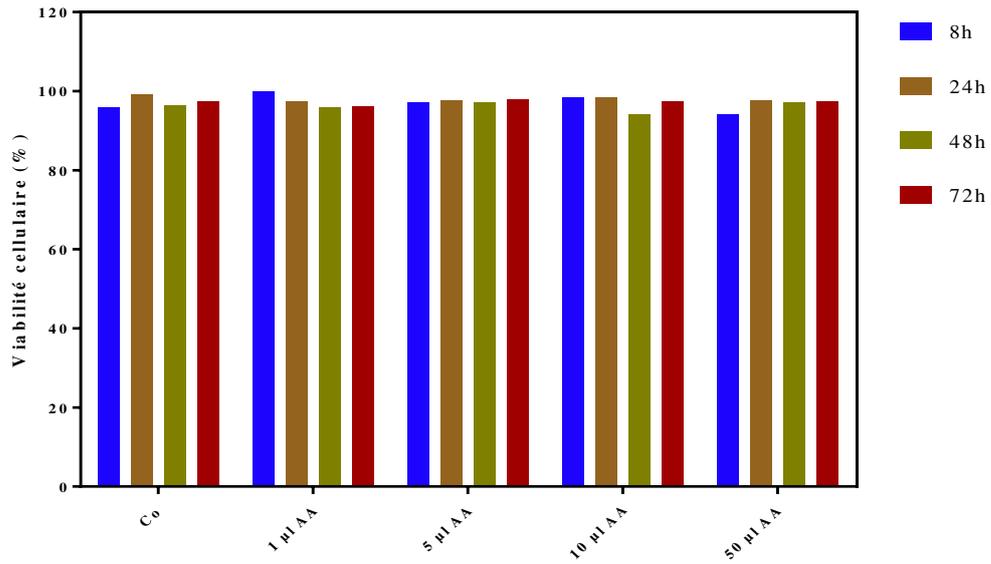


Figure 34 : Effets des différentes concentrations en acide acétique sur la viabilité des cellules K562. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

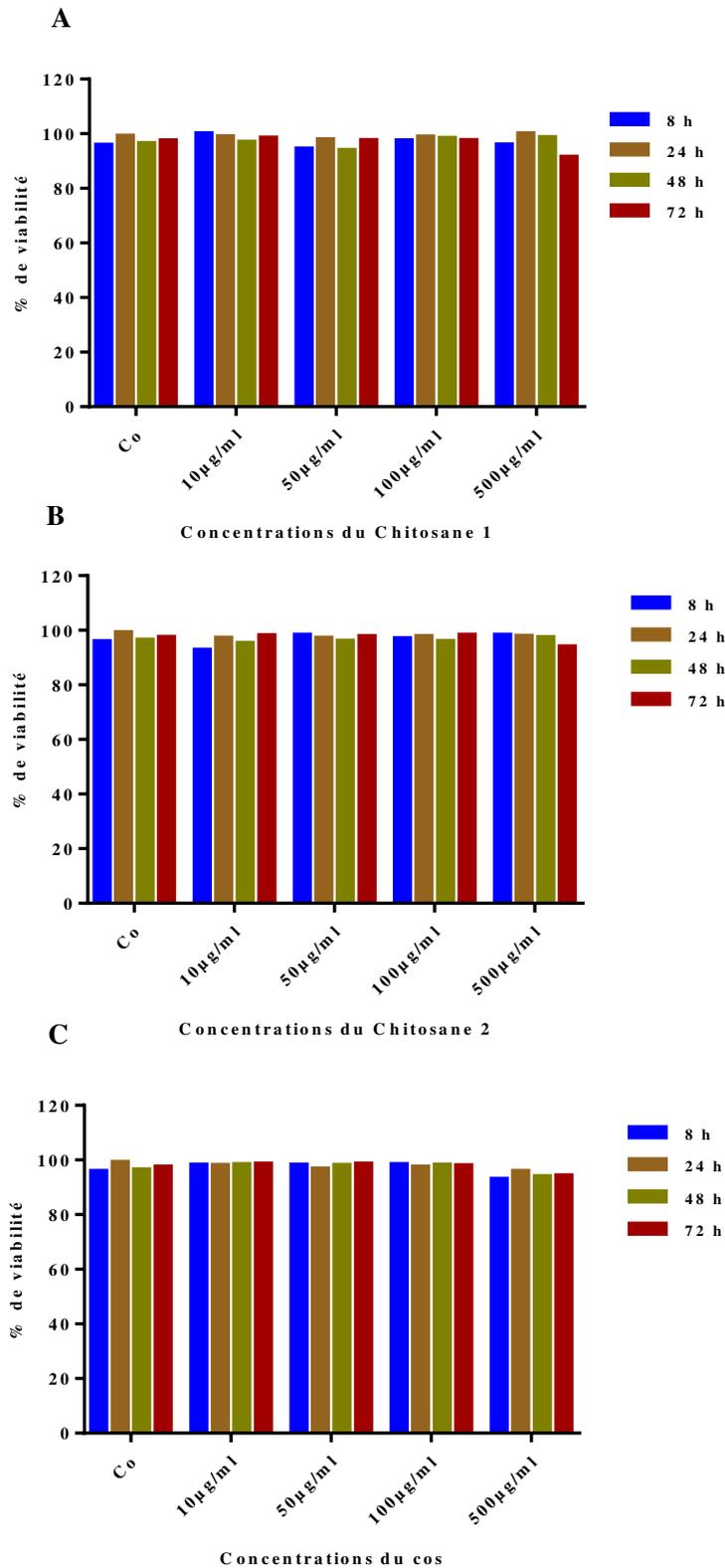


Figure 35 : Effet des différentes concentrations du chitosane 1(A), du chitosane 2 (B) et du COS (3) sur la viabilité cellulaire des cellules k562 Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -2- Effet des composés spiro 4-9 sur la viabilité et la prolifération cellulaire des lignées leucémiques K562 et U937 :

Un ensemble de six spiro-composés 4-9 (tableau 4) ont été testé pour leur activité anticancéreuse envers les cellules leucémiques humaines (U937 et K562).

Les cellules K562 ont été les premières lignées cellulaires de leucémie myéloïde immortalisées humaines à être établies. Elles sont du type érythroleucémie et la lignée est dérivée d'un patient atteint de LMC de 53 ans en crise blastique [174,175].

Les cellules sont non adhérentes et ont un aspect arrondies. Elles sont positives pour le gène de fusion bcr: abl et présentent une certaine ressemblance protéomique avec les granulocytes indifférenciés [176] et les érythrocytes [177].

U937 est une lignée cellulaire de leucémie myéloïde humaine pro-monocytaire. Elle a été isolée du lymphome histiocytaire d'un homme de 37 ans [178]. Cette lignée cellulaire présente de nombreuses caractéristiques des monocytes et est facile à utiliser. Un nombre pratiquement illimité de cellules peut être préparé et elles sont relativement uniformes.

Cette lignée cellulaire a été un outil important dans l'étude de l'activité anticancéreuse de nombreux agents cytotoxiques. Ces cellules leucémiques ont été utilisées comme modèle expérimental pour élucider les mécanismes de mort cellulaire induits par ces agents cytotoxiques [179-181].

Une analyse génétique effectuée par Strefford et al [182], a montré que les U937 portaient la translocation t (10; 11) (p13; q14). Il en résulte une fusion entre le gène MLLT10 (leucémie myéloïde / lymphoïde ou lignée mixte) et la protéine d'assemblage de la clathrine de type Ap-3- PICALM (assemblage de la clathrine leucémie myéloïde lymphoïde), qui est probablement importante pour la nature tumorale de la lignée cellulaire [182].

En tant que premier objectif biologique vers le suivi d'un nouvel agent anticancéreux, nous avons évalué les effets cytotoxiques de nos composés sur les cellules K562 et U937 par le test au bleu trypan.

Après un premier criblage, les résultats ont montré que le composé 4 (spiro [pseudocoumarine-cyclohexanone]) et 9 (spiro [6-méthyllactone-cyclohexanone]) étaient les plus efficaces après 72 h à 100 μ M (Figures 36).

De ce faite, nous avons décidé de poursuivre le reste de notre travail avec les composés 4 et 9.

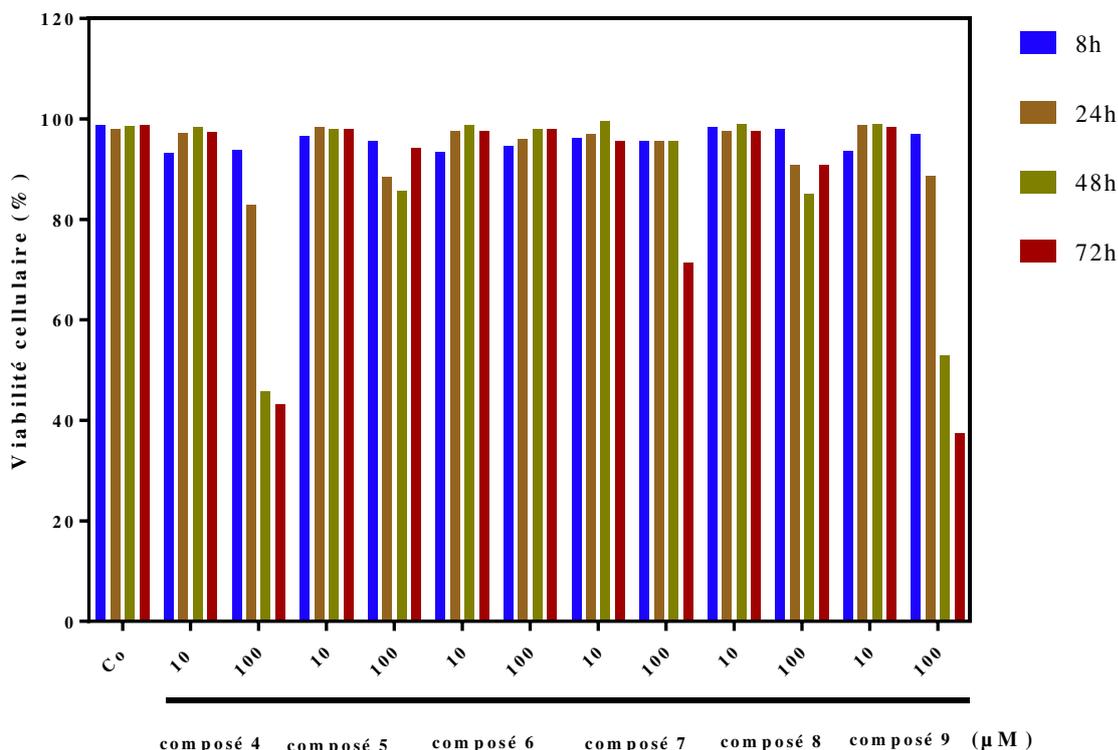


Figure 36: Effet des composés spiro 4-9 sur la viabilité cellulaire des cellules K562 par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

Les composés 4 et 9 ont été évalués pour leurs effets sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses dans la leucémie myéloïde chronique humaine K562 et les lignées cellulaires de lymphomes histiocytaires U937 à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan.

Plusieurs études ont révélé les nombreux effets anti prolifératifs et les propriétés anti-tumorales d'une variété de coumarine et de spiro composés ; ils ont été signalés comme inhibant la prolifération d'un certain nombre de lignées cellulaires malignes humaines in vitro [183-185].

En effet, Ismail et al, ont montré que de nouveaux dérivés spiro : spiro[pyrazolo [4,3-d] pyrimidinones and spiro[benzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine-2,30-indoline]-20,4(3H)-diones, obtenus avec une nouvelle méthode de synthèse, avaient un effet antiprolifératif envers les lignées cancéreuses leucémiques K562 ainsi qu'envers d'autres lignées cancéreuses [186]. Une nouvelle série de 4-bromo spiro-isoxazolines possédant une variété de substituants aromatiques et aliphatiques en position 3 a montré un effet anti prolifératif contre deux

lignées cellulaires cancéreuses du sein et contre deux lignées cellulaires du cancer de la prostate [187].

Lidan Zhang et al ont synthétisé de nouveaux carbocyclooxindoles polycycliques spiro-fusionné, et les ont étudié pour leurs activités antiprolifératives in vitro contre neuf lignées cellulaires cancéreuses humaines. Cinq composés (composé 10i, 10l, 10n, 10p et 10r) ont montré des activités anticancéreuses [188].

Majid Ghasemia et al ont montré que les cellules k562 subissaient un effet anti prolifératif ainsi qu'un effet apoptotique en supprimant l'expression de la protéine caspase-3, après qu'il ait été traité avec des dérivées spiroquinazoline[189].

Compte tenu de ces résultats, il n'est pas surprenant que nos composés montrent un effet de régulation négative sur la prolifération et de la viabilité des cellules cancéreuses K562 et U937.

En effet, les cellules ont été traitées avec cinq concentrations différentes de chaque composé allant de 10 μM à 100 μM .

Nous avons observé un effet cytostatique à 30 μM dans les deux lignées de cellules. Les deux composés 4 et 9 ont montré une inhibition marquée de la prolifération des cellules K562 et U937 à partir de 50 μM (Figure 37).

Au total, le composé 4 (spiro [pseudocoumarine-cyclohexanone]) et 9 (spiro [6-méthyllactone-cyclohexanone]) ont exercé une inhibition de la prolifération cellulaire dépendant de la dose et du temps dans les deux lignées cellulaires étudiées.

Les résultats ont montré que les cellules U937 étaient plus sensibles au traitement que les cellules K562.

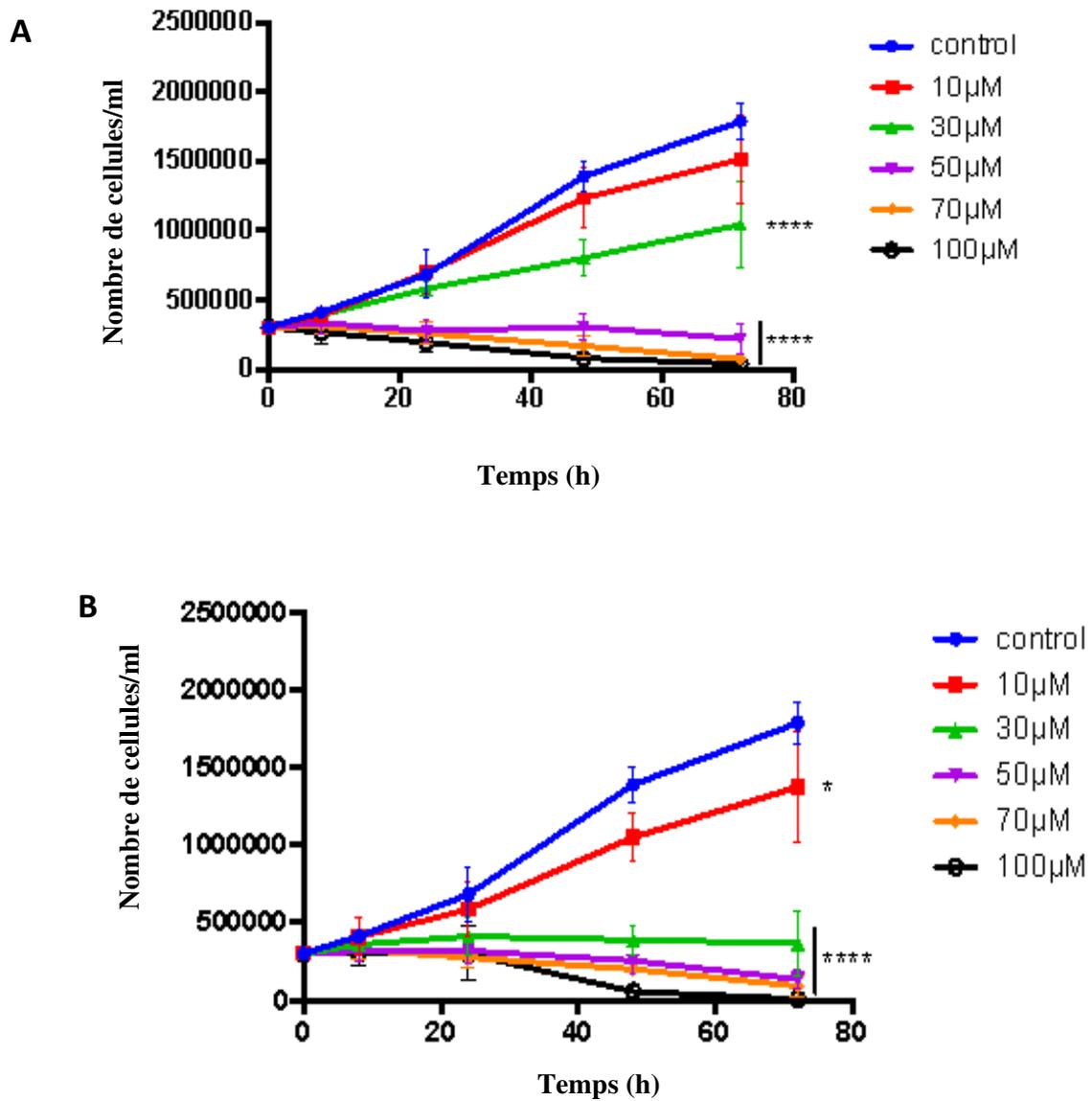
D'un point de vue structurel, la substitution phényle-2,4-dione (chromane-2,4-dione) (composé 4) est probablement étroitement liée à ces effets antiprolifératifs, comme déjà signalé pour d'autres spiro-modèles contenant un motif chromane [190].

On a également observé que la substitution des groupes diaryle 7,11 par le tert-butyle-phényle (composé 9) provoque une bonne activité antiprolifératifs envers les lignées cellulaires étudiées.

La diminution de la prolifération s'est accompagnée d'une réduction relative de la viabilité cellulaire (Figure 38); le composé 4 montre des CI_{50} de: 74.02 \pm 4.1 μM et 51.6 \pm 4.2 μM après 72 h de traitement contre les cellules K562 et U937, respectivement; alors que, le composé 9 était cytotoxique avec des IC_{50} de: 58.6 \pm 4.2 μM et 43.7 \pm 1.5 μM après 72 h de traitement contre les cellules K562 et U937, respectivement.

Résultats et discussion

Les composés 4 et 9 ont affecté la viabilité de l'U937 à 96,88 % et 100% après 72 h de traitement à 100 μ M, respectivement. Alors que, pour le cas de la lignée cellulaire K562, la viabilité a diminué de 71,29 % et de 90,03% après 72 h de traitement, respectivement.



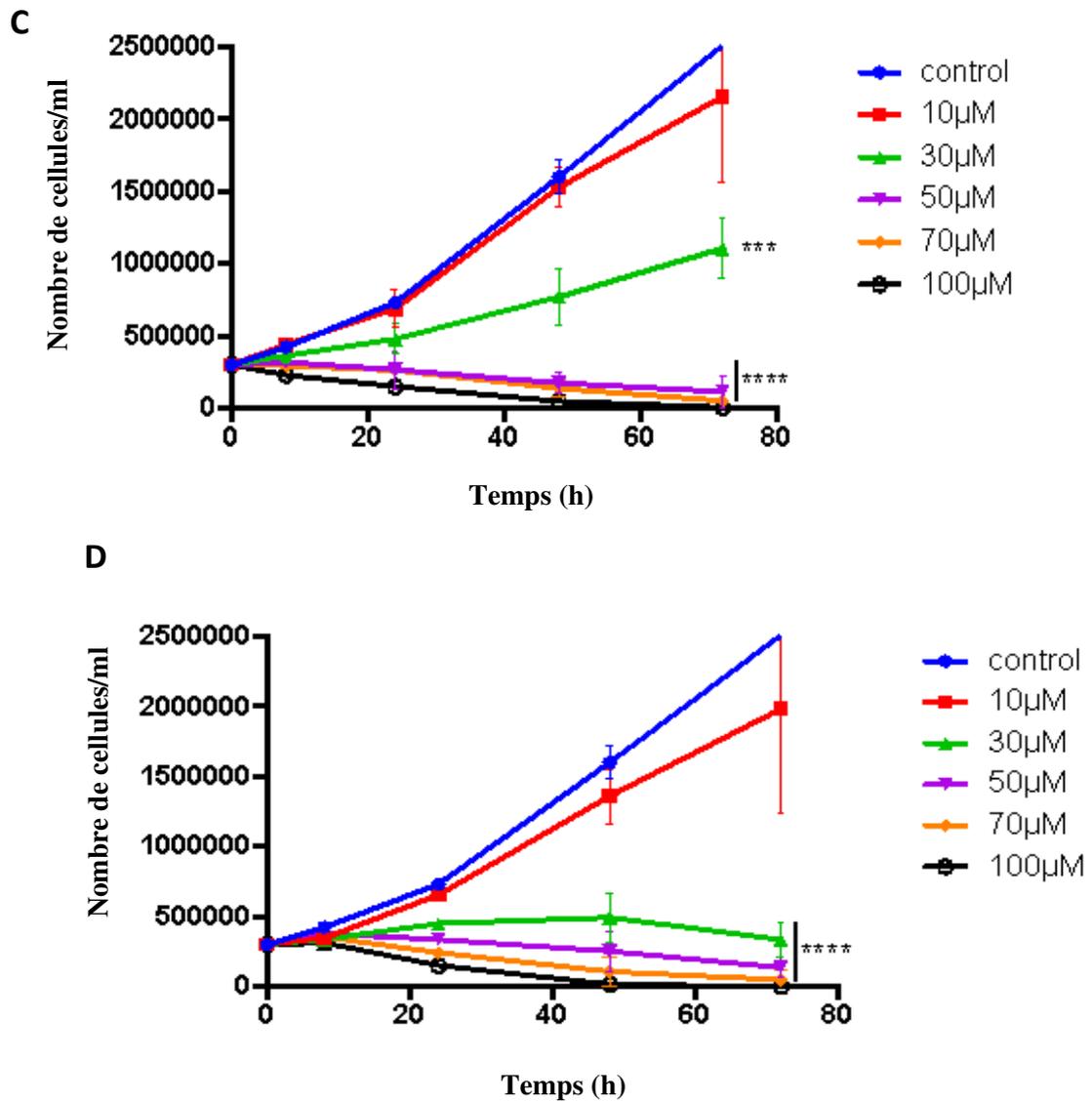
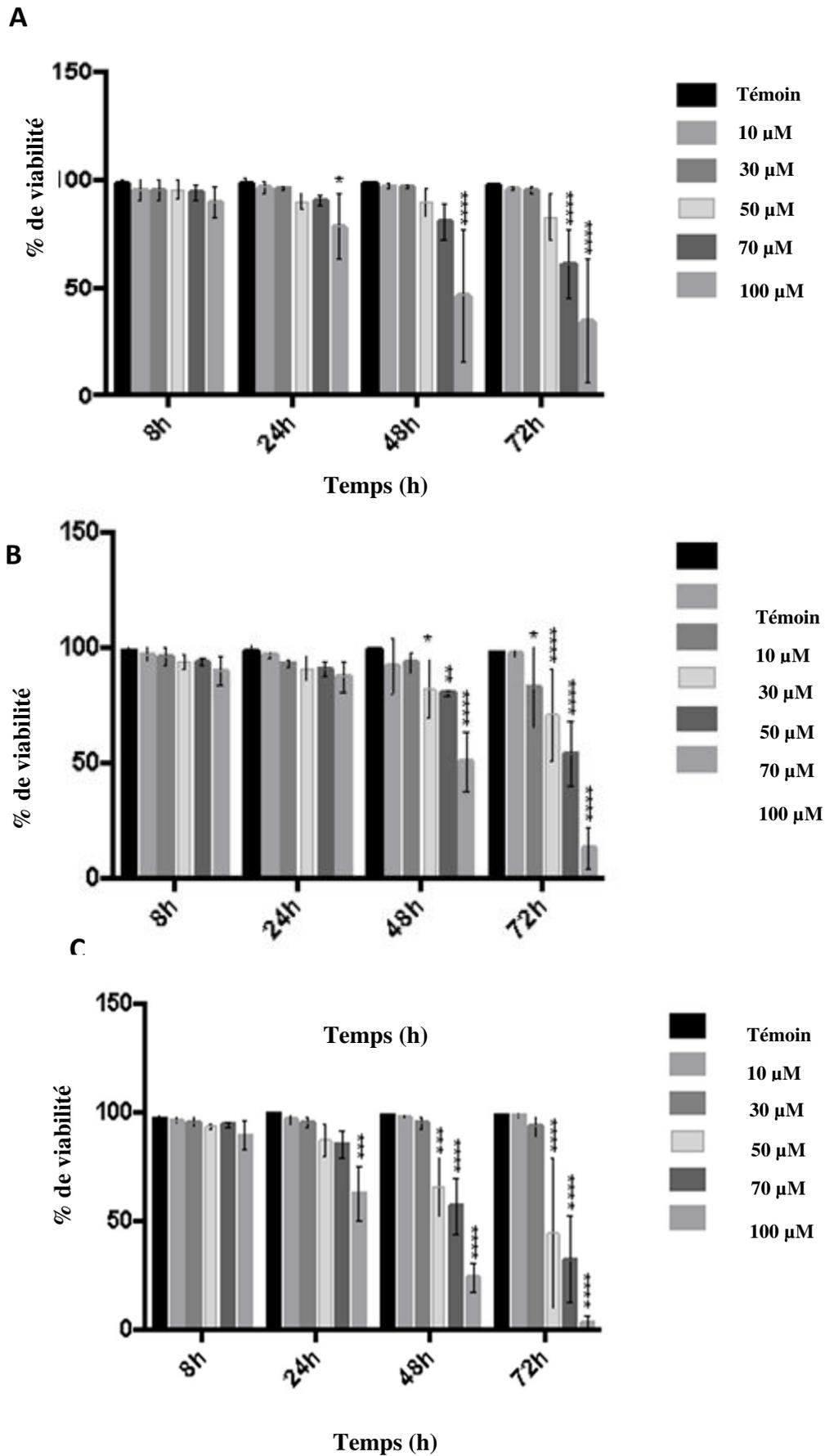


Figure 37: Effet des composés spiro 4-9 sur la prolifération cellulaire des cellules K562 (A et B) U937 (C et D) par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.



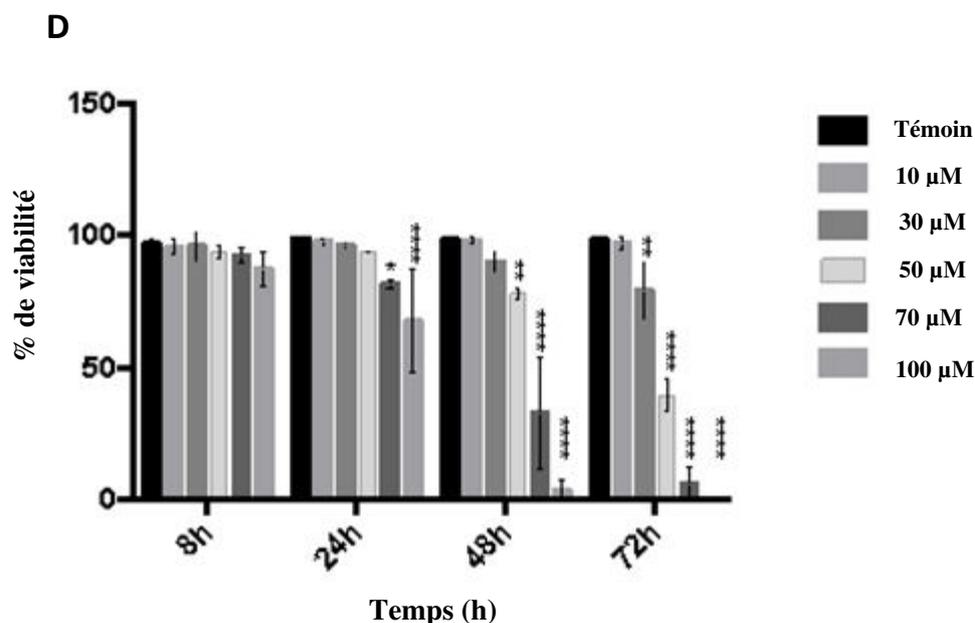


Figure 38: Effet des composés spiro 4-9 sur la viabilité des cellules K562 (A et B) et U937 (C et D) par comptage des cellules colorées par Bleu de Trypan. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -3- Effets du composé 4 et 9 sur l'activité de NF- κ B activé par le TNF α dans les cellules K562:

Une stimulation anormale de la voie de signalisation NF- κ B, comme elle est de coutume dans les cellules néoplasiques, conduisant à une transcription élevée de gènes anti-apoptotiques, procure aux cellules une résistance accrue envers une induction de mort cellulaire par apoptose ; nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique.

Les deux composés ont également été analysés pour leur effet envers l'activation de NF- κ B. Dans nos expériences, l'effet du composé 4 a eu un meilleur impact sur l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF- α que celui du composé 9.

Pour ce faire, nous nous sommes basés sur une modélisation d'un microenvironnement tumoral, à savoir une activation d'une durée de 6 h des cellules K562 par TNF α (20 ng/mL) ; un nombre important de tumeurs malignes se caractérise par une production constitutive de TNF α par le microenvironnement tumoral.

Afin d'évaluer le potentiel des composés 4 et 9 à réprimer une telle activation de la voie de signalisation NF- κ B, nous avons prétraité les cellules au préalable pendant 2 h avec différentes concentrations des composés 4 et 9 (de 10 à 100 μ M).

Brièvement : les cellules K562 ont été transfectées avec un plasmide portant un gène rapporteur luciférase, inductible et sous contrôle par NF-kB, et avec un plasmide *Renilla* servant comme référence comme nous l'avons décrit dans la partie Matériel et Méthodes.

Les cellules K562 ont été choisies pour leur résistance à l'électroporation.

24 h après transfection, les cellules transfectées ont été prétraitées par les composé 4 et 9 pendant 2 h avant d'être stimulées par TNF α (20 ng/mL) pendant 6 h.

Lors de cette expérience, nous avons pu confirmer que la présence de TNF α entraîne une forte activité promotrice de NF-kB (transcription accrue du gène luciférase) dans les cellules K562. Nous pouvons observer qu'une pré-incubation en présence du composé 4 à 10 μ M conduit déjà à une réduction de 57,98 % de l'activité NF-kB induite par TNF α . Cette régression de l'activité NF-kB s'accroît en augmentant la concentration du composé 4 : à 30 μ M, le composé 4 réduit de 73,47 % l'activité NF-kB induite par TNF α . Cette dernière est encore réduite de 79,12 %, de 89,24 % et de 91,52 % à des concentrations de 50 μ M, de 70 μ M et de 100 μ M du composé 4 respectivement (Figure 39).

Une pré-incubation en présence de 10 μ M du composé 9 réduit l'activité NF-kB induite par TNF α de 19,72 %. En augmentant la concentration du composé 9 à 30 μ M, à 50 μ M, à 70 μ M et à 100 μ M, la réduction de l'induction de NF-kB augmente respectivement à 21,77 %, 24,58 %, 35,58 %, et 49,92% (Figure 39).

Nous notons que, contrairement au composé 9, le composé 4 inhibe fortement l'activation de NF-kB induite par le TNF- α d'une manière dose-dépendante avec une IC₅₀ de $15,9 \pm 4,0$ μ M dans les cellules K-562 (Figure 39).

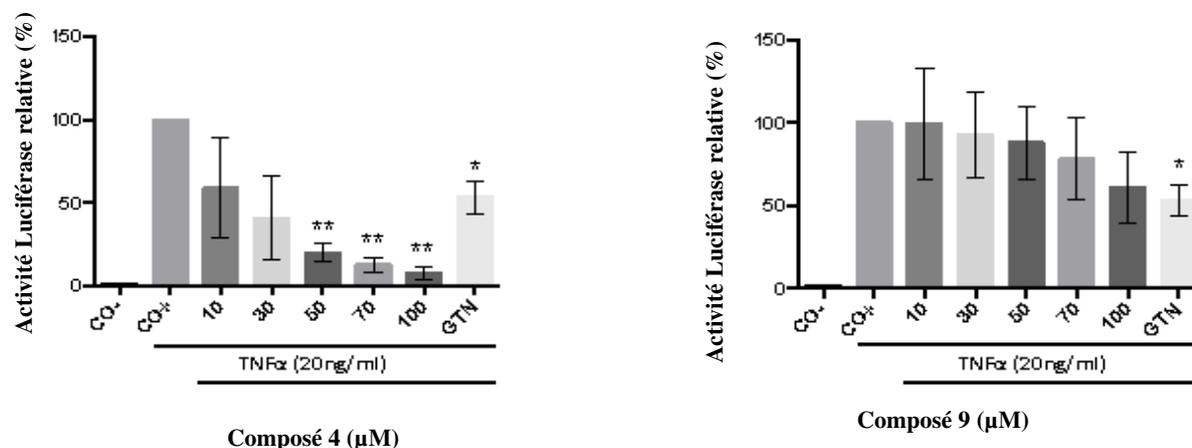


Figure 39: Effets des composés 4 et 9 sur l'activation de NF- κ B par TNF α chez les cellules K562. Le contrôle négatif (Co⁻) correspond aux cellules traitées avec le solvant. Le contrôle positif (Co⁺) correspond aux cellules traitées avec le solvant et activées par TNF α . Le Goniothalamine (GNT) à 7 μ M a été utilisé comme un contrôle inhibiteur positif.

Cette valeur est comprise entre les valeurs IC₅₀ précédemment rapportées par notre laboratoire pour divers composés étudiés pour leur effet d'inhiber l'activation de NF- κ B induite par le TNF- α dans les cellules K562 et U937, utilisant les mêmes conditions expérimentales [191,192].

Cette activité du composé 4 n'est pas surprenante. En effet, on retrouve dans la bibliographie quelques composés spiro qui présentent un potentiel d'inhibition de l'activité NF- κ B. Un dérivé spiro-isoxazolidine **10b**'' par exemple, montre une inhibition de l'activité de NF- κ B dépendante de la dose et du temps. Il inhibe également la prolifération des cellules PC-3 [193].

Un autre dérivé spirocyclique montrant un impact sur l'activation de NF- κ B est le composé 2t, un dérivé de la parthénine. Ce composé semble inhiber la phosphorylation et la dégradation de I κ B α et ainsi empêcher une translocation de p65 dans le noyau [194]. Un composé spirocétal provenant d'un extrait d'acétate d'éthyle de la plante *Plagiopus flosculosus* (L.), été capable d'inhiber la phosphorylation et la dégradation du protéasome de I κ B et ainsi empêcher la translocation nucléaire et la liaison ADN de NF- κ B [195].

Il est aujourd'hui largement établi que le facteur de transcription NF- κ B constitue un facteur anti-apoptotique majeur [196,197]. Alors qu'à présent les composés 4 et 9 n'ont

jamais été utilisés pour leurs effet envers la répression de l'activité transcriptionnelle de NF-kB, nous confirmons par nos résultats qu'une désactivation de la voie de signalisation NF-kB essentiellement par le composé 4 existe au sein de cellules leucémiques humaines.

En se basant sur les précédentes études [186,199], on peut émettre l'hypothèse que l'inhibition de la voie NF-kB par le composé 4 peut être responsable de l'induction de la mort cellulaire apoptotique des cellules K562, dans la mesure où les concentrations nécessaires à l'inhibition de NF-kB étaient plus faibles et /ou induisent une inhibition plus tôt rapport aux concentrations cytotoxiques.

L'inhibition de la voie de signalisation NF-kB par le composé 4 est un résultat extrêmement important : mis à part une expression constitutive de NF-kB fréquente dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses contribuant à une résistance envers des agents thérapeutiques anticancéreux et une agressivité accrue [200-202], il est de nos jours largement établi qu'une sécrétion de TNF α par le microenvironnement tumoral est une caractéristique typique de nombreuses tumeurs malignes ; dans ce contexte, TNF α agit en tant que modulateur de l'activation de processus inflammatoires et d'oncogénèse [203,204].

Par une liaison à des récepteurs situés à la surface de cellules épithéliales et stromales, TNF α peut, soit influencer directement la prolifération et la survie de cellules malignes, soit induire indirectement une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires générales comme TNF α lui-même, IL-1, IL-6 et IL-8 par les cellules stromales voisines, par les macrophages, par les cellules dendritiques et par les fibroblastes [205]. Comme cela crée une situation propice à des aberrations génétiques et à une survie et une prolifération accrues de cellules tumorales, une répression par le composé 4 de la voie de signalisation NF-kB, TNF α -induite en l'occurrence, constitue un excellent potentiel anticancéreux

IV -4- L'effet du composé 4 sur l'induction de l'apoptose caspase-dépendante dans les cellules K562 et U937:

Parce que les protéines de la famille des caspases sont des médiateurs clés dans la voie classique de l'apoptose, la détection de leur activité protéolytique fournit un test utile pour l'analyse des événements biochimiques précoces associés à l'apoptose in vivo et in vitro. Les précédentes études ont déjà démontré que la mesure de l'activité de la caspase-3/7 à l'aide de Z-DEVD-aminoluciférine dans un test bioluminescent est une approche extrêmement sensible et fiable pour mesurer l'apoptose in vitro et aussi in vivo [206-209].

Etant donné que nos précédents résultats ont montré que le composé 4 et 9 régulaient la prolifération et la viabilité des cellules K562 et U937 et que l'activité de NF- κ B était régulée essentiellement par le composé 4, nous avons décidé de chercher à comprendre le mécanisme de la mort cellulaire avec le composé 4. L'activité caspase 3/7 a été mesurée dans les lignées cellulaires K562 et U937 après avoir été traitées avec le composé 4 aux concentrations suivantes : 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 70 μ M et 100 μ M pendant 24 heures.

L'activité des caspases 3/7 est multipliée de 1,28 à 4,25 fois après traitement des cellules U937 avec le composé 4 de 10 μ M à 100 μ M respectivement, cependant l'activité des caspases 3/7 est multipliée jusqu'à 3,58 fois après traitement des cellules K562 avec le composé 4 à 100 μ M respectivement (Figure 40). Afin de déterminer l'implication des mécanismes apoptotiques caspase-dépendant, les cellules ont été pré-traitées avec 50 μ M d'inhibiteur pan-caspase (Z-vad) [210] pendant 1 h. Dans ces conditions, l'induction de l'activité caspase 3/7 médiée par le composé 4 a été complètement abrogée.

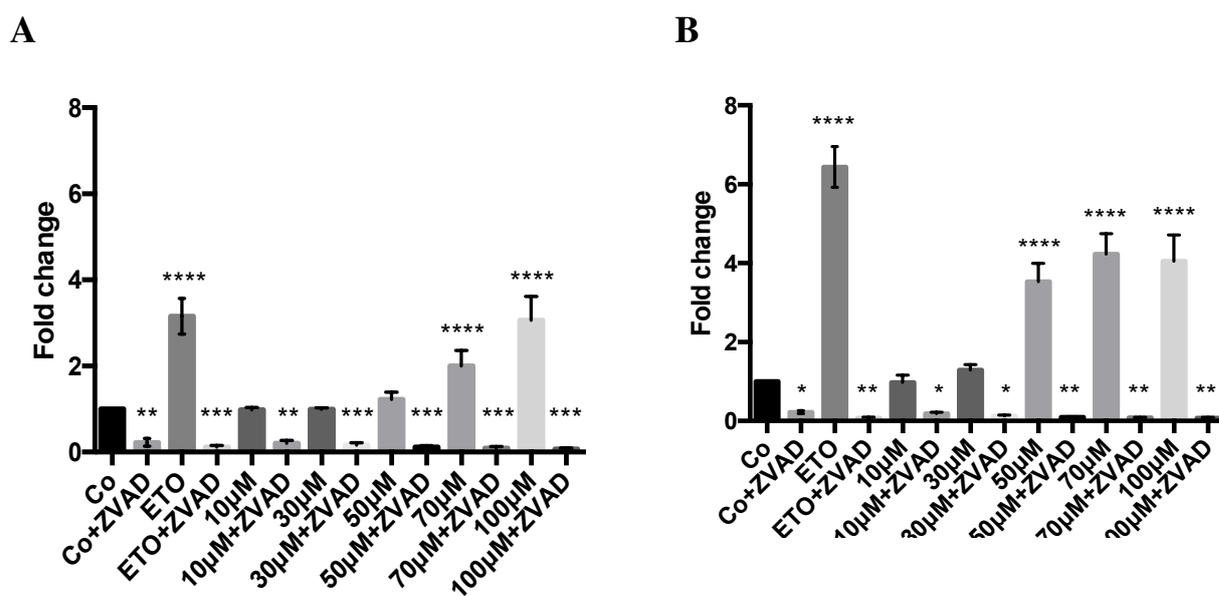


Figure 40: Induction de l'activité caspase 3/7 par le composé 4 dans les lignées cellulaires leucémiques. Cellules K562 (A) et U937 (B) ont été pré-traitées ou non avec Z-vad à 50 μ M pendant 1 h, suivie par l'addition du composé 4 aux concentrations indiquées pendant 24 h.

Plusieurs études antérieures ont rapporté que les composés spiro sont induisent la mort cellulaire de lignées cancéreuses humaines par apoptose en activant les protéines caspase. En effet, des dérivés spiroisoxazoline oxindoles ont montré un effet anti-prolifératif envers les

lignées cellulaires humaines de carcinome hépatocellulaire (HepG2). Il se trouve que ces dérivés étaient capables d'induire la mort cellulaire par apoptose en activant la protéine caspase 3 [211]. Une autre étude a montré que des dérivés spirocycliques : Spiro-bis hétérocycles inhibent la prolifération des lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7 and MDA-MB231) en induisant la mort cellulaire par apoptose caspase dépendante [212].

L'induction de l'apoptose s'est produite d'une manière dépendante de la caspase, révélée par l'utilisation de z-VAD qui empêche fortement toute activité pro-apoptogène par le composé 4. Les résultats montrent que le composé 4 induit l'activité caspase 3/7 d'une manière dépendante du temps et de la dose dans les deux lignées cellulaires avec un effet plus prononcé dans les cellules U937 (Figure 41).

IV -5- Effet des dérivés coumariniques et chromones sur l'impédance en fonction du temps sur les lignées cellulaires adhérentes :

Pour cette étude, une série de neuf analogues chromones et coumarines (tableau 5) ont été évalués pour leur activité cytotoxique envers un panel de lignées cellulaires humaines et murines a été testée. L'ensemble des lignées cellulaires comprend MCF-7 (adénocarcinome mammaire humain), HCT-116 (carcinome du côlon humain), HEK-293t (cellules embryonnaires humaines 293), HepG2 (cancer du foie humain), B16 (mélanome murin 4A5), Caco. -2 (adénocarcinome colorectal humain) et A549 (carcinome pulmonaire humain).

Détermination de la fréquence d'impédance optimale :

Pour déterminer la fréquence d'impédance optimale pour l'observation du comportement cytotoxique, l'écart-type relatif du spectre complet a été étudié pendant 24 heures, exposant une culture de cellules HepG2 au composé pro-apoptotique Gossypol, comme indiqué dans (Figure 41). Ici, on peut déterminer que le comportement cytotoxique, induit par le gossypol, a une influence maximale sur $|Z|$ à 20 kHz. Par conséquent, cette fréquence a été sélectionnée pour effectuer une surveillance plus poussée du comportement induit par les dérivés de chromone et de coumarine.

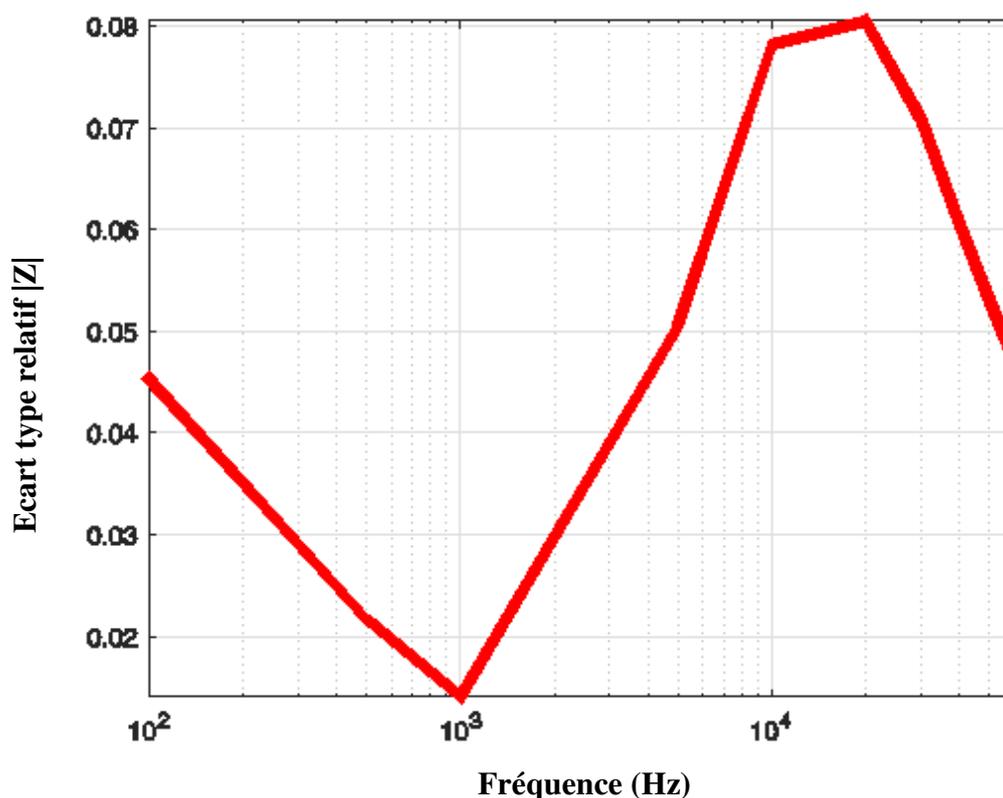


Figure 41 : Ecart-type relatif de $|Z|$ pendant 24 heures après l'ajout de Gossypol à une culture de cellules HepG2.

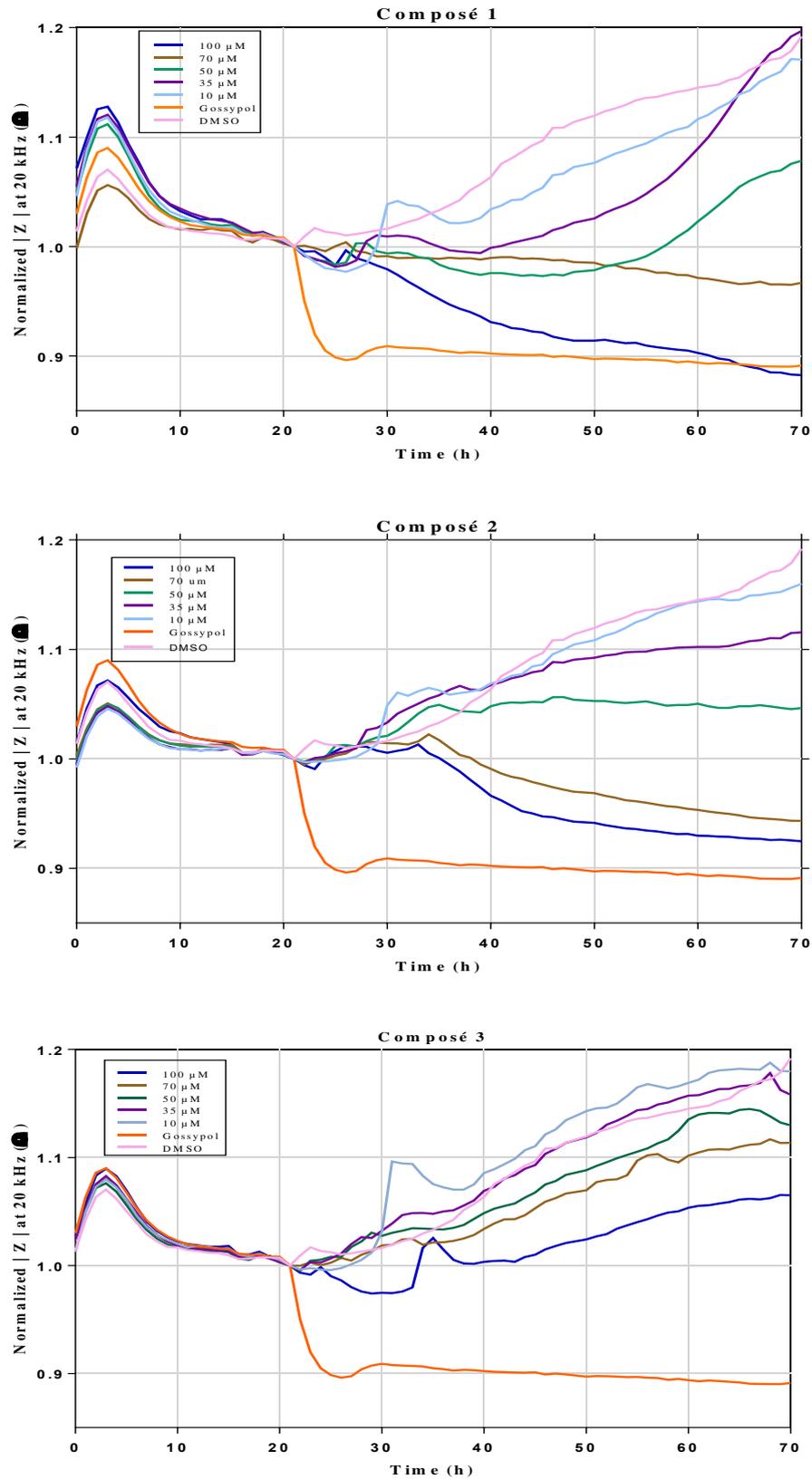
Les composés 1-9 affectent la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses:

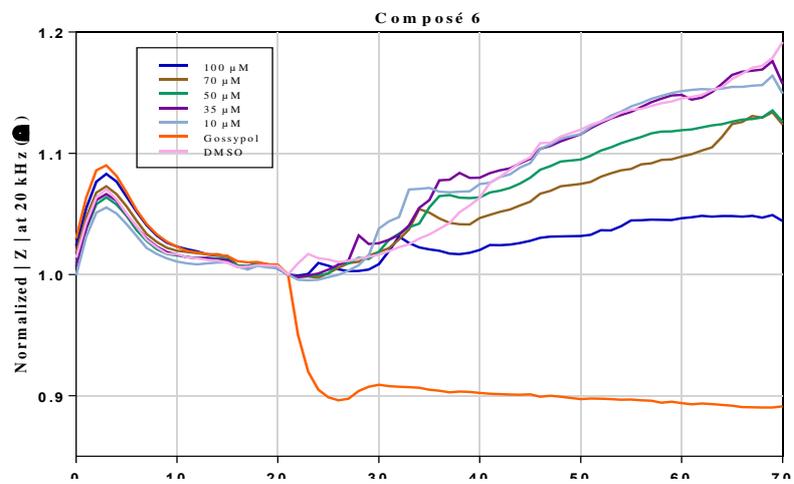
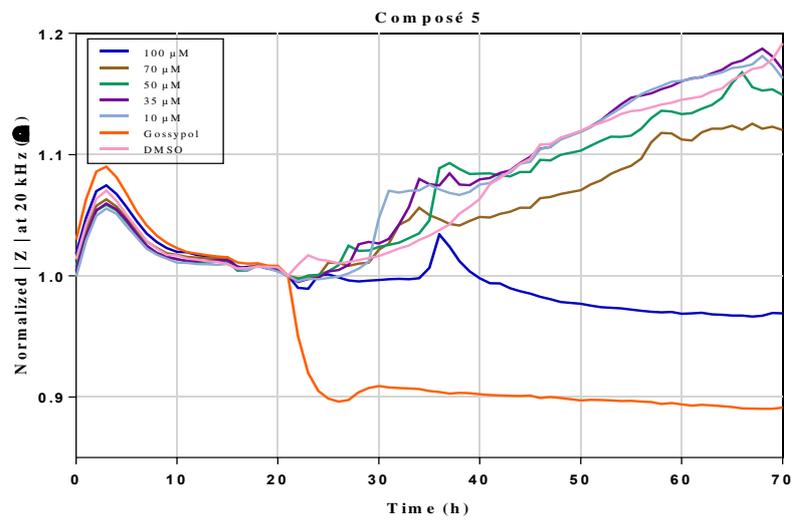
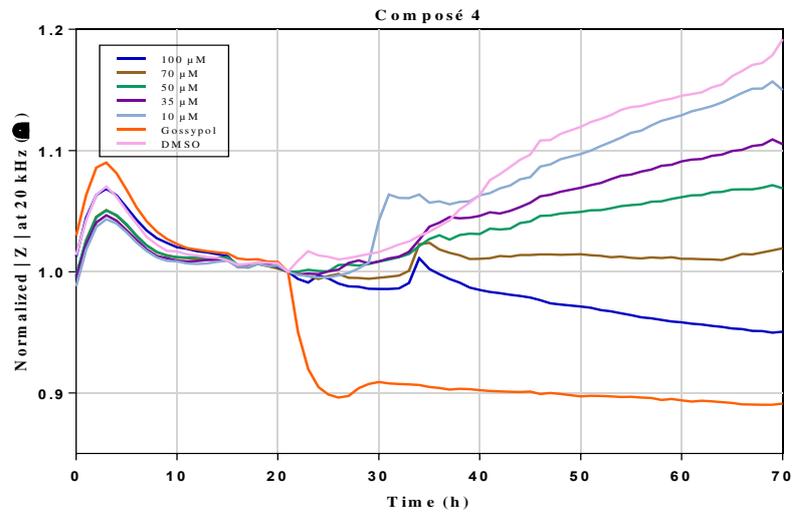
Les cellules ont été traitées avec cinq concentrations différentes des composés 1-9: 10 μM , 35 μM , 50 μM , 70 μM et 100 μM pendant 24 heures, à l'exception de la lignée cellulaire HCT-116 qui a été traitée pendant 48 heures. Le composé pro-apoptotique gossypol [213-215] a servi de témoin positif (Figure 42-48). Dans cette étude, nous avons obtenu 63 figures montrant l'évolution de l'impédance pendant 24 heures (pendant 48 heures concernant la lignée cellulaire HCT-116) à différentes concentrations des composés étudiés (Figure 43-49).

Les composés 2, 8 et 9 ont montré le potentiel le plus intéressant pour inhiber la prolifération des cellules MCF-7, HCT-116, HepG2 et B16 parmi le groupe de molécules testées. Comme prévu, ces composés ont exercé une inhibition dose-dépendante de la prolifération cellulaire sur les lignées cellulaires testées et $|Z|$ diminue considérablement à partir d'une concentration de 70 μM après 10-15 heures de traitement et dans les 6-8 heures

après le traitement à partir d'une concentration de 100 μM . (Figure 42-48). Les cellules MCF-7 et HCT-116 étaient plus sensibles au traitement, alors qu'il n'y avait pratiquement aucun effet sur les lignées cellulaires non cancérigènes A549 et CaCo2 (Figure 43-49). L'impédance est directement corrélée avec la viabilité cellulaire.

IV -5- 1- HCT-116:





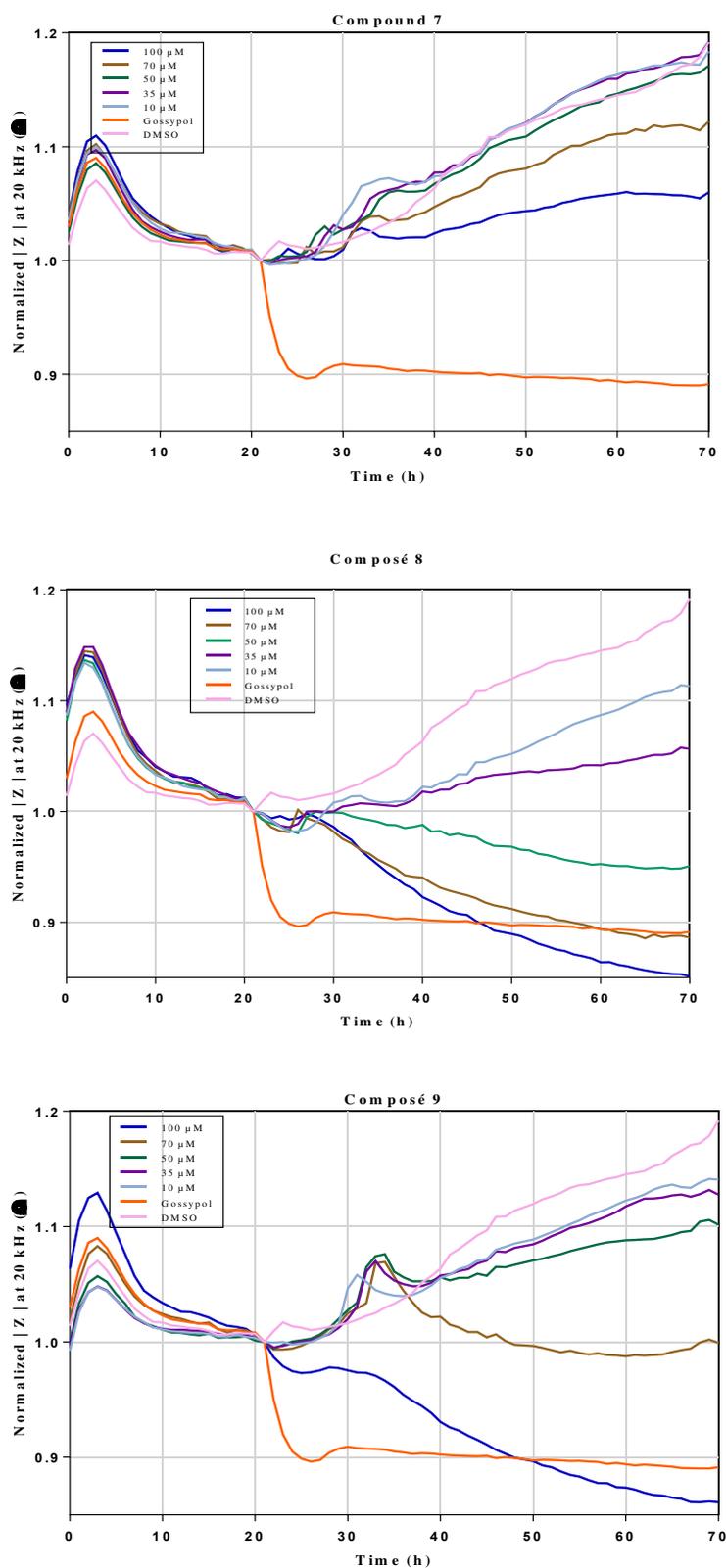
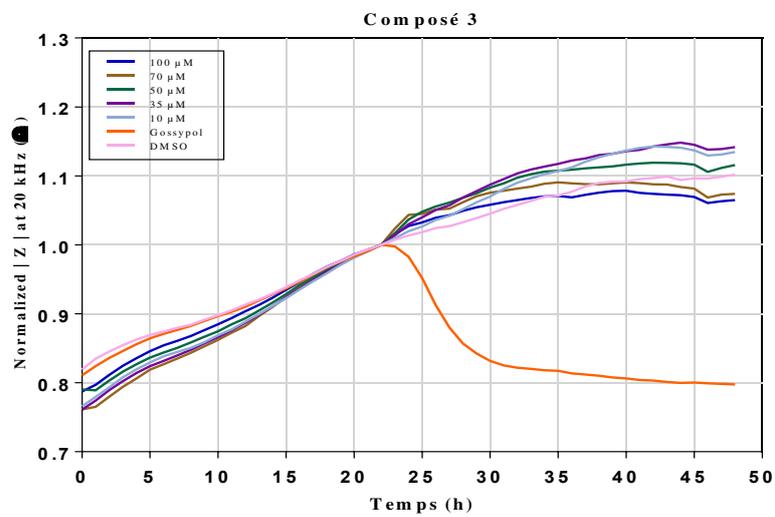
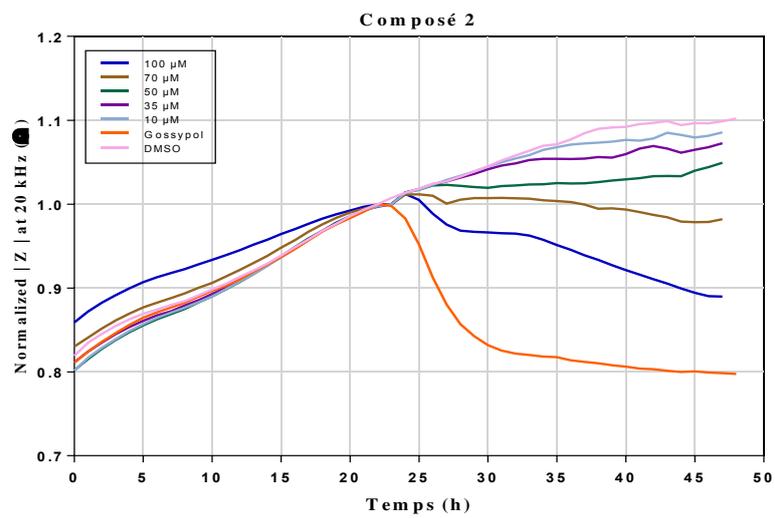
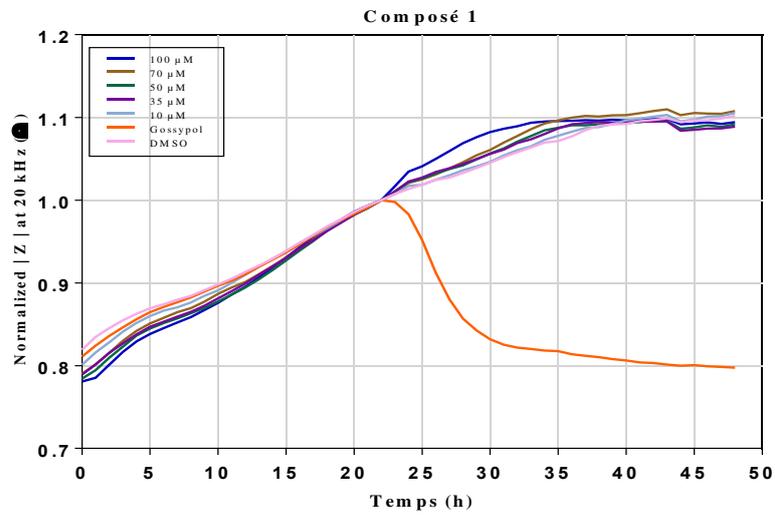
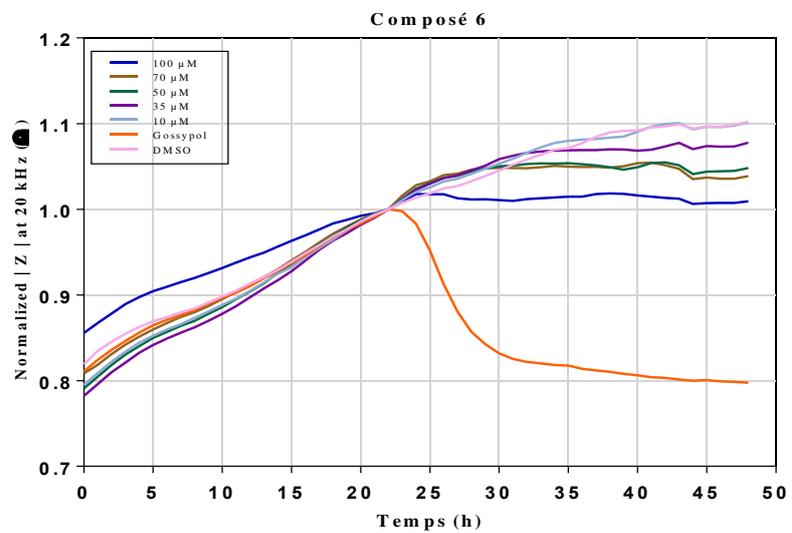
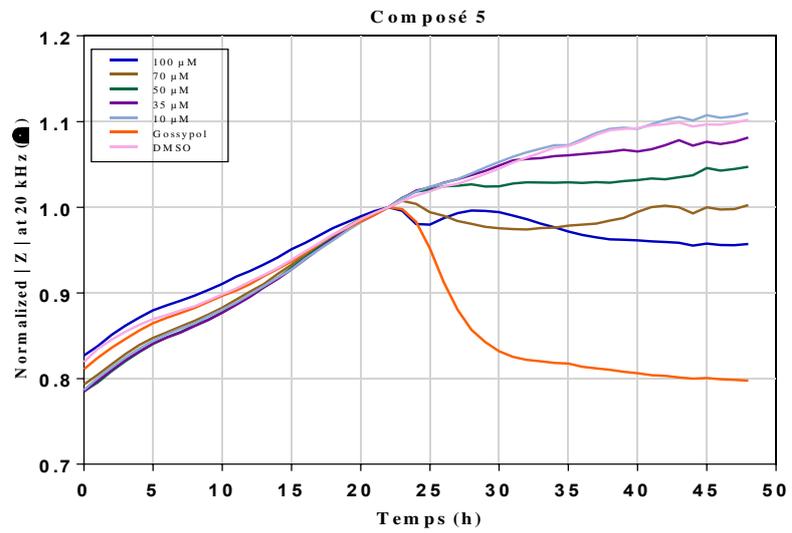
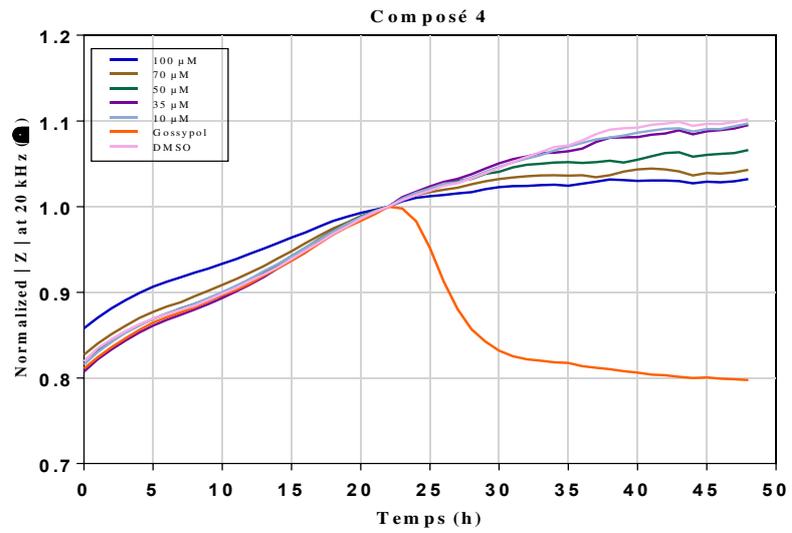


Figure 42: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules HTC-116. . Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -5- 2- HepG2:





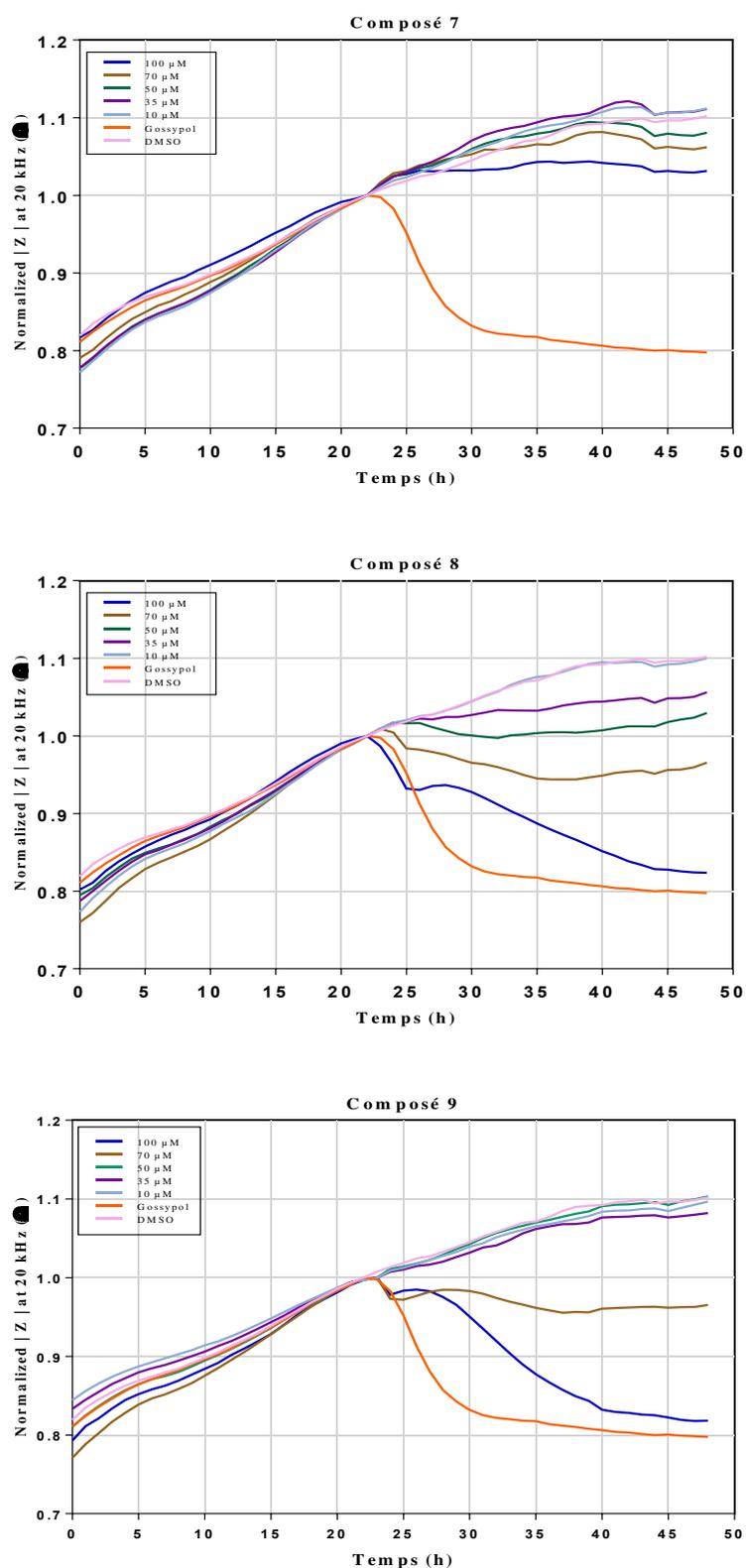
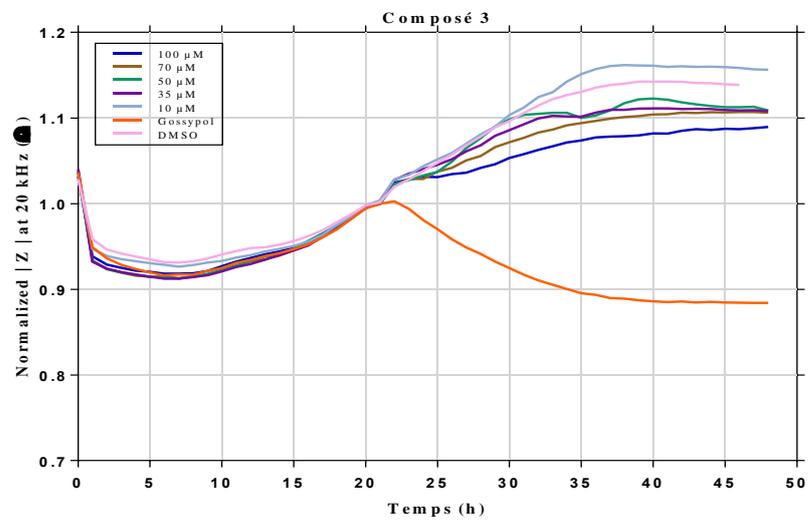
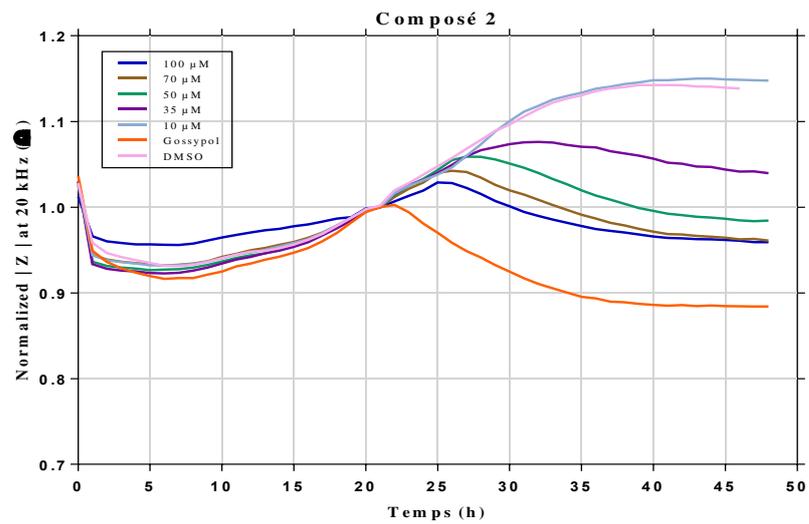
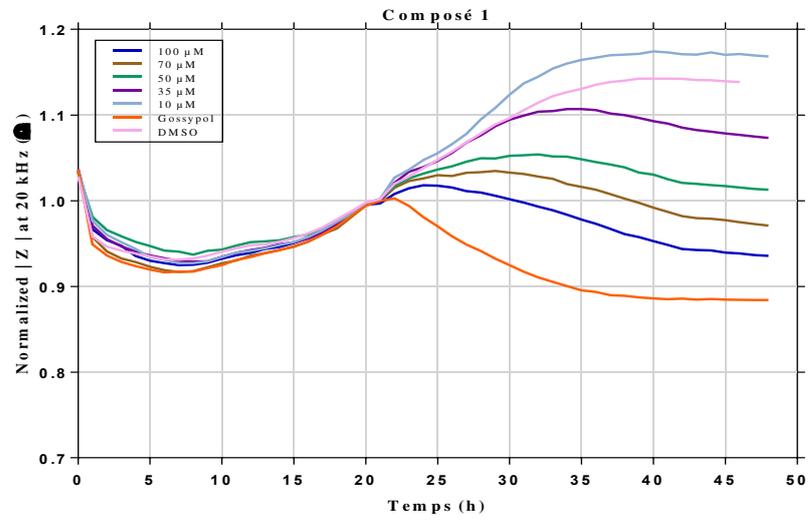
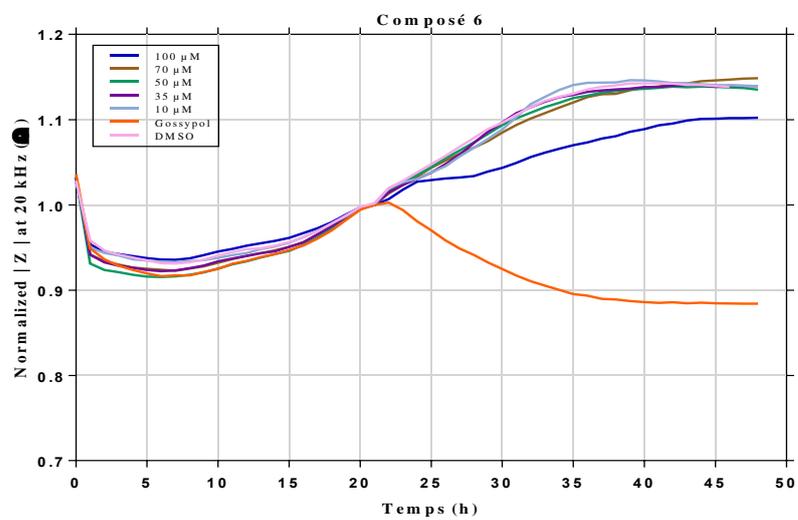
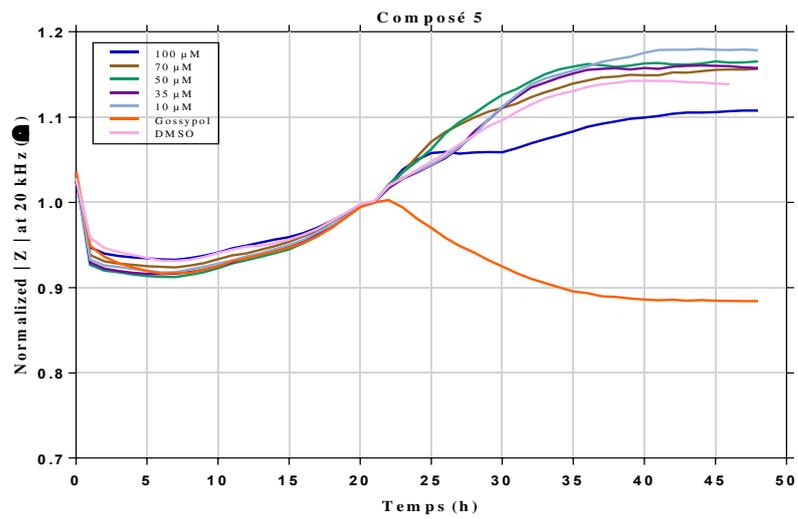
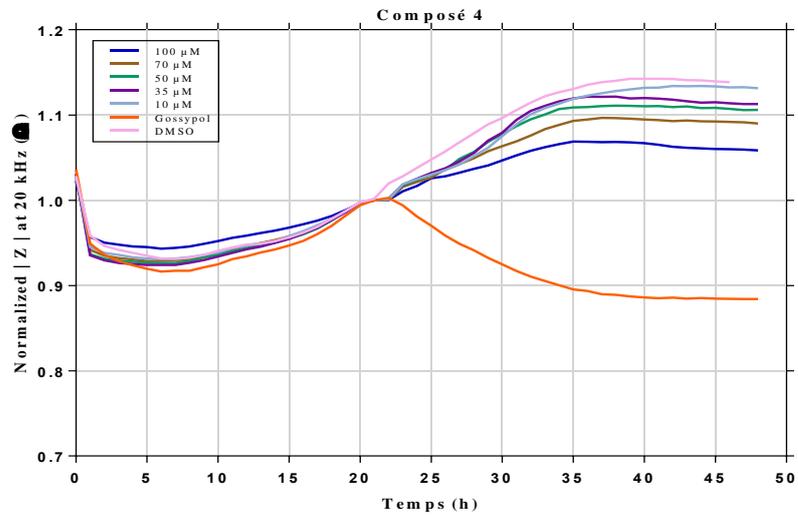


Figure 43: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules HepG2. . Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -5- 3- HEK293t :





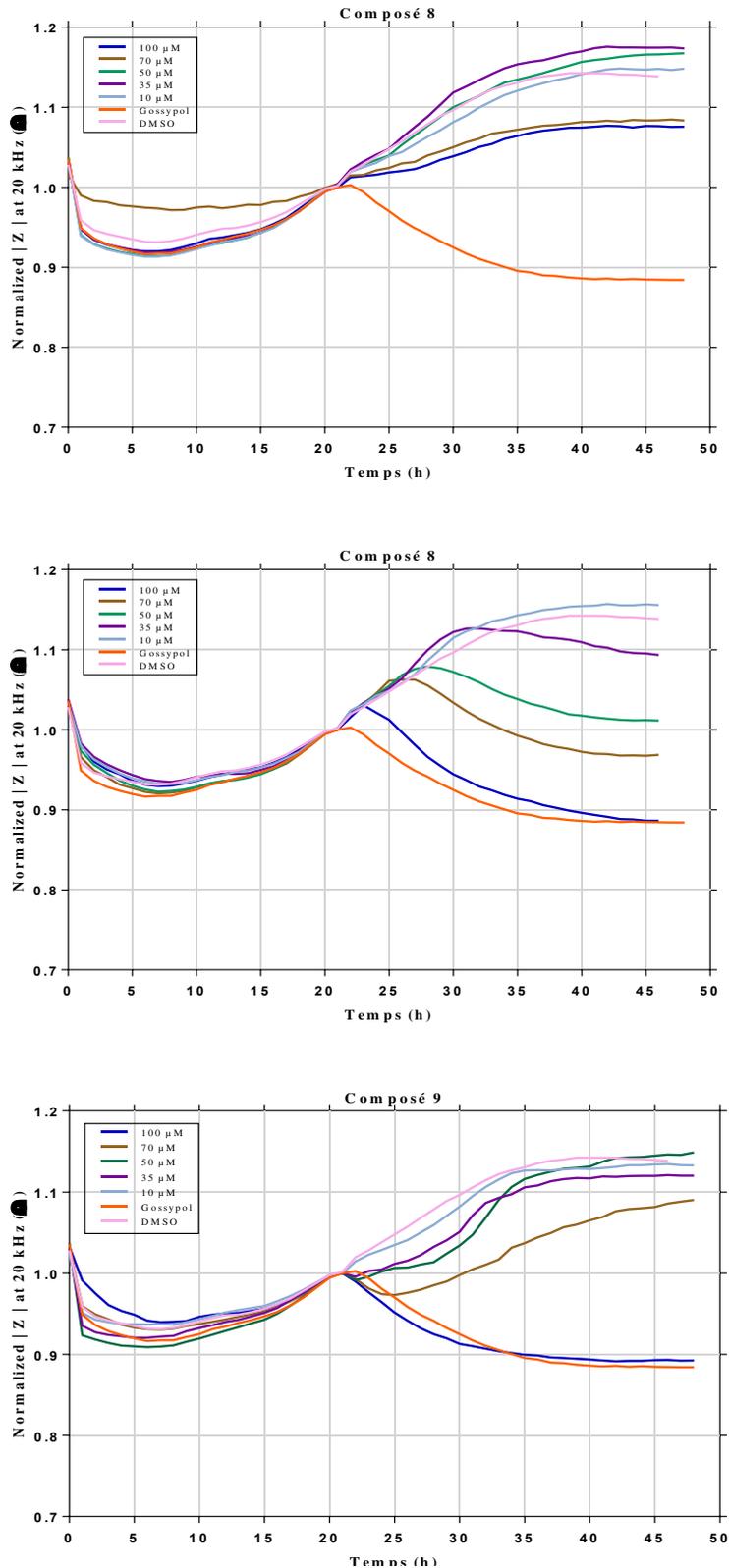
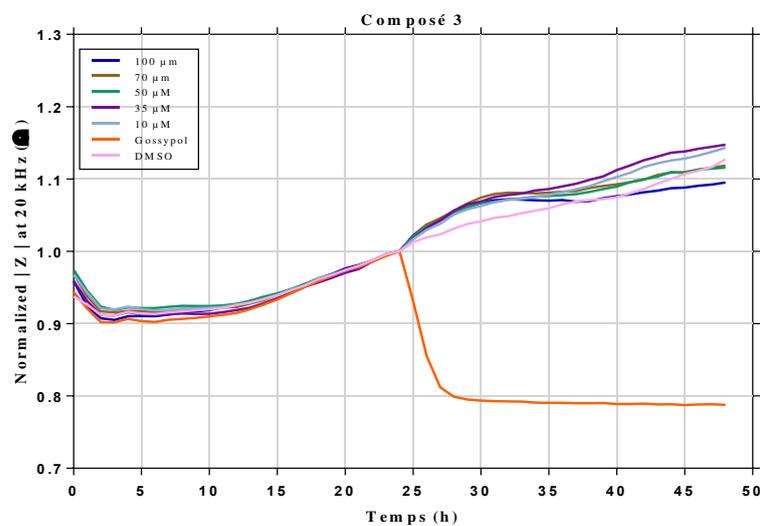
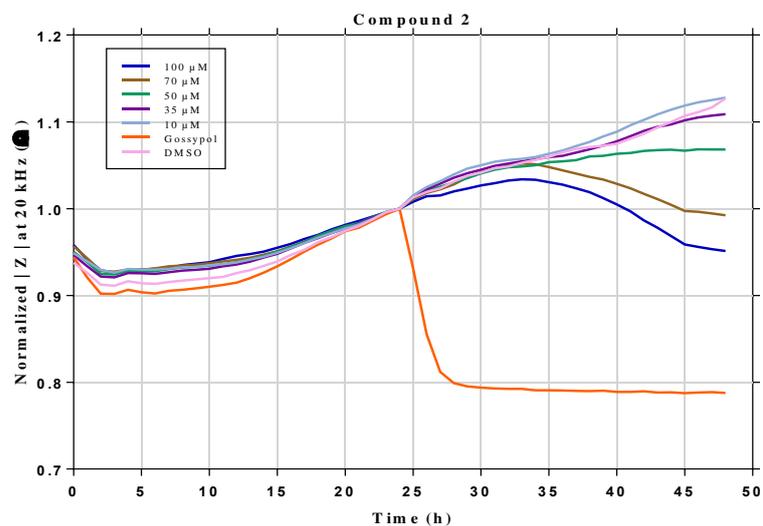
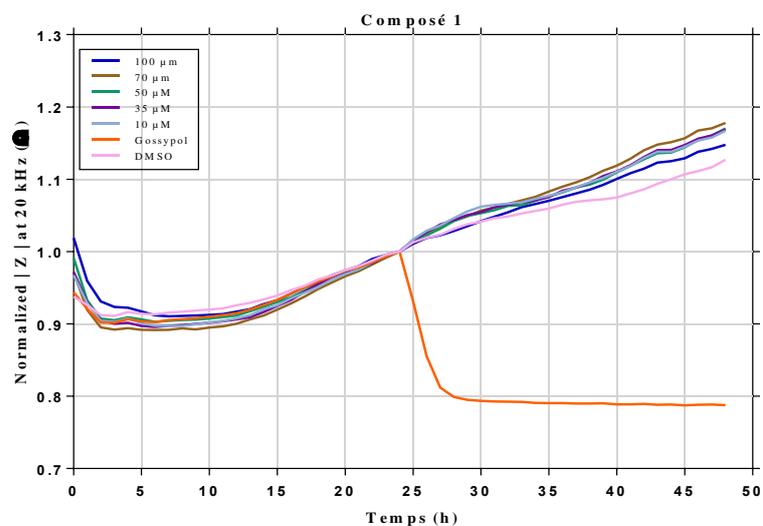
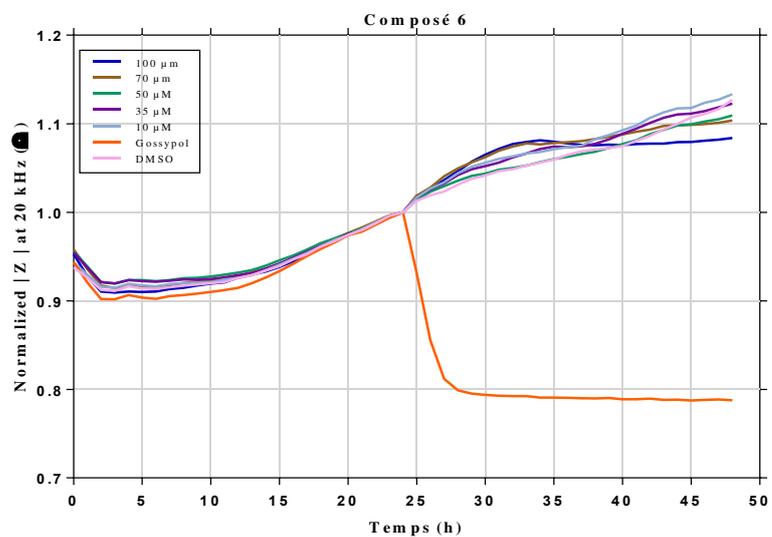
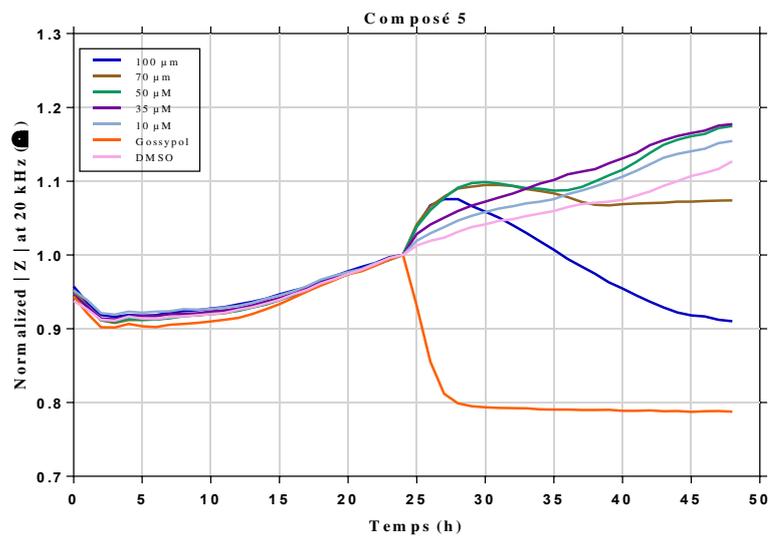
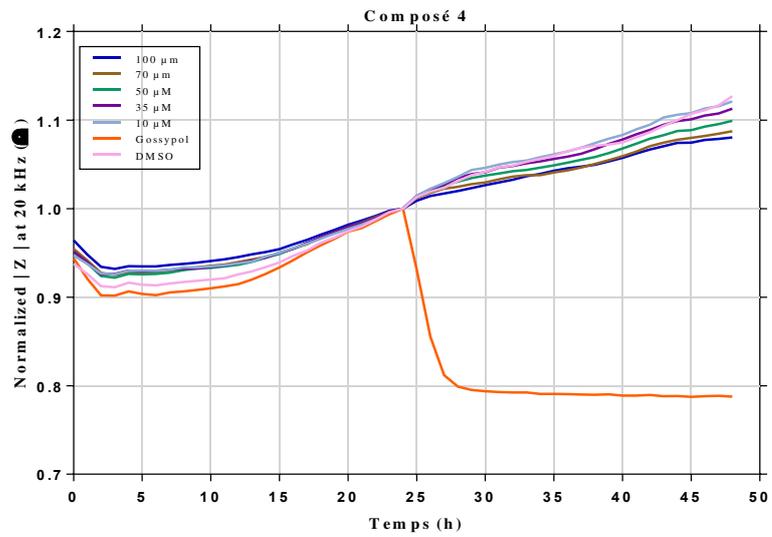


Figure 44: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules Hek293t. . Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -5- 4- B 16 :





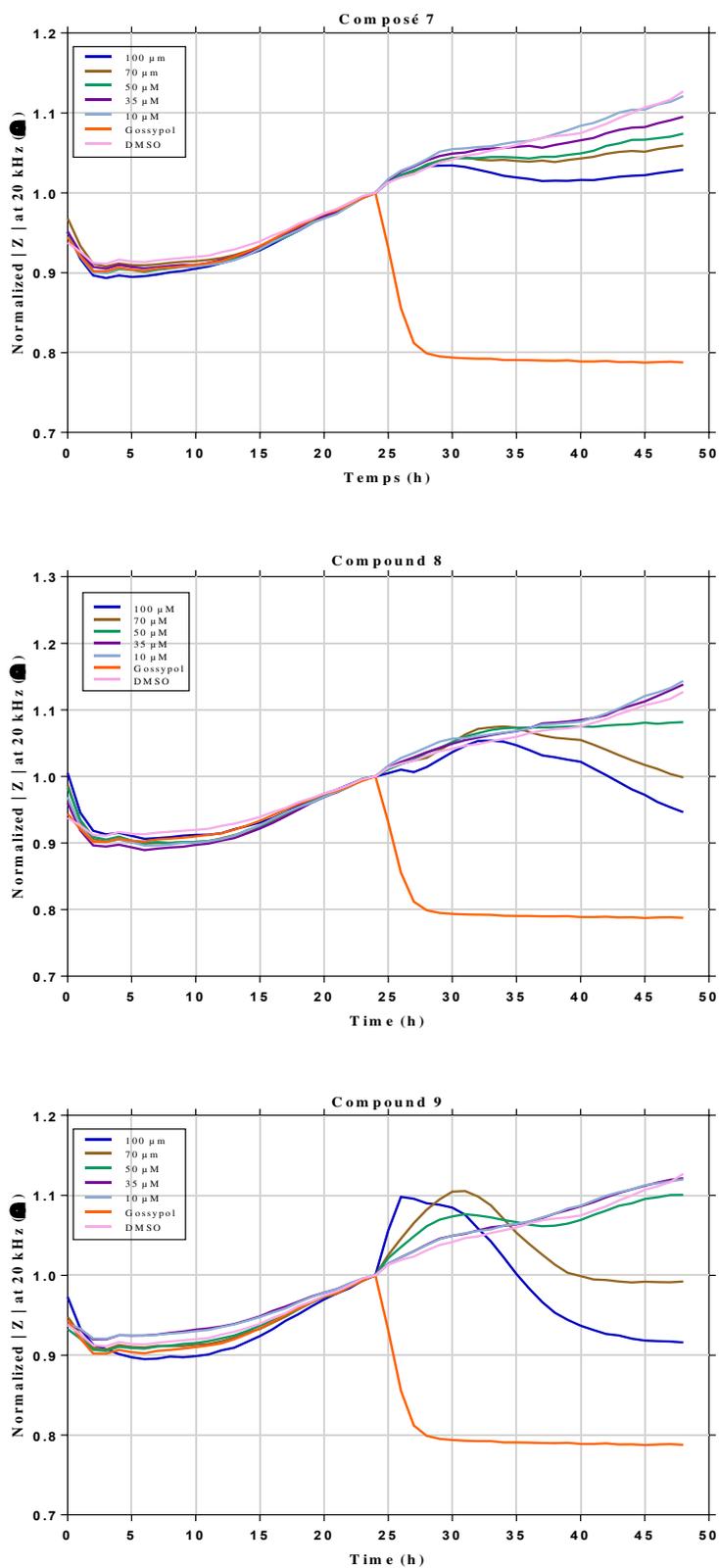
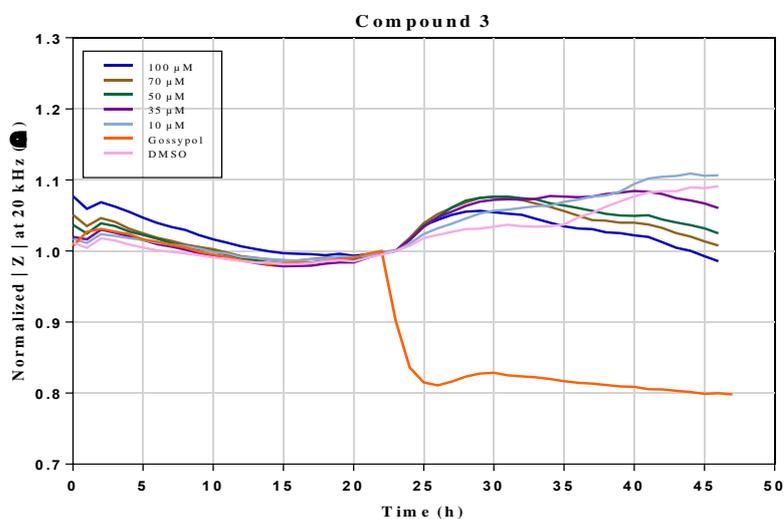
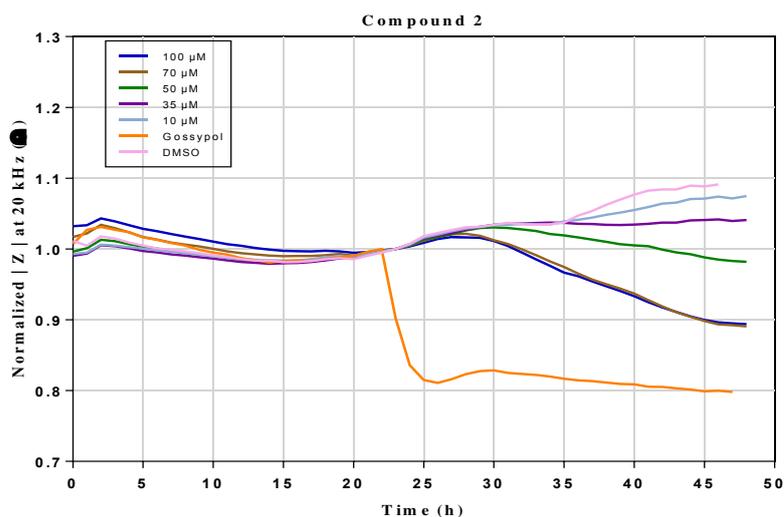
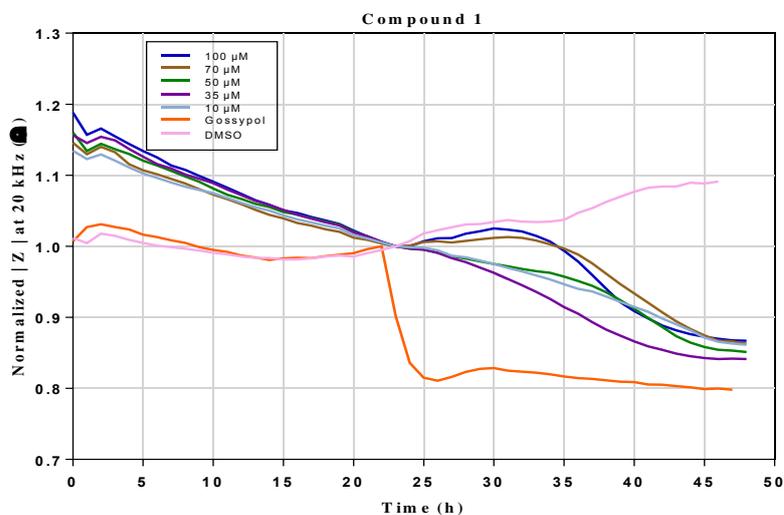
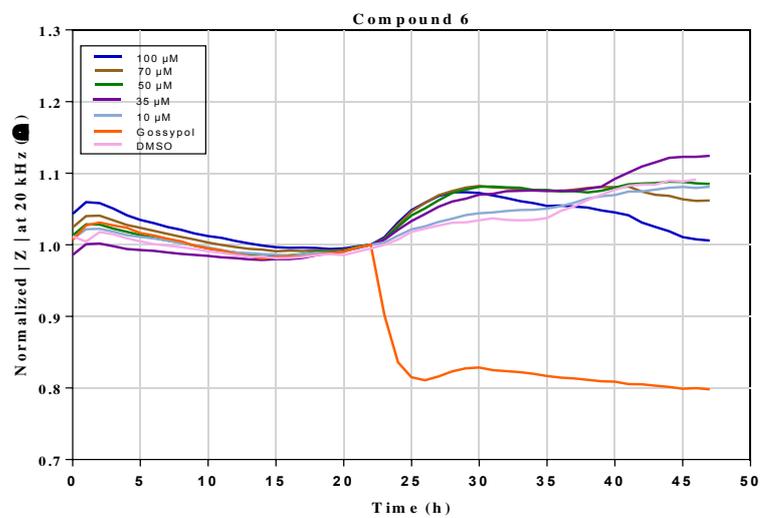
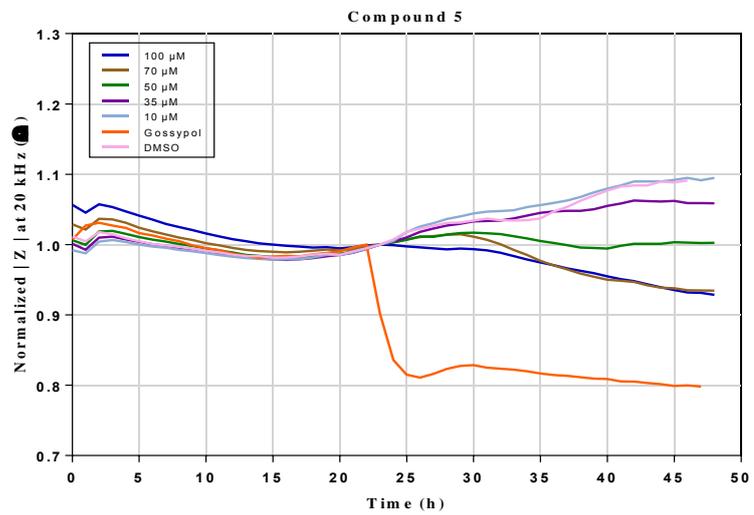
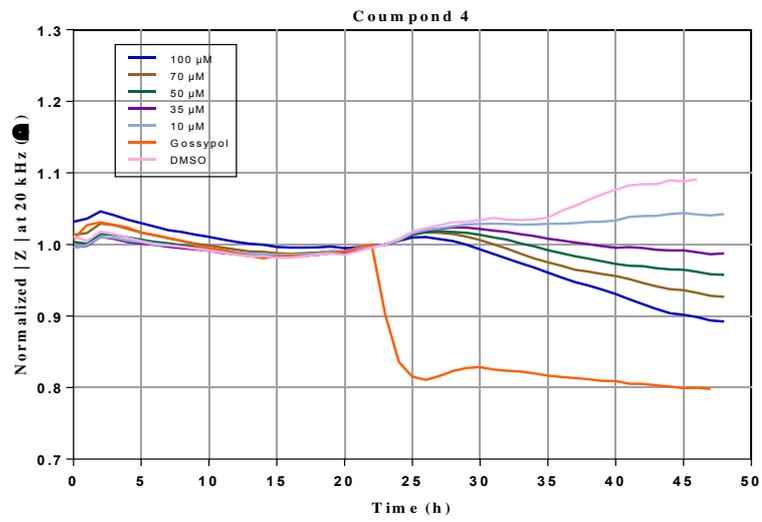


Figure 45: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules B16. . Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -5- 5- MCF-7 :





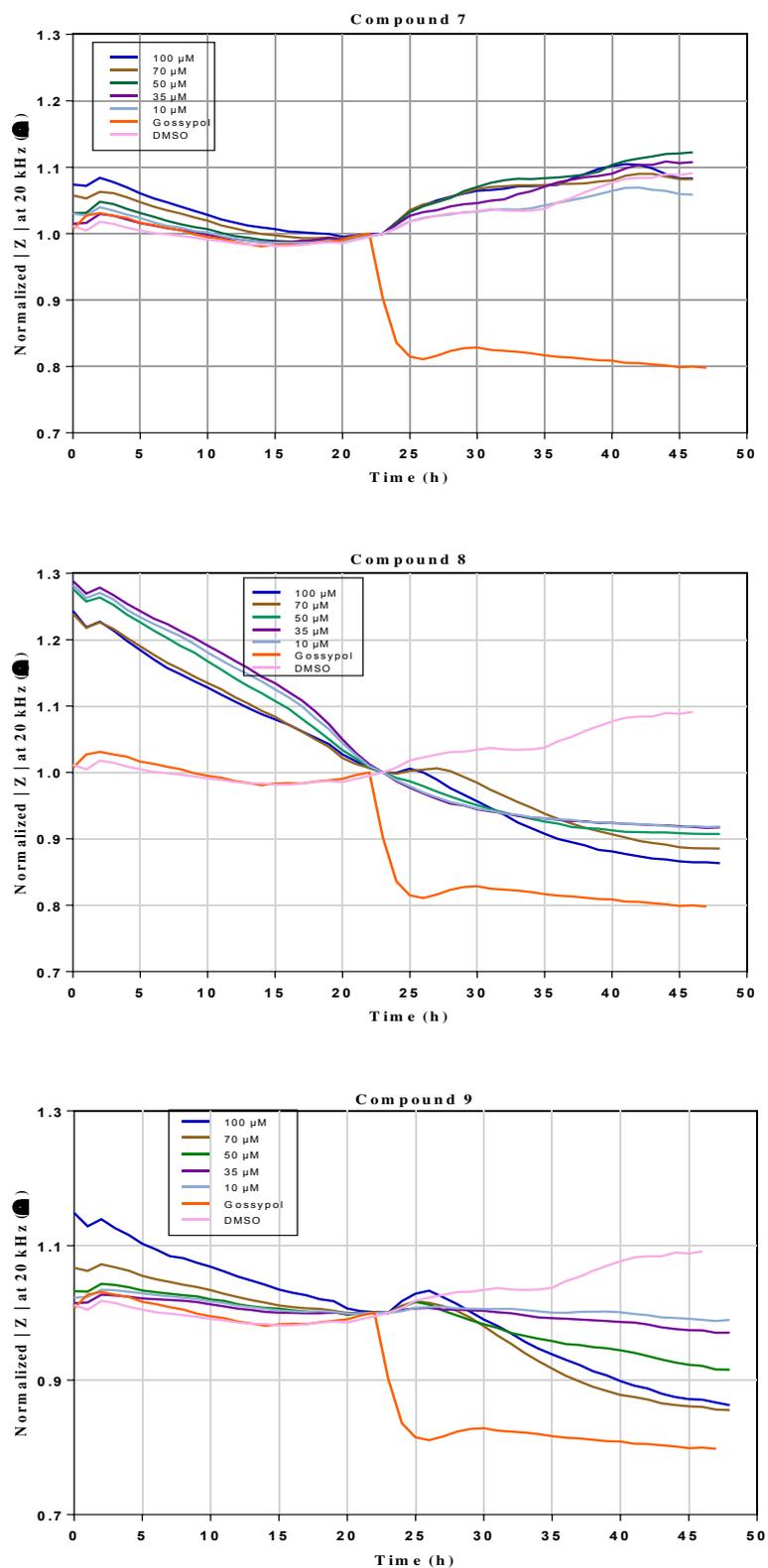
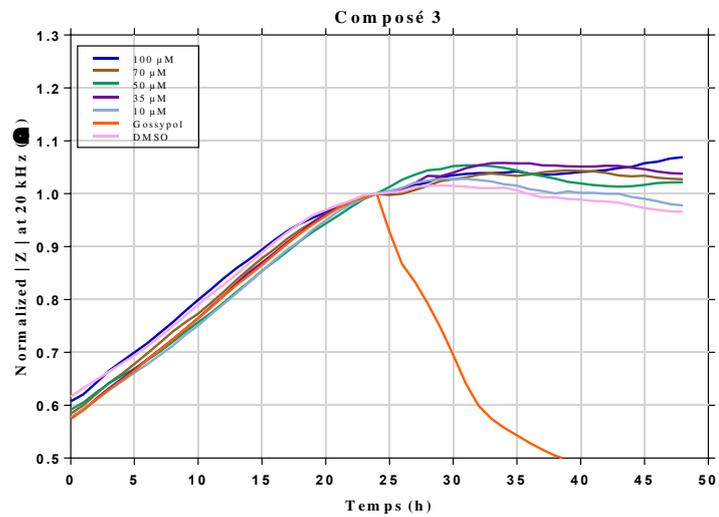
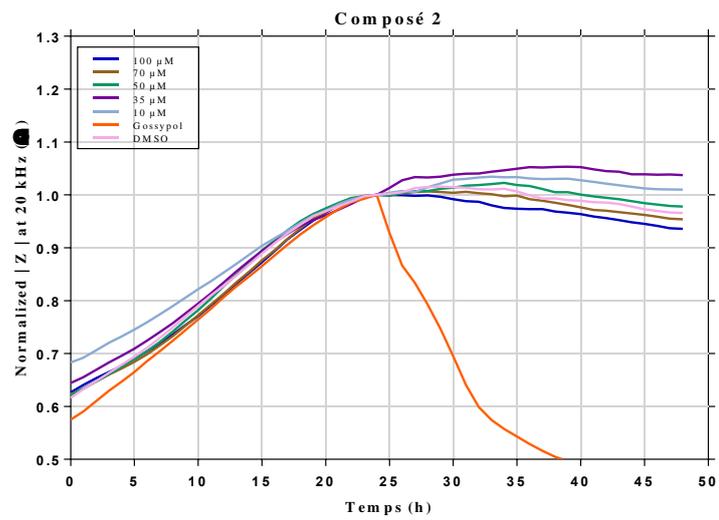
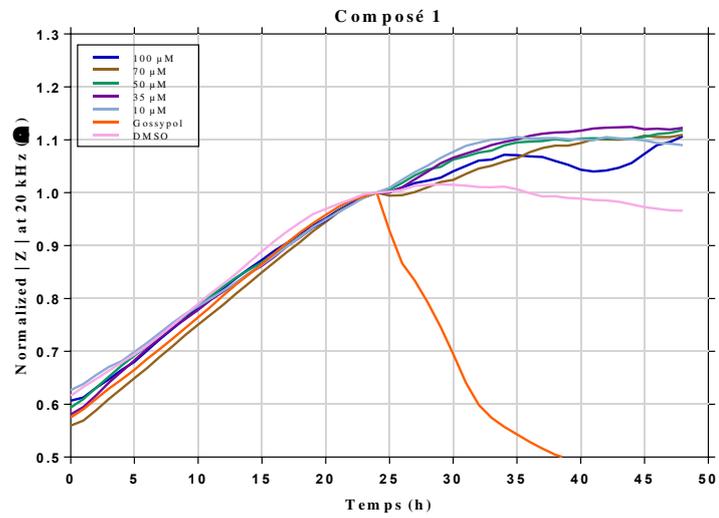
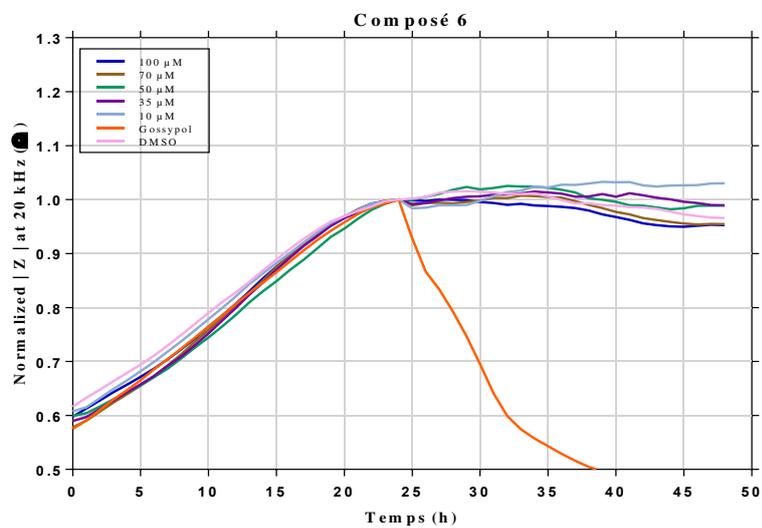
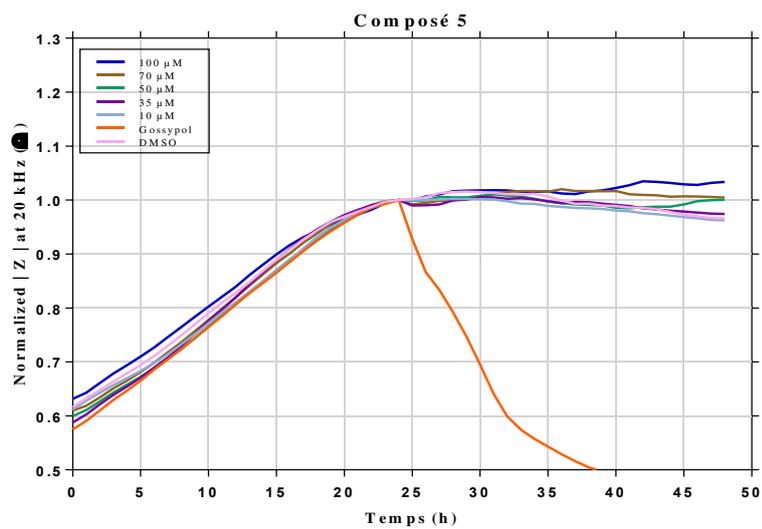
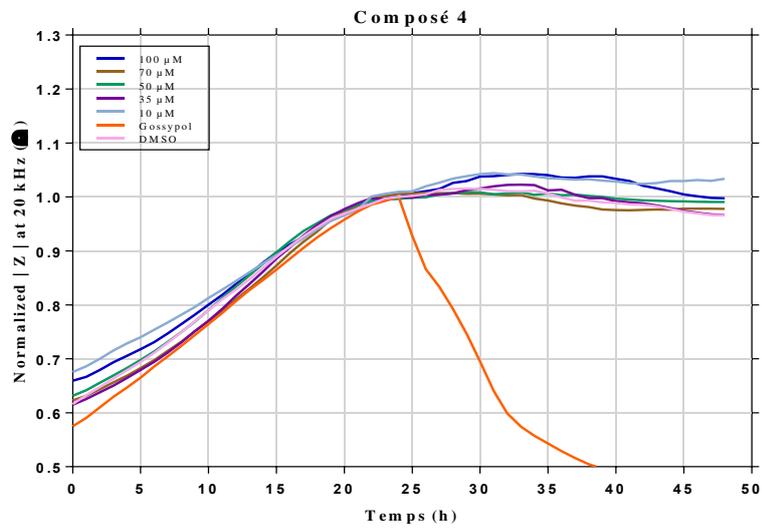


Figure 46: L'effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules MCF-7. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -5- 6- Caco 2 :





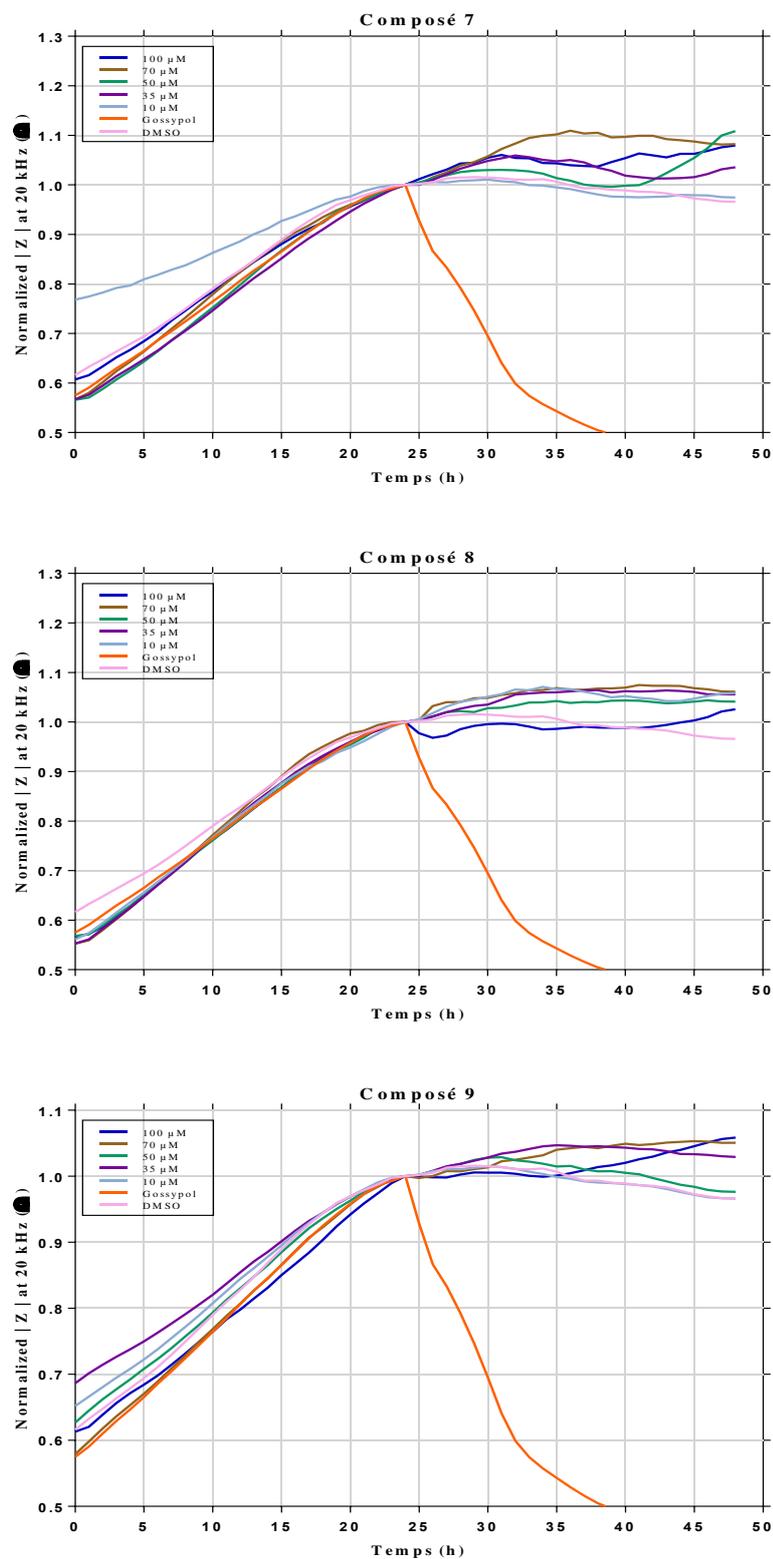
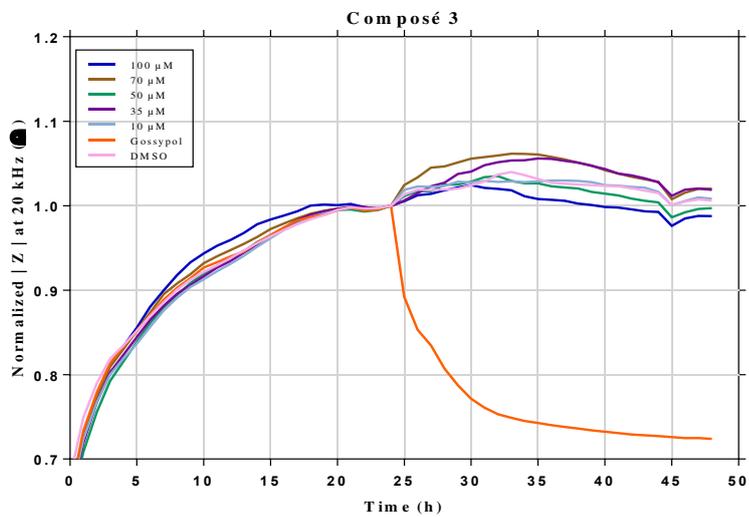
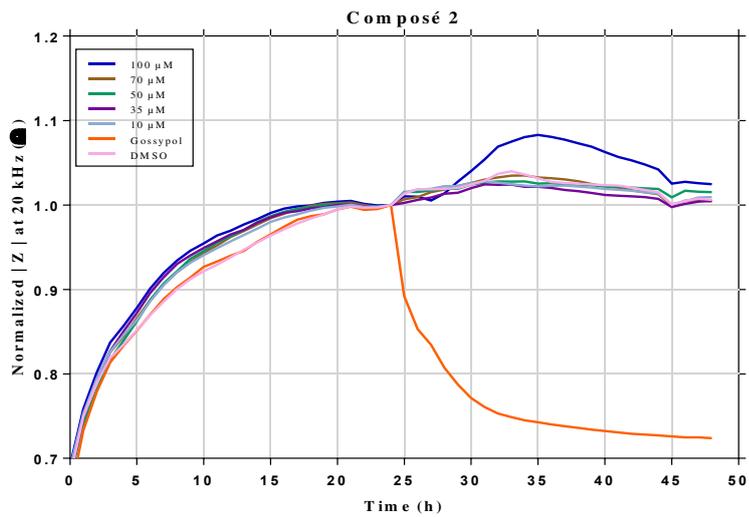
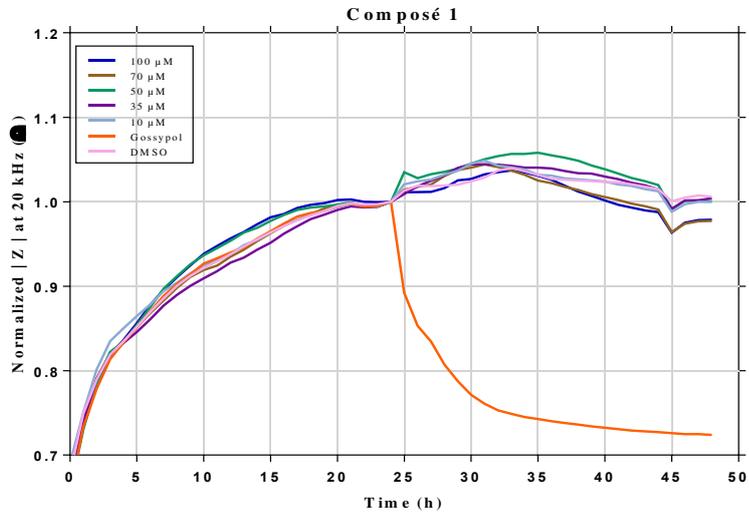
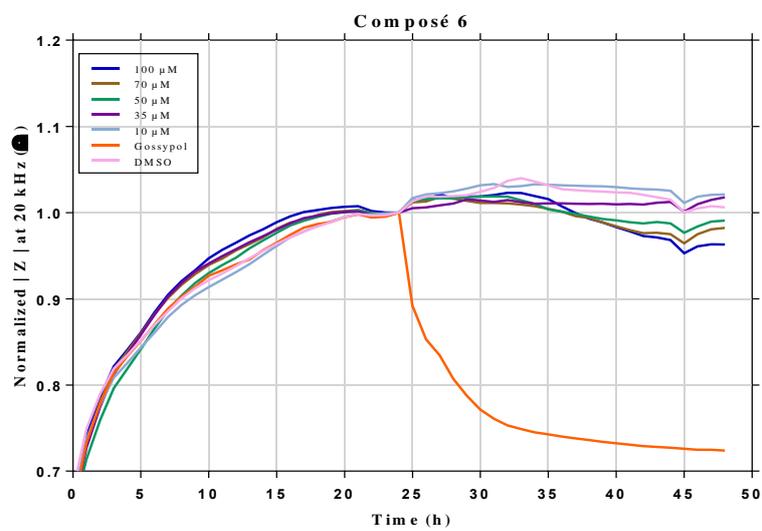
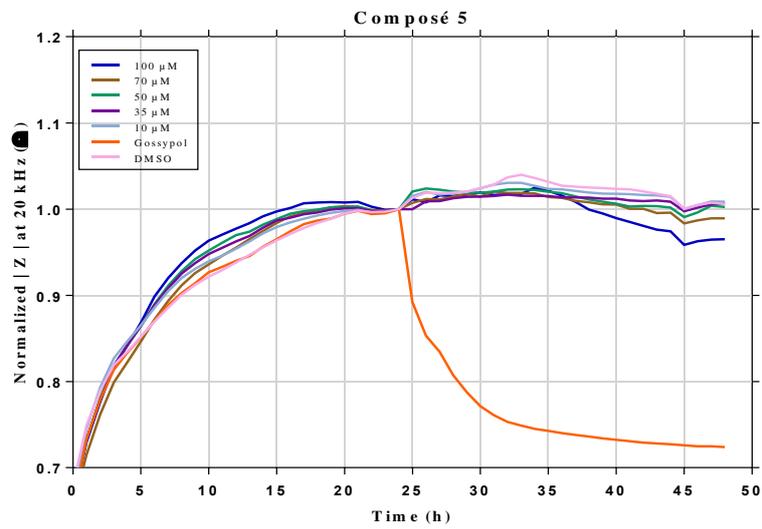
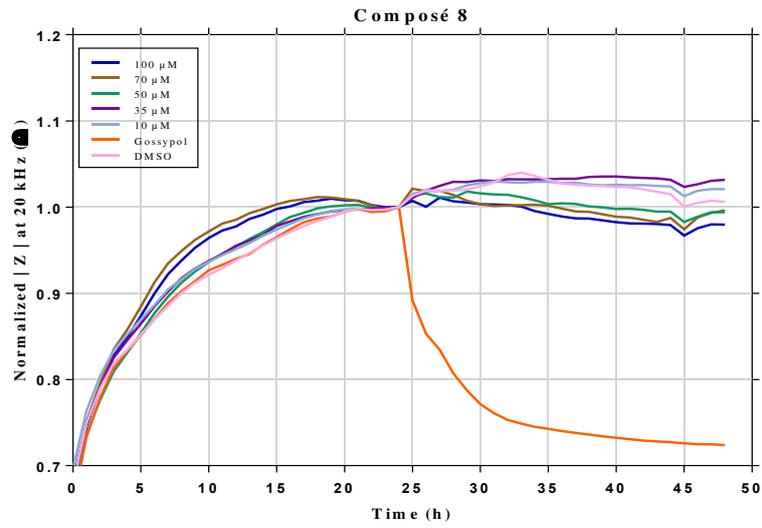


Figure 47: L'effet des dérivés coumariniques et chromones à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules Caco 2. . Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -5- 7- A549 :





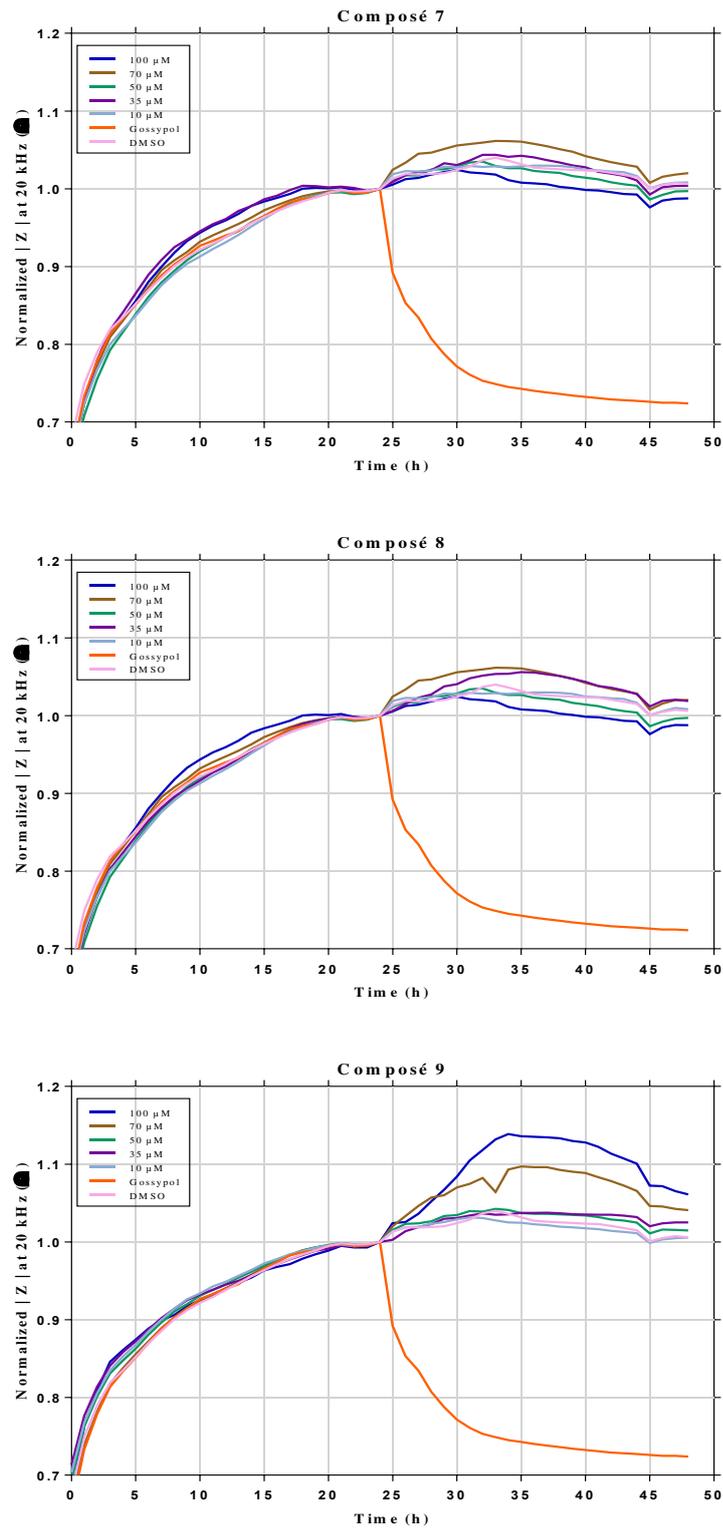


Figure 48: L'effet des dérivés coumariniques et chromones à différentes concentrations sur l'impédance en fonction du temps sur les cellules A549. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

La viabilité cellulaire (%) est calculée à partir des données d'impédance en utilisant l'équation suivante. (2) [216-218].

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{Z_T}{Z_C} \times 100 \quad (2)$$

Où ZC et ZT représentent la valeur moyenne de l'impédance pour le témoin et l'échantillon traité à 24 heures, respectivement. Les composés inhibaient la viabilité des cellules MCF-7, HCT-116, HEK-293t, HepG2, B16 en fonction de la dose et du temps (Figure 50-56, les CI₅₀ sont présentées dans le tableau 6).

Tableau 06: Valeurs d'IC₅₀ de l'inhibition des lignées cellulaires cancéreuses par les composés 1-9

IC₅₀ (μM)				
Composés	HTC116 (48h)	HEK293t (24h)	MCF-7 (24h)	HepG2 (24h)
Composé 1	68.53 ±1.29	48.21 ±2.28	***	***
Composé 2	47.95 ±2.37	37.4±2.12	62.29±3.24	88.66 ±3.97
Composé 8	36.55±4.19	49.06 ±3.17	47.22 ±2.39	79.55 ±2.05
Composé 9	53.59±2.11	***	27.52 ±2.13	77.14 ±2.33

La diminution de la prolifération s'accompagne d'une réduction de la viabilité (Figure 49-55). Les dérivés chromone-coumarine ont inhibé la viabilité des cellules MCF-7, HCT-116, HEK-293t, HepG2, B16 d'une manière dépendante de la dose et du temps. Les IC_{50} sont indiquées dans le tableau 2. Les composés 5, 2, 8 et 9 ont diminué la viabilité des cellules B16 d'environ de 61,77 %, 50 %, 55,89% et 64,71% respectivement. La viabilité des cellules HepG2 a diminué de 48,39%, 70,97%, 90,33% and 93,55% respectivement à 100 μ M après 24h de traitement. Les composés 1, 5, 2, 4, 8 et 9 ont diminué la viabilité des cellules MCF-7 d'environ 76, 67%, 56, 67%, 66, 67%, 66, 67% and 76, 67% respectivement. Les composés 1, 2, 8 et 9 ont diminué la viabilité des cellules HEK-293t d'environ 90, 91%, 81, 82%, 100% and 100% respectivement. Les composés 1, 2, 4, 7, 8 et 9 ont diminué la viabilité des cellules HCT-116 d'environ 100%, 89,66%, 79,32%, 44,83%, 100% and 100% respectivement à 100 μ M après 48h de traitement.

Les résultats obtenus avec la nouvelle série d'hybrides chromone-coumarine pour l'activité cytotoxique contre un panel de lignées cellulaires tumorales (MCF-7, A549, HepG2, HTC-116, B16 4A5) et des cellules non tumorales (Caco-2 et HEK- 293t) indiquent que ces composés possèdent des propriétés cytotoxiques puissantes dans un contexte spécifique du cancer.

Ces résultats sont en accord avec des études antérieures réalisées avec plusieurs dérivés de la chromone et de la coumarine.

Dans la quête d'élaborer de nouveaux composés mimant les activités de certaines molécules naturelles, O.Talhi et al décrivent les activités anticancéreuses et anti-inflammatoires d'un nouveau composé synthétique de type bis-4-hydroxycoumarine, qui a été élaboré par des voies de synthèse optimisées.

En effet, ils démontrent que le nouveau composé inhibe la prolifération de lignées cellulaires leucémiques : K-562 et JUKAT. Il s'avère que ce composé bloque l'activation de la voie pro-inflammatoire NF-kB [219].

De nouveaux composés et des composés structurellement similaires combinant un noyau imidazo [1,2-a] pyridine avec une unité chromène ont montré une cytotoxicité intéressante contre les lignées cancéreuses HCT116 [220].

Chen-Chen Ma et Zhao-Peng Liu, ont montré que des dérivés coumariniques étaient capables d'inhiber la prolifération de lignées cancéreuses humaines : K562, Hela, A549 et MCF-7 [221].

On retrouve aussi dans les travaux de W.Huang et al que des dérivés chromone exercent un effet anti-tumoral envers des lignées cancéreuses humaines : HCCLM-7, Hep-2, MDA-MB-435S et SW-480 [222].

Néanmoins, à notre connaissance, ces composés n'ont jamais été étudiés pour l'activité cytotoxique ; d'où l'intérêt de notre étude.

Parmi le groupe de molécules testées, les composés 1, 2, 8 et 9 présentaient une inhibition de croissance accrue pour la plupart des lignées cellulaires étudiées (Figure 43-49).

Nous avons noté que la plupart de ces composés sont des hybrides de biscoumarine; nous supposons que la structure biscoumarin est une fonction cruciale et qu'il semble être en partie responsable de l'activité anticancéreuse [219-223].

Ces composés ont montré un effet de sélectivité contre les lignées cellulaires cancéreuses étudiées.

En effet, les cellules Caco-2 et A549 n'ont pas été affectées par le traitement. Des rapports récents révèlent l'activité cytotoxique sélective de certains dérivés coumariniques envers des cellules cancéreuses, tels que la 7,8-dihydroxy-4-méthylcoumarine, la 7,8-diacétoxy-4-méthylcoumarine [224] et la 7-hydroxycoumarine [225] présentant des effets antiprolifératifs envers des cellules cancéreuses pulmonaires, mais pas envers les PBMCs.

IV -6- Effet des dérivés coumariniques et chromones sur la viabilité des lignées cellulaire adhérentes :

IV -6- 1-HCT116 :

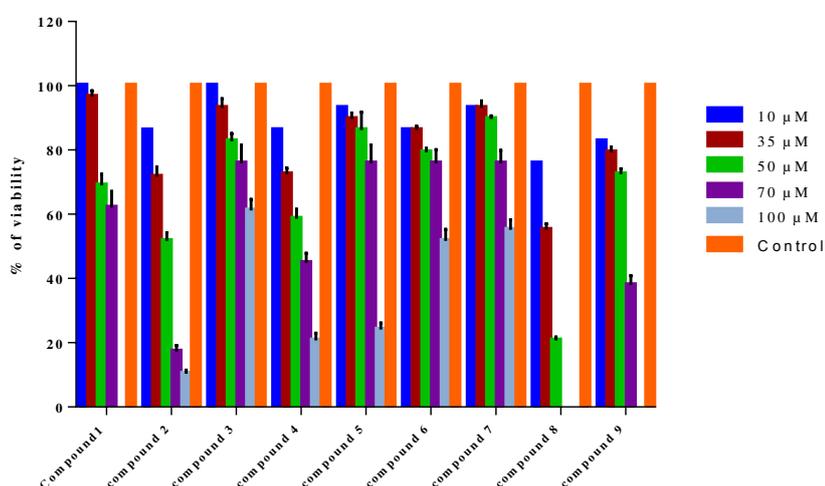


Figure 49: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules HCT116. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -6- 2-HEK293t :

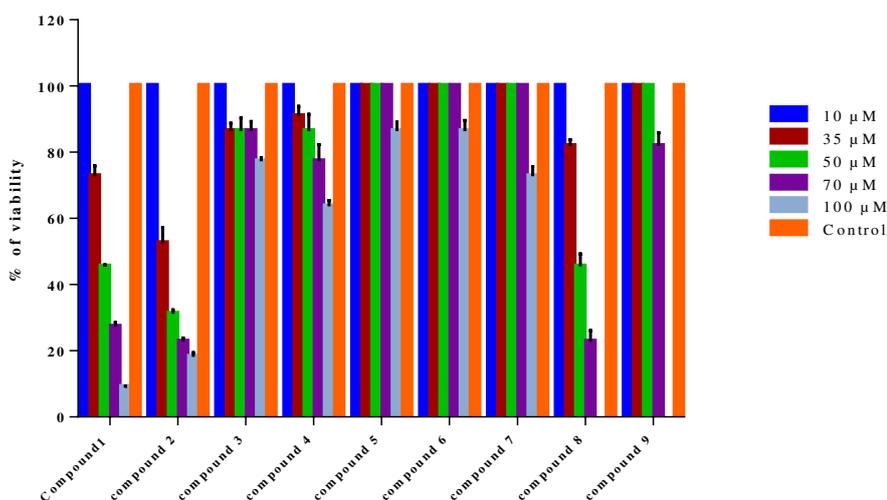


Figure 50: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules HEK293t. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -6- 3-B16 :

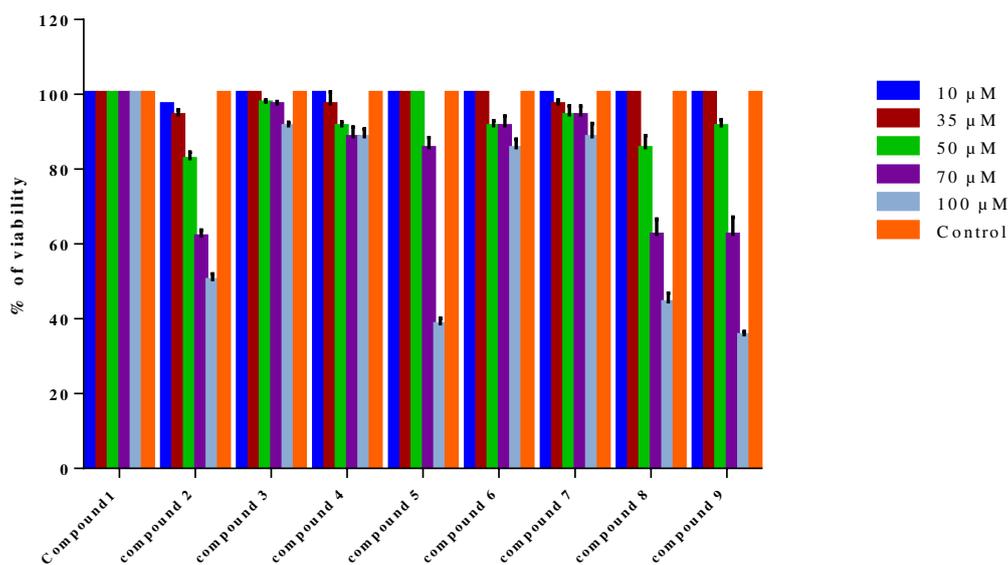


Figure 51: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules B16. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -6- 4-HepG2 :

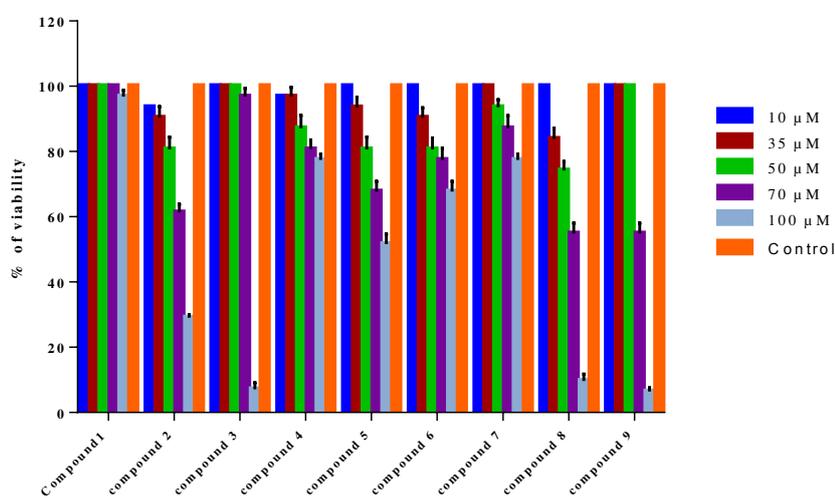


Figure 52: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules HepG2. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -6- 5-MCF-7 :

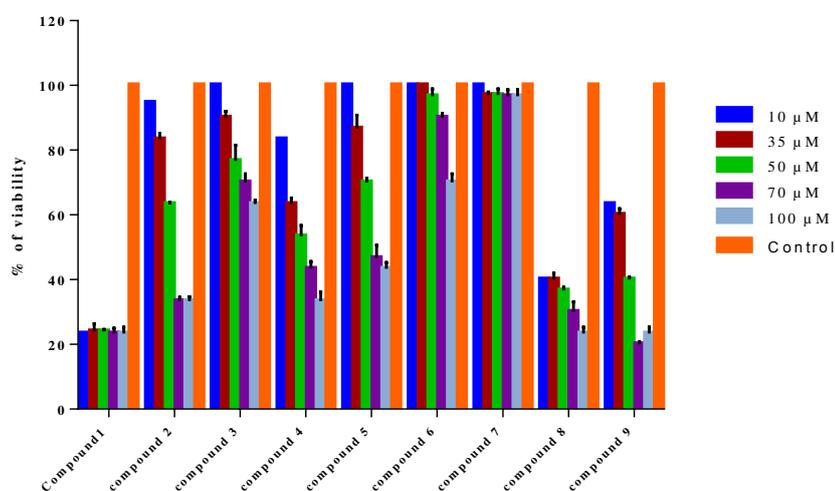


Figure 53: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules MCF-7. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -6- 5-A549 :

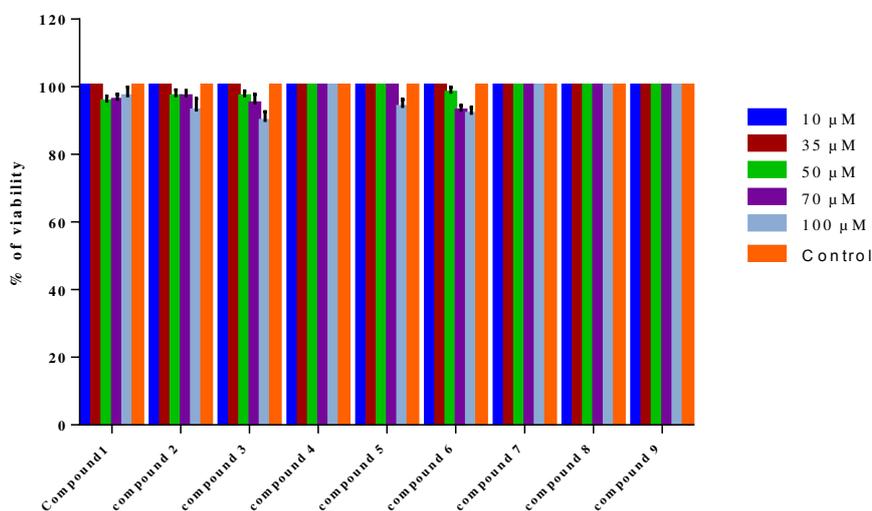


Figure 54: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules A549. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -6- 6-CaCo-2 :

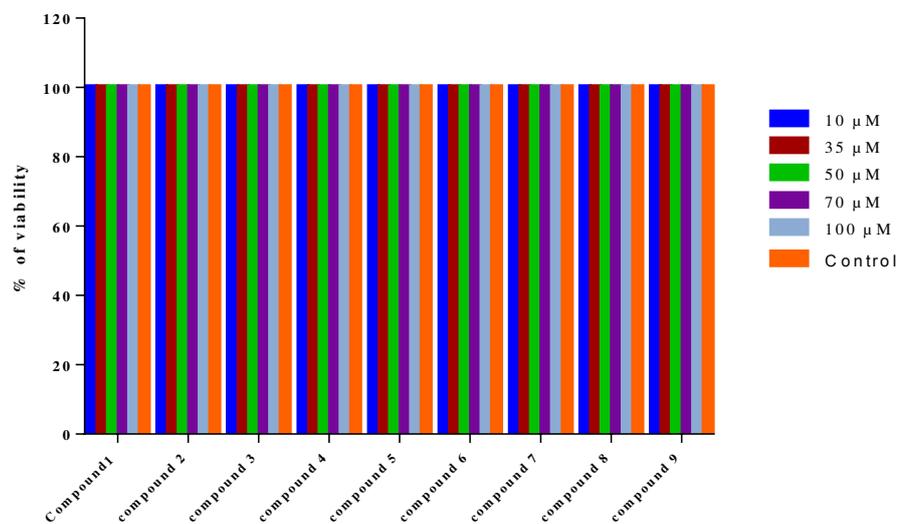


Figure 55: Effet des dérivés coumariniques et chromones 1-9 sur la viabilité des cellules CaCo2. Le témoin (Co) correspond aux cellules traitées uniquement au DMSO.

IV -7- Analyse de l'apoptose :

Comme la réduction de la viabilité pourrait correspondre à l'induction de la mort cellulaire apoptotique, le composé 8 a été sélectionné sur la base de son profil antiprolifératif et cytotoxique pour confirmer son induction apoptotique par d'autres techniques bien établies comme la cytométrie de flux et le western blot.

Nous avons ensuite déterminé si elle induisait l'apoptose dans les cellules HCT-116 en évaluant l'incorporation d'Annexin V (cellules apoptotiques précoces) et d'iodure de propidium (cellules apoptotiques tardives) en utilisant à la fois la cytométrie en flux (Figure 56.A et B) et la microscopie à fluorescence (Figures C et D) [226]. Comme le montre la figure 4A, le traitement des cellules HCT-116 avec le composé 8 a induit l'apoptose d'une manière dépendante du temps et de la dose. En effet, le composé 8 induit une apoptose précoce et tardive à partir de 15,64 % dans les cellules non traitées jusqu'à 44% après 48 heures à la dose de 100 μ M (Figures 56.A et B). Nous avons également trouvé que le composé 8 induit l'apoptose de manière dépendante de la dose. De plus, nous avons confirmé la mort cellulaire par apoptose par marquage fluorescent (Figures 56 C et D).

Nous avons confirmé en outre l'induction de l'apoptose dans les cellules HCT-116 par le composé 8 en évaluant le clivage de la caspase-3 et de la PARP par western blot. La caspase-3, est une protéase à cystéine de la famille des caspases qui jouent un rôle central dans l'exécution du programme apoptotique [227,228]. Elle est principalement responsable du clivage de la PARP au cours de la mort cellulaire [229,230]. Le traitement des cellules HCT-116 avec le composé 8 (0, 50 et 100 μ M) pendant 8, 16, 24 et 48 heures a entraîné une augmentation dose-dépendante du clivage de la caspase-3 et de la PARP par rapport aux cellules non traitées correspondantes (Figure 56.E). Les clivages de PARP et de caspase-3 se produisent principalement à 100 μ M après 24 heures de traitement. La figure 56.E montre que le clivage de la caspase-3 se produit dans une moindre mesure que le clivage PARP. L'activation de la caspase-3 et le clivage PARP subséquent à 100 μ M de concentration du composé 8 après 24 heures de traitement suggèrent une mort cellulaire apoptotique dans la lignée cellulaire HCT-116, ce qui est cohérent avec la détection cytométrique en flux correspondante.

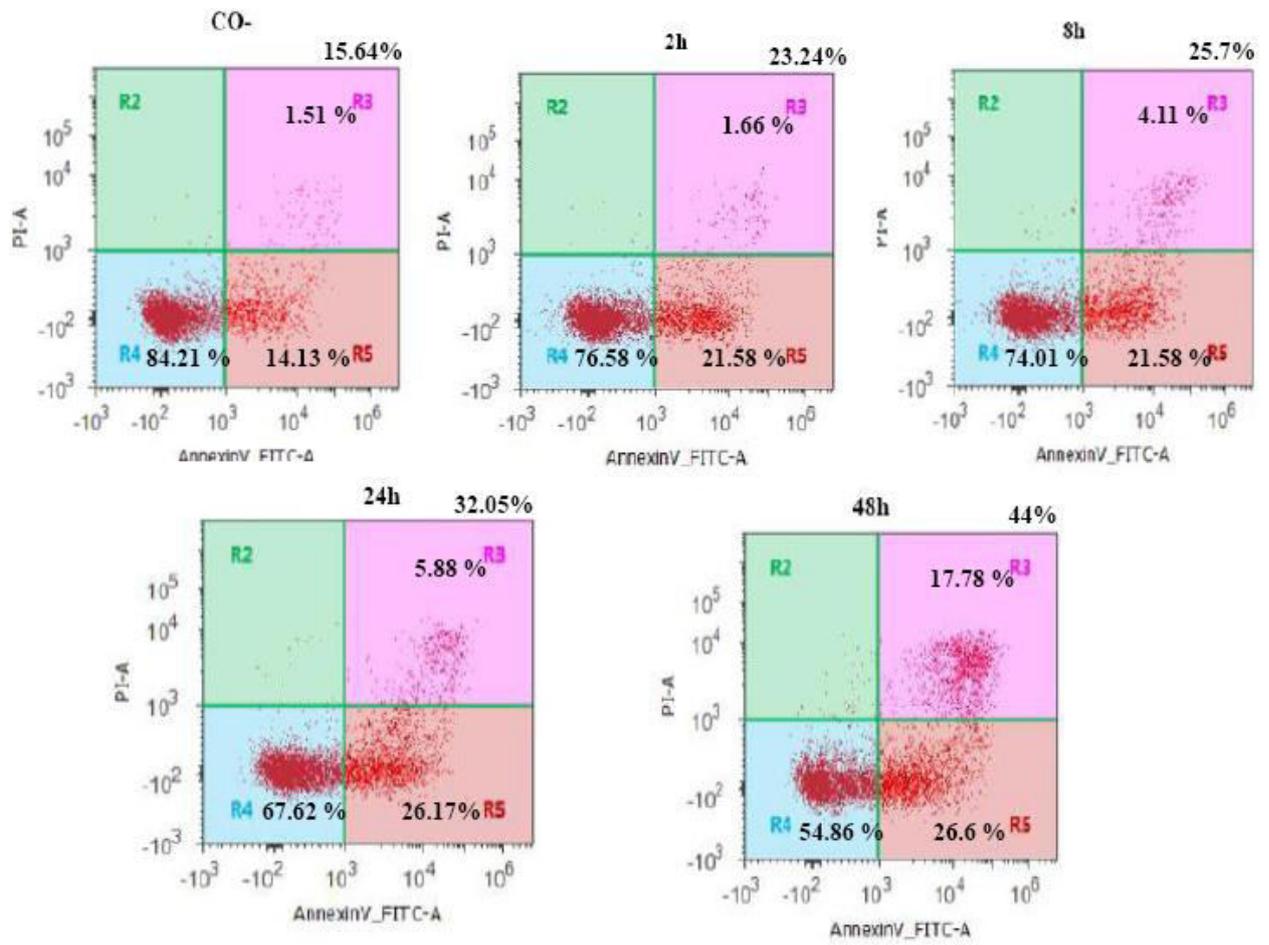
L'apoptose est caractérisée par des changements biochimiques et morphologiques dans les cellules, tels que le rétrécissement cellulaire et le marquage de la membrane cellulaire [231,232]. L'utilisation de la coloration de l'annexine V à la fois pour la microscopie à

fluorescence et pour la cytométrie en flux est une méthode largement utilisée pour détecter l'apoptose [233-235].

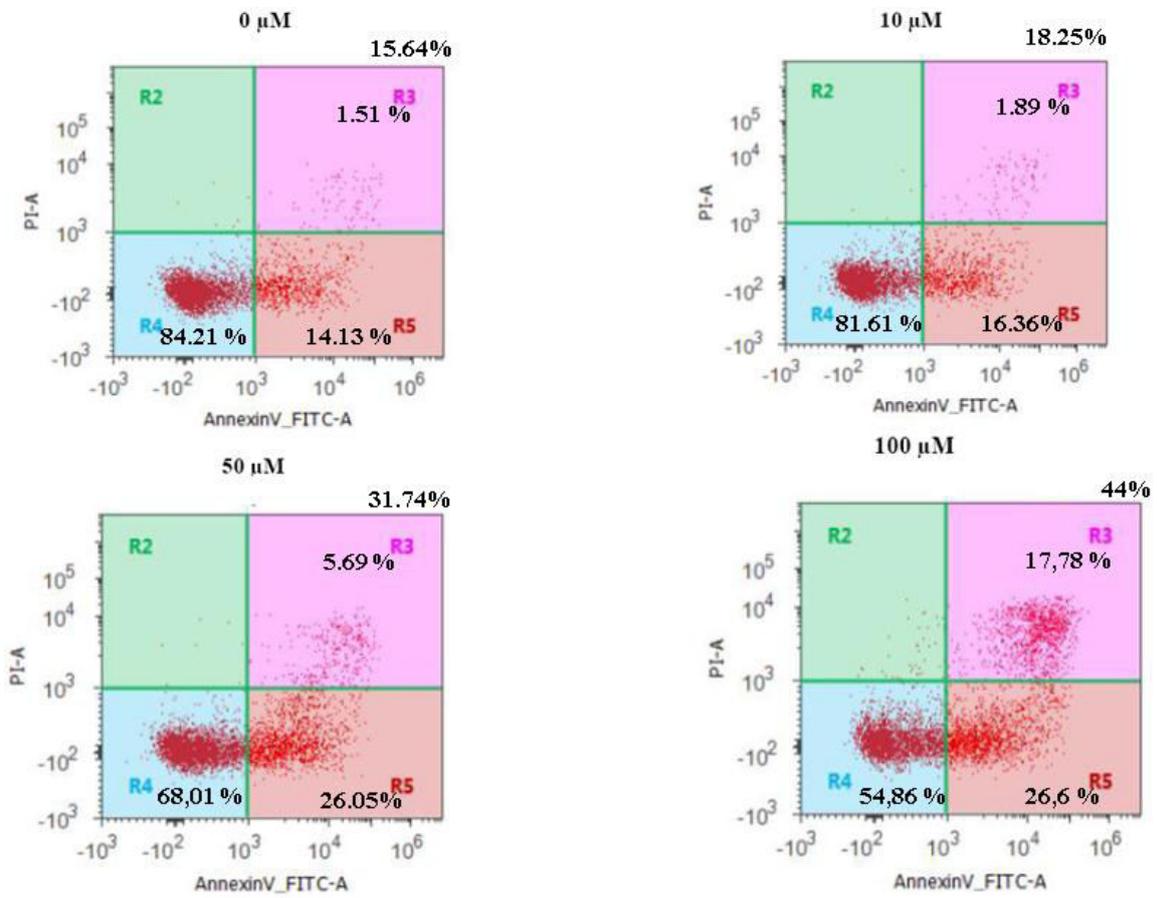
Nous avons trouvé que le composé 8 induit une apoptose précoce et tardive de manière dépendante de la dose et du temps dans la lignée cellulaire HCT-116 (Figures 56.A et B). L'induction de l'apoptose par le composé 8 a également été évaluée par clivage de caspase-3 et de PARP dans des cellules HCT-116. La mort cellulaire apoptotique médiée par la caspase est réalisée par le clivage de plusieurs protéines clés nécessaires au fonctionnement cellulaire et à la survie [236]. La PARP est l'un des plusieurs substrats cellulaires connus des caspases. Le clivage de PARP-1 par les caspases est considéré comme une caractéristique de l'apoptose [237].

Nous avons observé que le composé 8 était capable d'induire les caspases 3 et le clivage de PARP à 100 μ M après 24 heures de traitement, comme montré par Western blot (Figure 4E). Ces données encouragent une étude plus poussée pour clarifier l'effet du composé 8 sur les cellules saines puisque la lignée Caco-2 est le modèle cellulaire le plus commun et le plus largement utilisé pour l'évaluation de l'absorption des médicaments par les entérocytes de la membrane intestinale [238-240]. D'autres expériences avec les composés utilisés dans cette étude et avec d'autres dérivés chromone et coumarine aideront à élucider leurs mécanismes d'action anticancéreux. En effet, les dérivés de la coumarine ciblent un certain nombre de voies dans le cancer telles que l'inhibition de la kinase [241] et l'arrêt du cycle cellulaire [242]. Les dérivés de la coumarine et de la chromone affecteraient différentes phases du cycle cellulaire telles que les phases G₀, G₁, S et M qui mèneraient finalement à l'apoptose [243]. Ils se sont révélés comme inducteur d'apoptose par la voie intrinsèque dépendant de la caspase et l'altération du niveau cellulaire des protéines de la famille Bcl-2 [244]. En outre, de nombreux dérivés de la coumarine et de la chromone induisent l'apoptose en ciblant les protéines de la famille Bcl-2 (Bax / Bcl-2), qui jouent un rôle essentiel dans la détermination de l'apoptose [245].

A



B



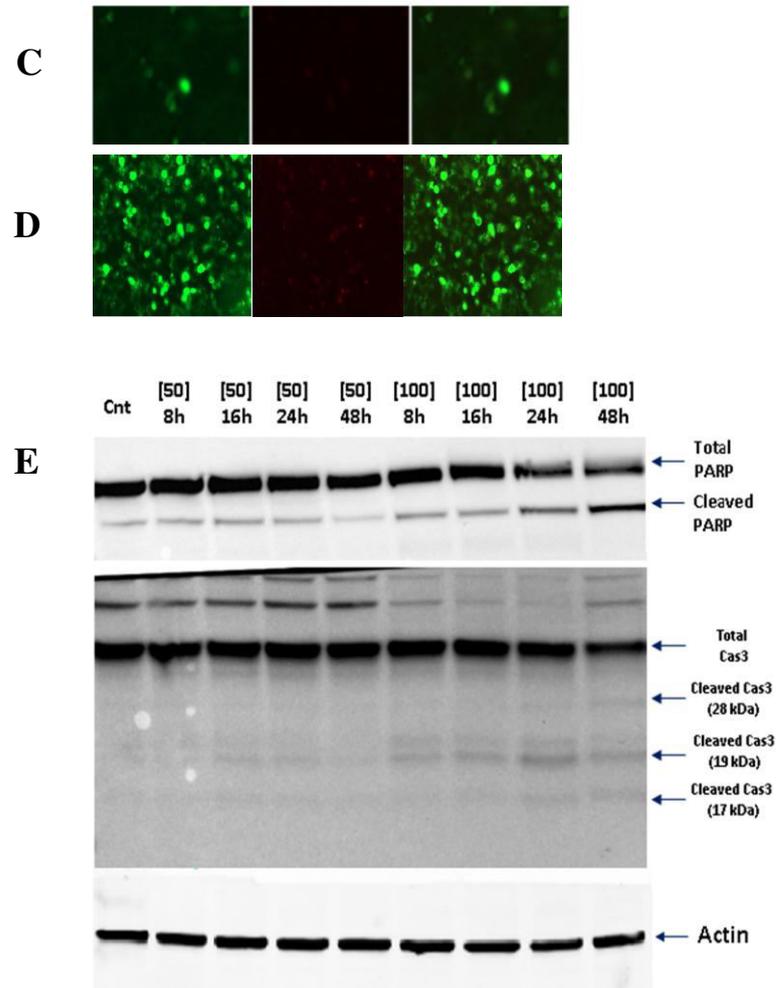


Figure 56. **A** : Détection des cellules apoptotiques en fonction du temps par la technique de coloration à l'annexine V-FITC/ iodure de propidium (PI), par FACS. Le quadrant inférieur droit de la parcelle indique des cellules apoptotiques précoces qui sont uniquement positives pour l'annexine V. **B** : Détection des cellules apoptotiques en fonction de la concentration du composé 8, par la technique de coloration à l'annexine V-FITC/ iodure de propidium (PI), par FACS. Une des trois expériences indépendantes avec des résultats similaires est montrée. **C**: Le contrôle correspond aux cellules traitées uniquement avec le solvant durant 8h. **D**: Induction de l'apoptose après 8h de traitement avec 100 μM du composé 8. **E**: Analyse du clivage du substrat principal de la caspase-3 PARP- par Western blot après, 8, 16, 24 et 48 h de traitement.

IV -8- Analyse de corrélation entre les résultats obtenus par cytotoxicité et ceux obtenus avec FACS et western blot:

L'impédance cellulaire des cellules HCT-116 a commencé à diminuer dans les 6-8 heures de traitement avec le composé 8 à 100 μM , et a considérablement diminué après 24 heures de traitement, indiquant une apoptose ou une nécrose. Ces observations ont été vérifiées indépendamment par imagerie fluorescente (Figure 56C et D). Des images en champ clair et fluorescentes sont montrées (Figure 56C et D) après 8 heures de culture continue avec 100 μM avec le composé 8. Après 8 heures de traitement, aucun changement morphologique significatif n'a été observé par cytométrie de flux (Figure 56A et B). Cependant, après 24 heures d'exposition au composé 8 à 100 μM , les cellules HCT-116 présentaient des changements morphologiques significatifs, et le nombre de cellules colorées par PI / annexine V-FITC augmentait nettement, ce qui indiquait une induction apoptotique. Nous avons également noté l'activation du clivage de la caspase-3 et de la PARP à une concentration de 100 μM du composé 8 après 24 heures de traitement, suggérant une mort cellulaire apoptotique dans les cellules HCT-116. Les résultats de cytotoxicité sont en accord avec ceux obtenus par cytométrie en flux et western blot. Cependant, nous avons noté que l'analyse en temps réel a détecté les changements induits par le composé 8 à la membrane cellulaire aux stades précoces du processus cytotoxique. Par conséquent, la surveillance continue de l'impédance fournit une meilleure résolution temporelle pour les profils de toxicité car la mesure du point final standard peut négliger les événements temporels intermédiaires [247,248].

V- Conclusion et perspectives

Le cancer est la maladie la plus redoutée et est souvent perçue comme « la pire des maladies » à cause du nombre de victimes qu'elle provoque chaque année de part le monde; il est la première cause de décès avant l'âge de 65 ans. Près de 8 millions de personnes meurent chaque année du cancer dans le Monde. La mortalité mondiale par le cancer est supérieure à celle du SIDA, de la tuberculose et du paludisme réunis; elle devance les maladies cardiovasculaires et les accidents.

Même si les possibilités de guérir d'un cancer atteignent aujourd'hui plus de 50%, avec pour certains cancer des guérisons presque totales, et malgré les progrès incessants faits tant en matière de traitement que de détection et de prévention, cette maladie véhicule encore beaucoup de peur et reste crainte par la majorité des malades.

Les traitements demeurent très coûteux et très lourds et s'accompagnent par des effets secondaires difficilement supportables par le patient.

Face à ce fléau, les chercheurs travaillent à la mise au point de nouvelles molécules, toujours plus ciblées et moins toxiques. Aussi la recherche de nouveaux médicaments, en particulier d'origine naturelle s'avère d'actualité.

C'est ainsi que dès 2008, dans le cadre de la préparation d'une thèse de magistère, nous avons entrepris une étude sur «l'effet de la chitine et de ses dérivés sur les lignées cancéreuses humaines Hep2 et RD».

Pour notre thèse de doctorat, nous avons voulu poursuivre les travaux entamés en étudiant de nouveaux dérivés de la chitine et sur d'autres lignées cancéreuses.

Les résultats obtenus nous ont poussés à élargir notre spectre de prospection parmi les familles de molécules obtenus par synthèse à partir de molécules connues pour leurs effets thérapeutiques en général et anticancéreux en particulier.

Ainsi, nous nous sommes intéressés dans la présente étude à d'autres groupes de molécules, connus pour leurs effets anticancéreux, à savoir: Les spirocycliques, les lactones, les chromones et les coumarines.

La première partie de notre travail, révèle que sur un ensemble de six composés spiro(Lactone-Cyclohexanone) testés, le composé 4 (spiro [pseudocoumarin-cyclohexanone]) et le composé 9 (spiro [6-methylactone-cyclohexanone]) montrent un effet significatif sur la régulation de la prolifération et la viabilité des lignées cellulaires cancéreuses K562 et U937. En outre, nous notons que le composé 4 et composé 9 inhibe l'activation du NF-kappa B induite par le TNF- α d'une manière dose-dépendante. L'induction de l'apoptose a eu lieu d'une manière dépendante de la caspase telle que révélée par le dosage caspase 3/7.

Il serait intéressant, à l'avenir, de poursuivre les tests de cytotoxicité sur des lignées de cellules saines (PBMCs) et de faire une étude *in vivo* de ces molécules.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons pu démontrer que parmi les neuf composés hybrides chromone et coumarine testés, les composés 1, 2, 8 et 9 ont montré l'effet antiprolifératif le plus intéressant.

En effet, ils ont significativement diminué la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses dans différentes lignées cellulaires. Le composé 8 a montré l'activité la plus puissante et il a rapidement produit un effet anti-prolifératif envers les différentes lignées cellulaires.

Par la suite, nous avons démontré que le composé 8 induisait la mort cellulaire par apoptose aux cellules HCT-116, d'une manière dépendante de la dose et du temps, comme on peut le constater avec les résultats de la cytométrie de flux et du Western blot.

Nos résultats confirment aussi, que la technique de mesure de l'impédance électrique est une méthode rapide et quantitative pour dépister les agents anticancéreux.

L'un des critères importants pour un médicament thérapeutique contre le cancer est son activité cytotoxique et apoptotique élevée à de faibles concentrations. De ce fait nous envisageons d'augmenter encore plus l'efficacité de ces composés en collaborant avec nos collègues chimistes dans de futures études.

La sélectivité d'action de ces composés vis-à-vis aux cellules cancéreuses étudiées, et en particulier leurs inefficacité envers les cellules Caco-2 qui sont considérées comme le modèle cellulaire le plus commun et le plus largement caractérisé pour l'évaluation de l'absorption des médicaments par les entérocytes de la membrane intestinale, encourage une étude plus approfondie pour clarifier l'effet de ces composés sur les cellules saines.

Les tests *in vivo* de ces composés ont certainement beaucoup d'intérêt. Ce sont des dimensions que nous avons l'intention d'explorer à l'avenir.

VI- Références bibliographiques

- [1] J.Ferlay, I.Soerjomataram, M.Ervik, R.Dikshit, S.Eser,C. Mathers et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.2013.
- [2] M.Zitouni. Plan national du cancer. Edition & Publication. Institut nationa de santé publique.2015.pp13-22.
- [3] B.Patwardhan, r.a.Mashelkar.Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? Drug Discov Today. 14(2009)804-811.
- [4] D.J.Newman , G.M.Cragg .Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod. 70(2007) 461-477.
- [5] S.Saeidnia, M.A.Abdollahi. Perspective studies on novel anticancer drugs from natural origin; a comprehensive review. Int J Pharmacol. 10(2014) 90-108.
- [6] I.Kramer, E. Genot. Les signaux de prolifération et leur régulation. Cancérologie fondamentale, Lacave .1 (2005) pp03.
- [7] C.J. Larsen. Transformation cellulaire maligne. Cancérologie fondamentale, Lacave. 2 (2005) pp82.
- [8] J.Kaplan, M.Delpech, Biologie moléculaire et médecine, Médecine-Science Flammarion, 3^e édition, (kaplan) 2007.
- [9] B.Alberts, D.Bray, K.Hopkin, A.Johnson, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, P.walter, L'Essentiel de la Biologie Cellulaire, Médecine-Science Flammarion, 2^{ème}Edition.21 (1999) 731.
- [10]A.G. Knudson. Mutation and cancer.Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA. Cancérologie fondamentale, (Lacave) 68(1971)820- 823.
- [11] D.Haber,E. Harlow. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. Nat Genet.16(1997)320-322.
- [12] Y.J. Bignon. Nancy Uhrhammer,Gènes suppressers de tumeurs , Cancérologie fondamentale, Lacave 2 (2005) pp105.
- [13] F. Balkwill and A.Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet. 357 (2001).539- 545.

- [14] C.Sobolewski. Effets d'inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses hématopoïétiques. (2011) pp 04..
- [15] G.Sébahoun. Hématologie clinique et biologique 2e éd. Rueil-Malmaison : Arnette. 2005,215-283.
- [16] E.De Braekeleer, N.Douet-Guilbert, D.Rwe, N.Bown, F.Morel, C.Berthou, C.Ferec and M.De Braekeleer. ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. Eur J Haematol. 86(2011) 361-371.
- [17] M.Leporrier Hématologie. Dion initiatives sante, Velizy-Villacoublay (1999) pp 414.
- [18] J.B.Gorius, F. Reyes, H.Rochant, J. Rosa, J.P.Vernant. L'Hématologie de Bernard Dreyfus, Médecine-Science Flammarion, 3^e Edition. 63 (1992) 797.
- [19] E. Corre, J. P. Marie, B. Rio et O. Legrand. Traitement des leucémies aiguës, Thérapeutique du cancer pp733.
- [20] MC.Raff. Social controls on cell survival and cell death, Nature. 356 (1992) 397-400.
- [21] H.J.Rode. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation 4th edition, Roche Diagnostics GmbH (Eds),2008, pp04.
- [22] S.Chouaib, A.Bensussan. Immunologie des cancers, Médecine-Science Flammarion.13 (2003) 148149.
- [23] E.Solary. Mort cellulaire. Cancérologie fondamentale, Lacave 1 (année) :31,33.
- [24] M.O.Hengartner.The biochemistry of apoptosis, Nature. 407 (2000) 770-776.
- [25] P.H. Krammer. CD95's deadly mission in the immune system, Nature. 407 (2000) 789-795.
- [26] A.Thorburn. Death receptor-induced cell killing. Cell Signal. 16 (2004) 139-144.
- [27] E. LAFONT. Rôles des caspases initiatrices et des sphingomyéline synthases dans l'apoptose induite par CD95L et TRAIL,université de Toulouse III, pp11.
- [28] Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. I. Simpson et D. L. Vaux. Identification of DJABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing JAP proteins. Cell.102(2000) 43-53.

- [29] Du, c., M. Fang, Y. Li, L. Li et X. Wang. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition». *Cell*. 102, (2000) 33-42.
- [30] M.O.Hengartner,0. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407 (2000) 770-776.
- [31] H., W. Zou, I.Henzel, X. Liu, A. Lutschg et X. Wang. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90(1997) 405-413.
- [32] H.R.Horvitz,J.E. Sulston. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorabditis elegans*. *Genetics*. 96(1980)435-454.
- [33] J.Yuan , S.Shaham , S.Ledoux et al. The *Caenorabditis elegans* cell-death protein CED-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 75(1993) 248-251.
- [34] Y.Shi. Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell*. 117(2004) 855-858.
- [35] R.Sen and D.Baltimore. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 47(1986) 921-928.
- [36] P. A. Baeuerle and T.Henkel. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 12(1994) 141-179.
- [37] Jr A. S. Baldwin. The NF- κ B and I κ B proteins : New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol*.14(1996) 649-681.
- [38] G.Bonizzi andM. Karin. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *TRENDS in Immunology*. 25(2004) 280-288.
- [39] C.J. Larsen. Oncogènes. *Cancérologie fondamentale*, Lacave 21 (2005) 100-101.
- [40] S.Ghosh , M.J.May and E.B.Kopp. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*. 16(1998) 225-260.
- [41] M.D.Jacobs and S.C.Harrison. Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell*. 95(1998) 749-758.

- [42] F.E.Chen , D.B.Huang , Y.Q.Chen and G.Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*. 39(1998) 410-413.
- [43] M.Karin and Y.Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*. 18(200) 621-663.
- [44] M.S.Hayden and S.Ghosh. Signaling to NF- κ B. *Genes & Development* 18(2004)2195-2224.
- [45] R.Costello, P.Lecine, B.Kahn-Perlès, M.Algarté, C.Lipcey, D.Olive, J.Imbert, Activation du système de facteurs de transcription Rel/NF- κ B. *mrderine/scienres (m/s)*. 11 (1 995) 957-965.
- [46] T.Huxford, D.B.Huang, S.Malek and G.Ghosh. The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell*. 95(1998) 759-70.
- [47] S.Malek, Y.hen., T.Huxford, and G.Ghosh. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*. 276(2001) 45225-45235.
- [48] Y.Ben-Neriah. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*. 3(2002), 6-20.
- [49] A.Birbach, P.Gold, B.R.Binder, E.Hofer, R.de Martin and J.A.Schmid Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*. 277(2002), 10842-10851.
- [50] S.H.Lee and M.Hannink. Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *J Biol Chem* .277(2002), 23358-23366.
- [51] Li, Q., Lu, Q., Hwang, J. Y., Buscher, D., Lee, K. F., Izpisua-Belmonte, J. C., and Verma, I. M. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev*. 13(1999) 1322-13228.
- [52] W.F.Tam, and R.Sen. IkappaB family members function by different mechanisms. *J Biol Chem* 276(2001) 7701-7704.
- [53] M.J.May and S.Ghos. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol*. 8(1997), 63-73.

- [54] N.Silverman and T.Maniatis. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15(2001) 2321-2342.
- [55] C.Fenwick, S.Y.Na, R.E.Voll, H. Zhong, S.Y.Im, J.W.Lee and S.Ghosh. A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkappaB. *Science.* 287(2000) 869-873.
- [56] M.Karin and Y.Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18(2000) 621-63.
- [57] P.Viatour, M.P.Merville, V.Bours and A.Chariot. Phosphorylation of NF- kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30(2005) 43-52.
- [58] J.Blackwell. Chitin in : *Biopolymers*. Walton AG, Blackwell J,eds.New York :Academic Press. (1973) pp474.
- [59] E.Taboada, G.Cabrera, G.Card. Synthesis and characterization of new arylamine chitosan derivatives. *Applied polymer.* 91(2004) 807-812.
- [60] H.Merzendorfer, L. Zimoch. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology.* 206 (2003) 4393- 4412.
- [61] F. Allache. *Activité biologique d'un dérégulateur de croissance des insectes : l'hexaflumuron sur la cuticule des larves de Locusta migratoria (linné. 1758) (orthoptera. oedipodinae)*. Thèse de Magister. Institut National Agronomique, El Harrach, Algérie, 2005.
- [62] G. A. Graham and P.Mark. Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohy. Resea.*, 277(1995) 257- 272.
- [63] S.Hitoshi and S.Yoshihiro. Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N- acetylated or N- alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohy. Polymers.* 39(1999)127-138.
- [64] J.Berger, M.Reist, J. M. Mayer, O.Felt, N. A. Peppas and R.Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Europ. J. of Pharmac. and Biopharmac.* 57 (2004) 19-34.
- [65] F.Rauch, M.Dornish. chitosan in : *An introduction to biomaterials*. SA.Gulcher, JO.Hollinger. CRC press14 (2006) 249.

- [66] S.O.Fernandez-Kim. Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. A Thesis of Master of Science.. Seoul National University. 2004.
- [67] R.V.Da Silva Amorim, W.De Souza, K. Fukushima, G.M De Campos-Takaki. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32 (2001) 20-23.
- [68] M. R. Kasai. A review of several reported procedures to determine the degree of Nacetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 71 (2008) 497-508.
- [69] S.T.Horowitz, P.Roseman, H.J. Blumental. The Préparation of Glucosamine Oligosaccharides, I. Séparation. *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 5046-5049.
- [70] A.Domard, N. Cartier. Préparation, séparation and characterisation of the D-glucosamine oligomer séries. In *Chitin and Chitosan*, G.Skjak-Braek, T.Anthonsen, P. Sandford. Elsevier.1(1989)383-387.
- [71] M.Izume, A.Ohtakara. Préparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 1189-1191.
- [72] S.K.Kim, N.Rajapakse. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS) : A review. *Carb. Polym.* 62 (2005) 357-368.
- [73] G. P. Ellis. Chromenes, chromanones and chromones, in: A. Weissberger, E.C. Taylor (Eds.). *The chemistry of Heterocyclic Compounds. Part 1.*Wiley, New York. 315(1977) pp 6.
- [74] S.Ruhemann, H. W. Bausor. Condensation of phenols with esters of the acetylene series. Part IV. Benzo- γ -pyrone and its homologues. *J. Chern. SOC.* 79 (1901) 470.
- [75] M. Bloch and S.v. Kostanecki. *Ber.* 33(1900) 471.
- [76] S.Ruhemann, H. E.Stapleton. The formation of heterocyclic compounds. *J. Chem. Soc.*77 (1900) 179.
- [77] A.R.Watson. Synthesis of 8-phenyl- γ -benzopyrone and $\alpha\gamma$ -phenanthropyrene. *J. Chem. Soc.*109 (1916) 303.
- [78] W. H. Perkin. On brazilic acid and the constitution of brazilin.*J. Chem. Soc.*81 (1902) 221.
- [79] *Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie.*; 4th ed., Springer. Berlin. 17 (1933) 327.

- [80] International Union of Pure and Applied Chemistry., Nomenclature of Organic Chemistry., Butterworths. London., 2nd ed., 1971.
- [81] Chemical Abstracts. Introduction and Index Guide to Volume 76., Chemical Abstracts Service, Ohio.; 1972, p 171G.
- [82] S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.G. Simic. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 116 (1994) 4846- 4851.
- [83] D. Grindlay, T. Reynolds. The aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology*. 16 (1986) 117-151.
- [84] S. Martens, A. Mithöfer. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66 (2005) 2399-2407.
- [85] M. Kuroda, S. Uchida, K. Watanabe, K. Mimaki. Chromones from the tubers of *Eranthis cilicica* and their antioxidant activity. *Phytochemistry*. 70 (2009) 288-293.
- [86] T. Zhou, Q. Shi, K.H. Lee, Anti-AIDS agents 83. Efficient microwave-assisted one- pot preparation of angular 2,2-dimethyl-2H-chromone containing Compounds. *Tetrahedron Letters*. 51 (2010) 4382-4386.
- [87] N.S. Parmer, M. Tariq, A.M. Ageel. Effect of thromboxane A2 and leukotriene C4 inhibitors on the experimentally induced gastric lesions in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 58 (1987) 15-25.
- [88] M.G. Amira, D.C. Pierre, T. Marguerite, T.N. Bonaventure, T. Pierre, T. Hirata, Anti-cancer and immunostimulatory activity of chromones and other constituents from *Cassia petersiana*, *Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences*. 62 (2007) 331-338.
- [89] B.N. Ruhs, K.C.H. Julia, P.H. William, S.P. Tor. Developing environmentally benign and effective organic wood preservatives by understanding the biocidal and non-biocidal properties of extractives in naturally durable heartwood. *Holzforschung*. 62 (2008) 264-269.
- [90] S. Maho, K. Yoshiyuki. Enhancing effects of a chromone glycoside, eucryphin, isolated from *Astilbe* rhizomes on burn wound repair and its mechanism. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 17 (2010) 820-829.
- [91] M. Gabor. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. *Progress in Clinical and Biological Research*. 213 (1986) 471-480.

- [92] D.C. Pierre, G. Donatien, T. Marguerite, N.T. Bonaventure, P. Pierre, A.A. Ahmed, G.M. Amira, A.I. Godwin, T. Hirata, M.J. Tom. Antitumor and immunostimulatory activity of two chromones and other constituents from *Cassia petersiana*. *Natural Product Communications*. 1 (2006) 961-968.
- [93] W.H.Perkin. On the hydride of aceto-salicyl. *J. Chem. Soc.* 21 (1868) 181-186.
- [94] KM.Amin , Gawad NM.Abdel , DE. Abdel Rahman , MK.El Ashry . *Bioorganic Chemistry*. 52(2014) 31-43. *Bioorg Chem*.52 (2014) 31-43.
- [95] MZ.Hassan, H.Osman, MA.Ali, MJ.Ahsan. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 123 (2016) 236-256.
- [96] A.Witaicenis, L.Noboru Seito, A.S. Chagas, L. D. Almeida Junior, A.C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S. H. Cestari, L. C. Di Stasi. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. 21(2014) 240-246.
- [97] M.E.Riveiro, N.De Kimpe, A.Mogliani, R.Vazquez, F.Monczor, C.Shayo, ,and C.Davio. Coumarins: Old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Current Medicinal Chemistry*. 17(2001) 1325-1338.
- [98] K.G.Tietjen, and U. Matern. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. II. Effects on enzyme activities. *European Journal of Biochemistry*. 131(1983) 409-413.
- [99] K.Kai, M.Mizutani, N.Kawamura, R.Yamamoto, M. Tamai, H. Yamaguchi, K.Sakata and B.I. Shimizu. Scopoletin is biosynthesized via orthohydroxylation of féruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 55(2008) 989-999.
- [100] J.Chong, R.Baltz, C.Schmitt, R.Beffa, B.Fritig, and P.Saindrenan. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell*. 14 (2002) 1093-1107.
- [101] T.Kosuge, T. Studies on the identity of bound coumarin in sweet clover. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95 (1967) 211-218.

- [102] B.Gestetner, and E.E. Conn. The 2 hydroxylation of trans cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba* Desr. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 163(1974) 617-624.
- [103] A.M. Zobel. Coumarins in fruits and vegetables. In *In Phytochemistry of Fruits and Vegetables*, F.A.A.a.R. Tomas-Barberan, R.J., eds, ed (Oxford:: Clarendon Press), (1997) 173–203.
- [104] S.B. Stanfill, C.R.Brown, X.Yan, C.H. Watson, and D.L. Ashley. Quantification of flavor-related compounds in the unburned contents of bidi and clove cigarettes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (2006) 8580-8588.
- [105] T. Nasr, S. Bondock and M. Youns, Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide–hydrazone derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 76 (2014) 539-544.
- [106] Kathuria, S. Jalal, R. Tiwari, A. N. Shirazi, S. Gupta, S. Kumar, K. Parang and S. K. Sharma, Substituted Coumarin Derivatives: Synthesis and Evaluation of Antiproliferative and Src Kinase Inhibitory Activities, *Chem. Bio. Int.*,1 (2011) 279-285.
- [107] N. Singh, J. Sarkar, K. Sashidhara, S. Ali and S. Sinha, Anti-tumour activity of a novel coumarin–chalcone hybrid is mediated through intrinsic apoptotic pathway by inducing PUMA and altering Bax/Bcl-2 ratio, *Apoptosis*, 19 (2014) 1017-1023.
- [108] R. Pan, Y. Dai, X. H. Gao, D. Lu and Y. F. Xia, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin through interrupting the autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its downstream signaling pathways, *Vascul. Pharmacol.*, 54 (2011) 18-26.
- [109] R. Pan, X. Gao, D. Lu, X. Xu, Y. Xia and Y. Dai, Prevention of FGF-2-induced angiogenesis by scopoletin, a coumarin compound isolated from *Erycibe obtusifolia* Benth, and its mechanism of action , *Int. immunopharmacol.*, 11 (2011) 2007-2014.
- [110] R.L. Matts, A. Dixit, L.B. Peterson, L. Sun, S. Voruganti, P. Kalyanaraman, S.D. Hartson, G.M. Verkhivker and B.S. Blagg, Elucidation of the HSP90 C-terminal inhibitor binding site, *ACS Chem. Biol.*, 6 (2011) 800-812.
- [111] M. Ruden and N. Puri, Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat. Rev.*, 39 (2013) 444-456.

- [112] N. H. Kim, S. N. Kim, J. S. Oh, S. Lee and Y. K. Kim, Anti-mitotic potential of 7-diethylamino-3 (2'-benzoxazolyl)-coumarin in 5-fluorouracil-resistant human gastric cancer cell line SNU620/5-FU, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 418 (2012) 616-621.
- [113] C. Fabrizio, M. Alfonso, S. Andrea and C. Supuran, Novel coumarins and 2-thioxo-coumarins as inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.*, 20 (2012), 2266-2273.
- [114] N. Draoui, O. Schicke, A. Fernandes, X. Drozak, F. Nahra, A. Dumont, J. Douxfils, E. Hermans, J. M. Dogné and R. Corbau, Synthesis and pharmacological evaluation of carboxycoumarins as a new antitumor treatment targeting lactate transport in cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.*, 21 (2013) 7107-7112.
- [115] Purohit and P. A. Foster, Steroid sulfatase inhibitors for estrogen-and androgendependent cancers, *J. Endocrinol.*, 212 (2012) 99-110.
- [116] O.W.Rokhlin, A.V.Gudkov, S.Kwek, R.A.Glover, A.S.Gewies and M.B.Cohen : p53 is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Oncogene*.19(2000)1959-1968.
- [117] M.A.El-Hashash, S.A.Rizk and S.R.Atta-Allah: Synthesis and regioselective reaction of some unsymmetrical heterocyclic chalcone derivatives and spiro heterocyclic compounds as antibacterial agents. *Molecules*.20(2015) 22069-22083.
- [118] Y.Miao, X.Juan, Z.Jing-Jing, H.Jun-Lin, Z.Yun, F.Hui, G.X.Yang, G.Xia and J.F.Hu: Leonurusoleanolides E-J, minor spirocyclic triterpenoids from *Leonurus japonicus* fruits. *J Nat Prod*. 77(2014)178-182.
- [119] J.W.Daly, I. L.Kale, C. W.Myers, T.Tokueyama, J. A.Waters, B. Witkop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 6(1971) 1870.
- [120] F.Perron, K. F .Albizati, K. F. *Chem. Rev.* 89(1989) 1617.
- [121] (a) R.Hegnauer. In *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhauser: Basel. 3(1964) p 447.
(b) C.Zedero, F.Bohlmann. *Plant Syst*. 1(1990) 171.
- [122] V.Martinez, O.Barbera, J.Sanchez-Parareda, J.A.Marco. *Phytochemistry* 26 (1987) 2619.

- [123] J.Breinlich, K.Schannagel. *Arznei,-Forsch.* 18 (1968) 429.
- [124] P.Weyerstahl, H.Wahlburg, V.K. Kaut, S.Lochynski. *Liebigs Ann. Chem.* 1992, 279.
- [125] R.-X.Tan, Z.-J.Jia, Y.Zhao, S.-L.Feng. *Phytochemistry.* 31(1992) 3405.
- [126] G. A.Cordell. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Academic: San Diego. 5 (1998).
- [127] T.Okita, M.Isobe. *Tetrahedron.* 50 (1994) 11143.
- [128] P.Rosemond, M. M.Hosseini, C.Bub. *Liebigs Ann. Chem.* 2 (1992) 151.
- [129] M. J.Kornet, A. P. J. Tnio. *Med. Chem.* 19 (1976) 892.
- [130] A. Jossang, P.Jossang, H. A.Hadi, T.Sevenet, B.Bodo. *J. Org. Chem.* 56 (1991) 6527.
- [131] C.Fisher, C. Meyers, E.M. Carreira. *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 1175.
- [132]. Chenera. B., West. M. L., Finkelstein. J. A and Dreyer. G. B. Total synthesis of (+-)-calanolide A, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Org. Chem.* 58(1993) 5605-5606.
- [133]. G. A. Molander, M. S. Quirnbach, L. F. Silva, K. C. Spencer, J.Balsells. Toward the total synthesis of variecolin. *J. Org. Lett.* 3(2001) 2257-2260.
- [134]. P. M. Wovkulich, P. C. Tang, N. K. Chadha, A. D. Batcho, J. C. Barrish, M. R. Uskokovic. Remote diastereoselection in the asymmetric total synthesis of mevinolin . *J. Am. Chem. Soc.* 111(1989) 2596-2599.
- [135]. N.Tanaka, M.Okasaka, Y.Ishimaru, Y.Takaishi, M.Sato, M.Okamoto, T.Oshikawa, S.U.Ahmed, L.M.Consentino, K.H.Lee. Biyouyanagin A, an Anti-HIV Agent from *Hypericum chinense* L. var. *salicifolium*. *Org. Lett.* 7 (2005) 2997- 2999.
- [136]. G.H.Posner, T.G.Hamill. For the synthesis of (-)- β betivone. *J. Org. Chem.* 53(1988) 6031-6035.
- [137]. P. S. Silaichev., V. O. Filimonov., P. A. Slepukhin and A. N. Maslivets. Spiroheterocyclization of Methyl 1-Aryl-3-cinnamoyl-4,5-dioxo- 4,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylates by the Action of 3-(Arylamino)-1H-inden-1-ones. *Molecules.*17(2012) 13787-13794.
- [138]. K.Takahashi, B.Witkop, A.Brossi, M.A.Maleque, E.X.Albuquerque. E. X. *Helv. Chim. Acta.* 65(1982)252-261.

- [139]. Longeon. A., Guyot. M., Vacelet. J. Araplysillins-I and-II: Biologically active dibromotyrosine derivatives from the sponge *Psammaplysilla Arabica*. *Experientia*. 46(1990)548-550.
- [140]. Kobayashi. J., Tsuda. M., Agemi. K., Shigemiri. H., Ishibashi. M., Sasaki. T., Mikami. Y., Puralidins B and C. new bromotyrosine alkaloids from the okinawan marine sponge *psammaplysilla purea*. *Tetrahedron*. 47(1991) 6617-6622.
- [141]. G.A.Cordell.; Ed. *The Alkaloids: Chemistry and Biology.*; Academic: San Diego. CA. USA.; 1998, Volume 5.
- [142]. T. H. Babu., A.A.Joseph, D.Muralidharan, T.P.. Perumal. A novel method for the synthesis of functionalized spirocyclic oxindoles by one-pot tandem reaction of vinyl malononitriles with isatylidene malononitriles. *Tetrahedron Letters*. 51(2010) 994-996.
- [143]. M.Sannigrahi. Stereocontrolled synthesis of spirocyclics. *Tetrahedron*. 55(1999) 9007-9071.
- [144] SUNDSTROM C. and NILSSON K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, 1976, **17**(5): 565-577.
- [145] LOZZIO C.B. and LOZZIO B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975, 45(3): 321-334.
- [146] WOESSMANN W. and MIVECHI N.F. Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res*, 2001, 264(2): 193-200.
- [147] MCGAHON A., BISSONNETTE R., SCHMITT M., COTTER K.M., GREEN D.R. and COTTER T.G. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, 1994, 83(5): 1179-1187.
- [148] B.Orlikova, M.Schumacher , T.Juncker, C.C.Yan, S.H.Inayat-Hussain, S.Hajjouli, C.Cerella , M.Dicato, M.Diederich. Styryl-lactonegoniothalamin inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation. *Food Chem. Toxicol* 59 (2013)572-578.
- [149] M.M.Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**(1976) 248-254.
- [150] N.Inaba , N.Sato , M.Ijichi , I.Fukazawa ,A. Nito, H.Takamizawa, G.Luben , H.Bohn. The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placenta. *Tumor Biol*. 5 (1984) 75-85.

- [151] C.L.Harding, D.R.Lloyd, C.M.McFarlane, M.Al-Rubeai. Using the Microcyte flow cytometer to monitor cell number, viability, and apoptosis in mammalian cell culture. *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 800-802.
- [152] A.Ishaque, M.Al-Rubeai. Use of intracellular pH and annexinV flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by bcl-2 over-expression in hybridoma cell culture. *J. Immunol. Methods.*221 (1998) 43-57.
- [153] A.Tinto, C.Gabernet, J.Vives, E.Prats, J.J.Cairo, L.Cornudella, F.Godia. The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *J. Biotechnol.* 95 (2002) 205-214.
- [154] M.Bouhenna, R.Salah, R.Bakour, N.Drouiche, N.Abdi, H.Grib,H. Lounici ,N.Mameri. Effects of chitin and its derivatives on human cancer cells lines. *Environ Sci Pollut Res Int.*22 (2015)15579-15586.
- [155] Jolanta Kumirska, Mirko X. Weinhold, Małgorzata Czerwicka, Zbigniew Kaczyński, Anna Bychowska, Krzysztof Brzozowski, Jorg Thöming, and Piotr Stepnowski (2011). Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity, *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, Mr Anthony Laskovski (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/13481. Available from: <https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-trends-in-materials-science/influence-of-the-chemical-structure-and-physicochemical-properties-of-chitin-and-chitosan-based-mate>.
- [156] I.Aranaz,M. Mengíbar, R. Harris, L. Paños, B. Miralles, N.Acosta, G. Galed, & Heras Á.. Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 3(2009) 203-230.
- [157] Z.Zhong, R. Chen, R.Xing, X. Chen, S. Liu, Z. Guo, X. Ji, L. Wang, L & p.Li.. Synthesis and antifungal properties of sulfanilamide derivatives of Chitosan, *Carbohydr. Res.*, 342(2007) 2390-2395.
- [158] Y.Xie, X. Liu, & Q.Chen. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivat and its antibacterial activity, *Carbohydr. Polym.* 69(2007) 142-147.
- [159] Y.I.Jeong, D.G. Kim, M.K. Jang & J.-W. Nah. Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted water-soluble Chitosan. *Carbohydr. Res.* 343(2008) 282-289.

- [160] M.Rinaudo. Chitin and chitosan: Properties and application. *Prog. Polym. Sci.* 31(2006) 603-632.
- [161] K.Kurita. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progr. Polym. Sci.* 26(2001) 1921-1971.
- [162] N.M.Alves & J.F. Mano. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 43(2008) 401-414.
- [163] W.Xia, P. Liu, J. Zhang & J.Chen. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids.* 2010
- [164] M.X.Weinhold, J.C.M.Sauvageau, N.Keddig, M.Matzke, B.Tartsch, I. Grunwald, C. Kübel, B. Jastorff, & J.Thöming. Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chem.* 1(2009) 498-509.
- [165] M.H. Struszczyk & K.J. Struszczyk. *Medical Application of Chitin and Its Derivatives;* Polish Chitin Society, Monograph XII. (2007) 139–147.
- [166] T.Kean & M.Thanou. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 62(2010) 3-11.
- [167] C.Q.Qin, Y.M.Du, L.Xiao, Z. Li & X.H. Gao. Enzymic preparation of watersoluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 31(2002a) 111-117.
- [168] Y. J. Jeon & S. K. Kim. Antitumor Activity of Chitosan Oligosaccharides Produced In Ultrafiltration Membrane Reactor System. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12(2002)503-507.
- [169] Y.Maeda, Y. & Kimura. Antitumor Effects of Various Low-Molecular-Weight Chitosans Are Due to Increased Natural Killer Activity of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Sarcoma 180–Bearing Mice. *J. Nutr.* 134(2004) 945-950.
- [170] C.Q.Qin, B.Zhou, L. Zeng, Z. Zhang, Y. Liu, Y.M. Du & L.Xiao. The physicochemical properties and antitumor activity of cellulose-treated chitosan. *Food Chem.,* 84(2004) 107-115.

- [171] C.Q.Qin, Y.M.Du, L.Xiao, X.H.Gao, J.L. Zhou & H.L. Liu. Effect of Molecular Weight and Structure on Antitumor Activity of Oxidized Chitosan. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* 7(2002b) 231-236.
- [172] K.V. Harish Prashanth & R.N. Tharanathan. Chitin/chitosan:modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends Food Sci. Technol.* 18(2007) 117-131.
- [173] S.L.Wang, T.Y.Lin, Y.H.Yen, H.F. Liao& Y.J.Chen. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr. Res.* 341(2006) 2507-2515.
- [174] C.B.Lozzio and B.B Lozzio. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45(1975) 321-334.
- [175] H.G. Drexler. *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook.* Academic Press, San Diego. 2000.
- [176] E.Klein, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, F. Vánky. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int. J. Cancer.* 18 (1976) 421-431.
- [177] L.C.Andersson, K.Nilsson, C.G.Gahmberg. K562 - A human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer.* 23(1979) 143-147.
- [178] C.Sundstrom, k.Nilsson. Establishment and characterisation of a human histocytic lymphoma cell line (U937). *Int J Cancer.* 17(1976) 565-577.
- [179] C.H.Huang, Y.C.Lee, Y.J.Chen, L.J.Wang, Y.J.Shi, L.S.Chang. Quinacrine induces the apoptosis of human leukemia U937 cells through FOXP3/miR-183/ β -TrCP/SP1 axis-mediated BAX upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 334 (2017) 35-46.
- [180] D.Yu, X.Yang, X.Lu, L.Shi, B.Feng. Ethyl acetate extract of *Peperomia tetraphylla* induces cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis in lymphoma U937 cells. *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 1802-1809.
- [181] L.Deng, R.Zhang, F.Tang, C.Li , Y.Y.Xing, T.Xi. Ursolic acid induces U937 cells differentiation by PI3K/Akt pathway activation. *Chin J Nat Med.* 12 (2014) 15-19.

- [182] J.C.Strefford, N.J. Foot, T.Chaplin, M.J.Neat, R.T.D.Oliver, B.D.Young, L.K.Jones. The characterization of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multiplex FISH. *Cytogenet Cell Genet.* 94 (2001) 9-14.
- [183] F.Folmer, M.Jaspars, G.Solano, S.Cristofanon, E.Henry, J.Tabudravu, K.Black, DH. Green, FC.Kupper, W.Aalbersberg, K.Feussner K, Dicato and M.Diederich. The inhibition of TNFalpha- induced NF-kappa B activation by marine natural products. *Biochem Pharmacol* 78 (2009) 592-606.
- [184] M.Schumacher, M.Dicato and M.Diederich. NF-kappa B Inhibitors from Terrestrial Plants Reported in 2011. *J Food Drug Anal.* 20 (2012) 250-256.
- [185] L.H. Ramdani, O.Talhi, N.Taibi, L.Delort, C.Decombat, A.Silva, K.Bachari, M.P. Vasson, and F.Caldefie-Chezet. Effects of Spirobisheterocycles on Proliferation and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* 36 (2016) 6399-6408.
- [186] Ismail, Bhaskar Kuthati , Gangadhar Thalari, Venkatesham Bommarapu, Chaitanya Mulakayala,Suresh Kumar Chitta , Naveen Mulakayala. Synthesis of novel spiro[pyrazolo[4,3-d]pyrimidinones and spiro[benzo [4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine-2,3'-indoline]-2',4(3H)-diones and their evaluation for anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 27 (2017) 1446–1450.
- [187] P.Das ,A.O. Omollo, L.J.Sitole, E.McClendon, E.J.Valente, D.Raucher, L.R.Walker, A.T.Hamme II. Synthesis and Investigation of Novel Spiro-isoxazolines as Anti-Cancer Agents. *Tetrahedron Lett.* 14 (2015) 1794-1797.
- [188] L. Zhang, W. Ren, X. Wang, J. Zhang, J. Liu, L. Zhao, X. Zhang. Discovery of novel polycyclic spiro-fused carbocyclooxindole-based anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 126 (2017) 1071-1082.
- [189] M.Ghasemia, M.Mahdavi,P.Zare and M.A. Hosseinpour Feizi. Spiroquinazolinone-induced cytotoxicity and apoptosis in K562 human leukemia cells: alteration in expression levels of Bcl-2 and Bax. *J.Toxicol.Sci.* 40 (2015) 115-126.
- [190]F.Thaler, M.Varasi, G.Carenzi, A.Colombo, A.Abate, C.Bigogno, R.Boggio, S.Carrara, T.Cataudella, R.DalZuffo, V.Reali, S.Vultaggio, G.Dondio, S.Gagliardi, S.Minucci, C.Mercurio. Spiro[chromane-2,4'-piperidine]-based histone deacetylase inhibitors with improved in vivo activity. *ChemMedChem.* 7(2012) 709-721.

- [191] O.Talhi, M.Schnekenburger, J.Panning, DGCA.Pinto, JA.Fernandes, FAA.Paz, C.Jacob, M.Diederich and AMS.Silva. Bis(4-hydroxy-2H-chromen-2-one): Synthesis and effects on leukemic cell lines proliferation and NF- κ B regulation. *Bioorg Med Chem.* 22(2014) 3008-3015.
- [192] B.Orlikova, M.Schnekenburger, M.Zloh, F.Golais, M.Diederich and D.Tasdemir. Natural Chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF- κ B. *Oncol Rep.* 28 (2012) 797-805.
- [193] J.Khazir, P.P. Singh, D.M.Reddy, I.Hyder, S.Shafi, S.D.Sawant, G.Chashoo, A.Mahajan, M.SAlam, A.K.Saxena, S.Arvinde, B.D.Gupta, H.M.Kumar HM. Synthesis and anticancer activity of novel spiro-isoxazoline and spiro-isoxazolidine derivatives of α -santonin. *Eur J Med Chem.* 63(2013) 279-289.
- [194] D.M.Reddy, N.A.Qazi, S.D.Sawant, A.H.Bandey, J.Srinivas, M.Shankar, S.K.Singh, M.Verma, G.Chashoo, A.Saxena, D.Mondhe, A.K.Saxena, V.K.Sethi, S.C.Taneja, G.N.Qazi, H.M.Sampath Kumar. Design and synthesis of spiro derivatives of parthenin as novel anti-cancer agents. *Eur J Med Chem.* 46(2011) 3210-3217.
- [195] M.A.Calzado, K.S.Lüdi, B.Fiebich, Y.Ben-Neriah, S.Bacher, E.Munoz, M.Ballero, S.Prospolini, G.Appendino, M.L.Schmitz. Inhibition of NF- κ B activation and expression of inflammatory mediators by polyacetylene spiroketals from *Plagiopus flosculosus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1729 (2005) 88 – 93.
- [196] T.D.Gilmore. Introduction: The Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Semin Cancer Biol.* 8 (1997) 61-62.
- [197] S.Reuter, S.Eifes, M. Dicato, B.B. Aggarwal, and M.Diederich. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 76 (2008) 1340-1351.
- [198] O.Fuchs. Transcription factor NF- κ B inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies. *Curr Mol Pharmacol.* 3(2010) 98-122.
- [199] B.Orlikova, W.Chaoui, M.Schumacher, M.Aadil, M.Diederich and G.Kirsch. Synthesis and bioactivity of novel aminopyrazolopyridines. *Eur J Med Chem.* 85(2014)450-457.
- [200] K.S.Ahn, G.Sethi, and B.B. Aggarwal. Reversal of chemoresistance and enhancement of apoptosis by statins through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Biochem Pharmacol.* 75 (2008) 907-913.

- [201] F.R.Greten, L.Eckmann, T.F.Greten, J.M. Park, Z.W.Li, L.J.Egan, M.F.Kagnoff, and M. Karin. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 118 (2004) 285-296.
- [202] Y.Wu, and B.P. Zhou. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 102 (2010) 639-644.
- [203] F.Balkwill. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 9 (2009) 361-371.
- [204] A.Mantovani. Cancer : Inflaming metastasis. *Nature*. (2009) 36-37.
- [205] G.Sethi, B.Sung, and B.B.Aggarwal. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 13(2008) 5094-5107.
- [206] JJ.Liu, W.Wang, DT.Dicker et al. Bioluminescent imaging of TRAIL-induced apoptosis through detection of caspase activation following cleavage of Z-DEVD-aminoluciferin. *Cancer Biol Ther*. 4(2005) 885–892.
- [207] S.Kizaka-Kondoh, S.Itasaka et al. Selective killing of hypoxia-inducible factor-1-active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 15(2009) 3433–3441
- [208] J.Hickson, S.Ackler, D.Klaubert et al. Noninvasive molecular imaging of apoptosis in vivo using a modified firefly luciferase substrate, Z-DEVD-aminoluciferin. *Cell Death Differ*. 17(2010) 1003–1010.
- [209] k.Shah, C.H.Tung , X.O.Breakefield et al. In vivo imaging of S-TRAIL-mediated tumor regression and apoptosis. *Mol Ther*. 11(2005) 926–931.
- [210] K.Kuzelova, D.Grebenova, Z.Hrkal Z. Labeling of apoptotic JURL-MK1 cells by fluorescent caspase-3 inhibitor FAMDEVD- fmk occurs mainly at site(s) different from caspase-3 active site. *Cytometry A*. 71(2007) 605–611.
- [211] C.J.A. Ribeiro, J.D. Amaral, C. M.P. Rodrigues, R.Moreira, M. M.M. Santos. Synthesis and evaluation of spiroisoxazoline oxindoles as anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22 (2014) 577–584.
- [212] L.Hamdan Ramdani, O.Talhi, N.Taibi, L.Delort, C.Decombat, A.Silva, K.Bachari, M.P.Vasson and F.Caldefie-Chezet. *Anticancer research*. 36(2016) 6399-6408.

- [213] M.Zhang, H. Liu, Z. Tian, B.N. Griffith, M.Ji,Q.Q. Li. Gossypol induces apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by modulating caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways. *Life Sciences*. 2007 (2007) 767-774.
- [214] R.S.Soderquist, A.V. Danilov, A. Eastman. Gossypol Increases Expression of the Pro-apoptotic BH3-only Protein NOXA through a Novel Mechanism Involving Phospholipase A2, Cytoplasmic Calcium, and Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem*. 289 (2014) 16190–16199.
- [215] H.Gytz, M.F. Hansen, S. Skovbjerg, A. C. M. Kristensen, S.Hørlyck, M.B. Jensen, M.Fredborg, L.D. Markert. N.A. McMillan, E.I. Christensen, P.M. Martensen. Apoptotic properties of the type 1 interferon induced family of human mitochondrial membrane ISG12 proteins.*Biol. Cell*. 109 (2017) 94-112.
- [216] L.Wei, S.F. Wang, H. Wei Gu, X. Li.A new impedimetric detection of cardiotoxicity induced by doxorubicin in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Biomed. Res*. 28 (2017) 199-201.
- [217] R.Pradhan, M.Mandal, A. Mitra, S. Das. Monitoring cellular activities of cancer cells using impedance sensing devices.*Sens Actuators B Chem*. 193 (2014) 478–483.
- [218] R.Pradhan, M.Mandal, A. Mitra, S. Das. Assessing Cytotoxic Effect of ZD6474 on MDA-MB-468 Cells Using Cell Based Sensor. *IEEE Sens J*.14(2014) 1476-1481.
- [219] O.Talhi, M. Schnekenburger J.Panning, D.G.C.A.Pinto, J.A.Fernandes, F.A.A.Paz, C.Jacob, M. Diederich, A.M.S Silva. Bis (4-hydroxy-2H-chromen-2-one): Synthesis and effects on leukemic cell lines proliferation and NF- κ B regulation. *Bioorg. Med. Chem*. 22 (2014) 3008-3015.
- [220] C. F.Lima, M.Costa, M.F.Proença, C.Pereira-Wilson. Novel structurally similar chromene derivatives with opposing effects on p53 and apoptosis mechanisms in colorectal HCT116 cancer cells. *Eur. J. Med. Chem*. 72(2015)34-45.
- [221] M.Chen-Chen, Z.P.Liu. Design and Synthesis of Coumarin Derivatives as Novel PI3K Inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*. 17(2017) 395-403.
- [222] W.Huang, M. Liu, Y. Li, Y. Tan, G. Yang, G. Design, syntheses, and antitumor activity of novel chromone and aurone derivatives.*Bioorg. Med. Chem*. 15(2007) 5191–5197.

- [223] Y.P.Sui, H.R.Huo, J.J.Xin, J.Li, X.J. Li, X.L.Du, H. Ma, H.Y. Zhou, H.D. Zhan, Z.J.Wang, C.Li, F. Sui, and M.K. Li. Antibacterial and Antitumor Activities of Biscoumarin and Dihydropyran Derivatives. *Molecules*. 2015 (2015) 17614-17626.
- [224] A.Goel, A.K. Prasad, V.S. Parmar, B. Ghosh, N. Saini. Apoptogenic effect of 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin and 7,8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in human lung adenocarcinoma cell line: role of NF-kappaB, Akt, ROS and MAP kinase pathway. *Chem. Biol. Interact.* 179(2009) 363-374.
- [225] J.S.Lopez-Gonzalez, H.Prado-Garcia, D. Aguilar-Cazares, J.A. Molina-Guarneros, J.Morales-Fuentes, J. Mandoki. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*. 43(2004) 275-283.
- [226] D.W.Nicholson, N.A. Thornberry. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 2 (1997) 299.
- [227] E.Alnemri, D. Livingston, D. Nicholson, G. Salvesen, N.Thornberry, W. Wong, and J.Yuan. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87 (1996) 171.
- [228] V.Cryns, and J.Yuan. Proteases to die for. *Genes Dev.* 12 (1998) 1551-1570.
- [229] D.W.Nicholson, A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillancourt, C.K. Ding, M. Gallant, Y.Gareau, P.R. Griffin, M. Labelle, Y.A. Lazebnik, N.A. Munday, S.M. Raju, M.E. Smulson, T.T. Yamin, V.L. Yu, and D.K. Miller. Identification and inhibition of the ICE/Ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376 (1995) 37-43.
- [230] Y.le Rhun, J. Kirkland and G.Shah. Cellular responses to DNA damage in the absence of Poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(1998) 1-10.
- [231] C.Cerella, M.H. Teiten, F. Radogna, M. Dicato, M. Diederich. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 1111-1122.
- [232] A. H.Boulares, A. G.Yakovlev, V.Ivanova, B.A.Stoica, G. Wang, S. Iyer, and M.Smulson. Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. 274 (1999) 22932-22940.

- [233] B.Plasier, D.R. Lloyd, G.C. Paul, C.R. Thomas, M. Al-Rubeai, M. Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by Annexin-V affinity assay. *J Immunol Methods*. 229(1999) 81-95.
- [234] B.Schutte, R. Nuydens, H. Geerts, F. Ramaekers. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods*. 86(1998) 63-69.
- [235] Y. S.Tan, K.K.Ooi, K.P. Ang, A. Akim, Y.K. Cheah, S.N. Abdul Halim, H.L. Seng, E.R.T. Tiekink,. Molecular mechanisms of apoptosis and cell selectivity of zinc dithiocarbamates functionalized with hydroxyethyl substituents. *J. Inorg. Biochem*. 150 (2015) 48-62.
- [236] U.Fischer, R.U.Janicke, K. Schulze-Osthoff. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10(2003) 76-100.
- [237] S.H.Kaufmann, S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.F. Davidson, G.G. Poirier. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 53(1993) 3976-3985.
- [238] P.Artursson. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit. Rev. Ther Drug Carr Systems*. 8(1991) 305-330.
- [239] P.Artursson, J. Karlsson. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelia (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Comm*.175(1991) 880-885.
- [240] W.Rubas, M. Cromwell, Z. Shahrokh. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci*. 85(1996) 165-169.
- [241] S.Sandhu, Y.Bansal, O. Silakari, and G.Bansal. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem*. 22 (2014) 3806-3814.
- [242] J.S.Lopez-Gonzalez, H. Prado-Garcia, D. Aguilar-Cazares, J.A. Molina Guarneros, J.Morales-Fuentes, J.J. Mandoki. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *LUNG CANCER*. 43(2007) 275-283.

- [243] N.Singh, J. Sarkar, K. Sashidhara, S. Ali, and S.Sinha. Anti-tumour activity of a novel coumarin–chalcone hybrid is mediated through intrinsic apoptotic pathway by inducing PUMA and altering Bax/Bcl-2 ratio. *Apoptosis*. 19(2014) 1017-1023.
- [244] N. E. B.Saidu, S.Valente, E. Bana, G. Kirsch, D. Bagrel, and M.Montenarh. Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1584-1594.
- [245] Chen-Chen, M.; Liu, ZP. Design and Synthesis of Coumarin Derivatives as Novel PI3K Inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*,2017,17(3),395-403.
- [246] F.Xie, Y. Xu, L. Wang, k. Mitchelson, W. Xing, J. Cheng. Use of cellular electrical impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity of anticancer drugs in a human kidney cell nephrotoxicity model.*Analyst*. 137(2012) 1343-1350.
- [247] J.H.Yeon, J.K Park. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip.*Anal biochem*.341(2005) 308-315.
- [248] R.Limame, A.Wouters, B. Pauwels, E. Fransen, M. Peeters, F. Lardon, O. De Wever, P. Pauwels. Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *plos one*. 7(2012) pp46536.