

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CIBLAGE DU PHÉNOTYPE CHIMIORESISTANT DU CANCER OVARIEN : IMPACT
D'UN EXTRAIT DE *XANTHIUM STRUMARIUM* L.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARBELIS FRANCISCO FERNÁNDEZ

JANVIER 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Il me faut tout d'abord exprimer mon entière reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr Borhane Annabi, pour avoir cru en mes capacités, m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son équipe de recherche. Je le remercie pour ses encouragements, ses connaissances, sa motivation et son support constant. Pour avoir dirigé et suivi mes travaux tout le long de ma maîtrise. Pour la confiance qu'il m'a toujours accordée et pour m'avoir laissé une grande autonomie de travail.

Je tiens à remercier également mon encadrante, la Dre Sylvie Lamy, pour le temps consacré et pour les précieuses informations qu'elle m'a prodiguée avec intérêt et compréhension. Pour son aide précieuse, ses conseils, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité pendant la préparation de ce mémoire, je lui adresse toute ma reconnaissance.

Mes sincères remerciements à mes amies et collègues Annie Levert et Dre Cyndia Charfi pour m'avoir appris les techniques et la dynamique du laboratoire. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre présence, votre amitié, pour tous les rires, les confidences et les bons moments que nous avons partagés ensemble depuis notre rencontre au laboratoire, ce fut très agréable de travailler avec vous.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Denis Flipo qui a répondu avec calme et patience aux questions quotidiennes, pour m'avoir guidé et épaulé, pour toutes nos discussions et les conseils donnés qui m'ont accompagnés tout au long de ma maîtrise.

Je remercie aussi vivement toute ma famille pour tout leur soutien, et principalement mes parents sans qui rien de tout cela n'était possible. Mon père Eliseo et ma mère Maricel qui m'ont toujours entouré et motivé à sans cesse devenir la meilleure; merci pour les valeurs

nobles, l'éducation et le soutien permanent que vous avez offerts. Je remercie aussi tout particulièrement ma meilleure amie, ma sœur Mariely qui n'a cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage et de générosité. Merci à mon beau-frère Eduardo pour sa grande amitié, son aide, ses conseils et pour avoir toujours pris soin de moi en tant que père et frère. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout beaucoup la leurs.

Enfin, j'adresse des remerciements à la Fondation UQAM et à la Chaire en Prévention et traitement du Cancer pour le support financier.

DÉDICACE

*À mon grand-père la spirale de ma famille,
partie inséparable de nous, qui est toujours
dans mon esprit et dans mon cœur*

*À mes parents et ma sœur pour ces longues années
de soutien inconditionnel, pour leur confiance
permanente et l'acceptation de mes choix.*

Je vous dédie aujourd'hui ma modeste réussite.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
RÉSUMÉ	xii
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Statistiques	2
1.2 Généralités sur les cancers ovariens	3
1.2.1 Épidémiologie	3
1.2.2 Facteurs de risque et de protection.....	3
1.2.3 Classification FIGO	4
1.2.4 Classification histologique	6
1.3 Carcinome de l’ovaire.....	8
1.3.1 Les sous-types histopathologiques les plus communs	8
1.3.2 Les tumeurs séreuses.....	8
1.3.3 Les tumeurs endométrioïdes.....	9
1.3.4 Les tumeurs mucineuses.....	9
1.3.5 Les tumeurs à cellules claires.....	9
1.4 Traitements standards	10
1.4.1 Chirurgie	10
1.4.2 Chimiothérapie	11
1.5 Défis thérapeutiques	13
1.6 Chimiorésistance des cancers ovariens.....	13
1.7 Avenues thérapeutiques futures.....	16
1.8 Thérapies ciblées	17
1.9 Le cancer est lié à la perturbation de la division cellulaire.....	19

1.9.1	Le cycle cellulaire	19
1.9.2	Les différentes phases du cycle cellulaire	19
1.9.3	Le contrôle du cycle cellulaire	20
1.9.4	Les complexes Cyclines-CDK et leurs régulateurs	21
1.10	La mort cellulaire programmée	23
1.10.1	Le rôle de la nécroptose dans la thérapie anticancéreuse.....	28
1.10.2	L'apoptose : Une cible pour la thérapie anticancéreuse	29
1.11	La chimioprévention par des composés naturels	30
1.11.1	Flore cubaine : Rôle dans la chimioprévention.....	32
1.11.2	<i>Xanthium strumarium</i> L.....	33
CHAPITRE II PROJET DE RECHERCHE		36
2.1	Problématique	36
2.2	Hypothèse de travail	37
2.3	Objectifs de recherche	37
CHAPITRE III TARGETING OVARIAN CANCER CELL CYTOTOXIC DRUG RESISTANCE PHENOTYPE WITH <i>XANTHIUM STRUMARIUM</i> L EXTRACT		38
3.1	Résumé.....	40
3.2	Abstract	41
3.3	Introduction.....	42
3.4	Materials and Methods.....	44
3.5	Results.....	48
3.6	Discussion	51
3.7	References.....	55
3.7	Figure Legends.....	59
CHAPITRE IV DISCUSSION		68
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		78
BIBLIOGRAPHIE.....		80

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Classification histologique du cancer de l’ovaire	7
1.2 Distribution péritonéale typique du cancer de l'ovaire primaire.....	12
1.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux médicaments anticancéreux.....	15
1.4 Les quatre phases principales du cycle cellulaire et les points de contrôle	20
1.5 Modèle classique du contrôle du cycle cellulaire	22
1.6 Caractéristiques morphologiques des cellules normales, apoptotiques et nécrotiques.....	23
1.7 Schéma des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose	25
1.8 Voies de signalisation de la nécroptose	27
1.9 <i>Xanthium strumarium</i> L.....	34
3.1 Impact of the <i>Xanthium strumarium</i> L extract on breast, ovarian and colorectal cancer cells proliferation.....	59
3.2 XFC triggers late apoptosis in ES-2 ovarian cancer cells.....	60
3.3 XFC triggers late apoptosis and necrosis in SKOV-3 ovarian cancer cells.....	61
3.4 XFC extract alters ES-2 and SKOV-3 cell cycle division	62
3.5 Preferential alteration of the tubulin cytoskeleton in the SKOV-3 ovarian cancer cells by XFC	63
3.6 XFC extract triggers PARP cleavage in SKOV-3 ovarian cancer cells.....	65

3.7 XFC extract inhibits CDK4 and cyclin D3 in SKOV-3 ovarian cancer cells 66

3.8 SKOV-3 ovarian cancer cells are resistant to the impact of XFC in a wound-healing assay 67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 La stadification du cancer de l’ovaire selon la FIGO	5

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AGFA	Alpha-difluorométhylornithine
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
Apaf-1	Facteur d'activation de peptidase apoptotique
BAX	<i>BCL2-associated X</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BH3	<i>BcL2 homology 3</i>
BRCA	<i>BReast CAncer</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CIP/KIP	<i>Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein</i>
CKI	Inhibiteurs des Cdk
CYLD	<i>Cylindromatosis</i>
Cytc	Cytochrome c
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
i.p	Intrapéritonéale
i.v	Intraveineuse
IAPs	Protéines inhibitrices de l'apoptose
INK4	<i>Inhibitors of Cdk4</i>
JUN	<i>Jun proto-oncogene</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LRP	<i>Lung Resistance-related protein</i>
Mdm2	<i>Murine double-minute 2</i>
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase domain-Like protein</i>
MRP	Protéine de multirésistance aux médicaments
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé

PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
Pgp	P-glycoprotéine
PTEN	Gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 10
RIPK	<i>Receptor interacting protein kinase</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNF-R	Récepteur au TNF
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domaine</i>
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XIAP	<i>X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein</i>

RÉSUMÉ

En 2017, plus de 206 000 Canadiens ont reçu un diagnostic de cancer, dont plus de 80 000 sont décédés. Le cancer de l’ovaire représente la cinquième cause de décès par cancer chez les femmes. Au cours de la dernière décennie, les thérapies existantes n’ont eu qu’un succès limité dans le traitement du cancer. À titre d’alternative rentable, la chimioprévention par des composés naturels attire de plus en plus l’attention. Les médicaments à base de plantes représentent déjà un large potentiel pharmaceutique, pour le traitement d’une panoplie de maladies chroniques humaines, y compris plusieurs cancers. Dans ce contexte, le but de notre étude est de caractériser les propriétés anticancéreuses de l’extrait *Xanthium strumarium* L. Ce dernier appartient à la famille *Asteraceae* qui est populairement consommée et utilisée en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Afin d’approfondir nos connaissances concernant l’impact anticancéreux de l’extrait *X. strumarium*, nous avons analysé son effet sur la survie et la prolifération de cellules cancéreuses ovariennes humaines connues pour être soit sensibles (ES-2), soit résistantes (SKOV-3) à la chimiothérapie. Afin de mieux caractériser l’effet cellulaire de l’extrait végétal, nous avons aussi évalué son impact sur l’induction de l’apoptose, le cycle cellulaire, l’organisation de l’appareil mitotique, et sur l’expression de certains biomarqueurs protéiques impliqués dans l’apoptose. Les résultats obtenus ont montré que le principal mode d’action de l’extrait de *X. strumarium* s’exerce au niveau du fuseau mitotique. En effet, nous avons montré que cet extrait est capable d’interférer avec la dynamique des microtubules, affectant aussi la transition métaphase-anaphase, provoquant l’arrêt du cycle cellulaire et induisant l’apoptose par la catastrophe mitotique (mitose avortée).

Mots clés : cancer de l’ovaire, *Xanthium strumarium* L., chimiorésistance, chimioprévention, apoptose, catastrophe mitotique, fuseau mitotique.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le cancer est le terme général utilisé pour décrire un grand nombre de maladies qui affectent les fonctions de plusieurs tissus de l'organisme. L'une de ces caractéristiques est la prolifération rapide et dérégulée de cellules anormales ou cancéreuses capables de se rassembler pour former une ou plusieurs tumeurs malignes et pour proliférer dans le corps. Les cellules cancéreuses peuvent ainsi migrer et envahir d'autres organes situés à des sites distants de la tumeur primaire. Cette caractéristique est la métastase, qui est la principale cause de morbidité et de mortalité par cancer (Organisation mondiale de la santé, 2018).

Le processus de cancérogenèse, qui est la transformation des cellules normales en cellules malignes, est un processus très complexe qui comprend une transformation «génétique/métabolique» (Costello & Franklin, 2012). L'initiation du cancer nécessite une série d'altérations génétiques telles que l'implication de mutations qui activent les oncogènes; de mutations qui inactivent les gènes suppresseurs de tumeurs et l'inactivation de gènes de stabilité, ce qui augmente ensuite les mutations d'autres gènes (Hanahan & Weinberg, 2011). Cette transformation oncogénétique entraîne le développement de cellules néoplasiques à partir de leurs cellules normales précurseurs. Cependant, le développement des cellules néoplasiques vers les cellules malignes requiert une transformation du métabolisme cellulaire. Cette transformation est essentielle afin de soutenir les exigences bioénergétiques et synthétiques de croissance et/ou de prolifération, ainsi que les phénotypes de migration/invasion associés à la malignité (Costello & Franklin, 2012).

1.1.2 Statistiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 8,8 millions de décès en 2015, ce qui représente presque un décès sur 6 à l'échelle mondiale (Organisation mondiale de la santé, 2018). Elle estime aussi que le nombre de décès par année dû au cancer continuera à augmenter pour atteindre environ 13,1 millions en 2030. En 2015, les causes les plus fréquentes de décès par cancer dans le monde étaient les cancers du poumon (avec 1,69 million de décès), du foie (avec 788 000 décès), du colon (avec 774 000 décès), de l'estomac (avec 754 000 décès) et du sein (avec 571 000 décès) (Organisation mondiale de la santé, 2018).

Au Canada, le cancer constitue la principale cause de mortalité depuis 2005 selon la Société canadienne du cancer (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2017). Elle estime que 206 200 nouveaux cas de cancer et 80 800 décès sont survenus au Canada en 2017. Les statistiques canadiennes sur le cancer en 2017 montrent que chez les hommes, la probabilité à vie de mourir d'un cancer est de 28 % (environ 1 sur 3,5), tandis que chez les femmes cette probabilité est de 24% (environ 1 sur 4,2). Il a été rapporté également que le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer chez les deux sexes, représentant approximativement 26% de tous les décès par cancer chez les deux sexes combinés. La deuxième cause de décès par cancer chez les hommes est le cancer colorectal qui est aussi la troisième cause de décès par cancer chez les femmes, représentant 12% de tous les décès attribuables au cancer. Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes, représentant 13% du total de décès. De plus, le cancer de la prostate est la troisième cause de décès par cancer chez les hommes, représentant 10% du total de décès. En général, près du 90% des nouveaux cas de cancer au Canada surviennent chez les personnes de 50 ans et plus, tandis que le 96% des décès par cancer surviennent chez les personnes entre 70 et 79 ans (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2017).

1.2 Généralités sur les cancers ovariens

1.2.1 Épidémiologie

Le cancer de l'ovaire représente la cinquième cause de décès liés au cancer chez les femmes. Celui-ci est considéré le plus meurtrier parmi les cancers gynécologiques au niveau mondial (Kurman, 2014). Au Canada, il représente aussi la principale cause de décès par tumeurs malignes gynécologiques, se classifiant huitième en incidence, mais cinquième en létalité, chez les femmes. Selon les données de la Société canadienne du cancer en 2017, 2 800 Canadiennes ont reçu un diagnostic de cancer de l'ovaire, dont 1 800 sont décédées. Actuellement, il comprend environ 4,7 % de tous les cancers féminins et le risque de cancer de l'ovaire chez les femmes est de 1 sur 69 et le risque de mourir à cause de cette maladie est de 1 sur 100. En plus, la survie relative à 5 ans (qui inclut tous les stades confondus) n'est que de 35% au Canada (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2017).

Malgré les efforts continus pour développer une chirurgie et des schémas thérapeutiques efficaces pour le traitement du cancer de l'ovaire, cette maladie présente encore un taux élevé de morbidité et de mortalité, ce qui résulte en grande partie d'un diagnostic tardif ainsi que d'une chimiorésistance croissante. En fait, environ 60 à 70% des patientes sont diagnostiquées à un stade avancé (en phase III-IV), avec une maladie largement métastatique dans la cavité péritonéale (Argento *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2012). Le diagnostic tardif est attribué au fait que le cancer de l'ovaire est souvent asymptomatique au début de la maladie, et à un stade ultérieur le patient présente des symptômes qui ne sont pas explicites et souvent confondus avec des problèmes gastro-intestinaux, tels que l'inconfort abdominal, les ballonnements, les gaz, les nausées et l'urgence urinaire (Goff *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2005).

1.2.2 Facteurs de risque et de protection

Bien que les causes initiales du cancer de l'ovaire demeurent mal connues, un certain nombre de facteurs peuvent accroître le risque qu'une femme en soit atteinte. Le facteur de risque le plus important de cancer de l'ovaire est d'origine génétique. En effet, 10% des cancers

ovariens surviennent chez des patientes ayant une prédisposition génétique et ils surviennent généralement à un âge plus précoce (Reid *et al.*, 2017). Le risque de développer cette maladie avant l'âge de 50 ans est souvent lié à une mutation des gènes BRCA 1 ou 2 (pour BRest CAncer 1 ou 2), deux gènes suppresseurs de tumeurs associés à certains cancers du sein et de l'ovaire (Gloss & Samimi, 2014; Weiderpass & Tyczynski, 2015). Un autre facteur héréditaire est le syndrome de Lynch (également appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose). C'est une maladie peu courante, mais les femmes atteintes par ce syndrome ont un risque plus élevé de développer un cancer colorectal et d'autres cancers, y compris le cancer de l'ovaire (Bonadona *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2009). En plus de la susceptibilité génétique, d'autres facteurs de risque classiquement retrouvés sont le vieillissement, l'âge à la ménopause, la nulliparité, les antécédents médicaux, le syndrome des ovaires polykystiques chez les femmes plus jeunes, les facteurs liés au mode de vie comme l'alimentation, le tabagisme et l'obésité (Reid *et al.*, 2017).

Néanmoins, il a été démontré que certains facteurs de protection tels que l'usage de contraceptifs oraux, la ligature des trompes, l'hystérectomie, le nombre de grossesses et l'allaitement sont associés à une réduction du risque d'être atteint par cette maladie (Gates *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2017).

1.2.3 Classification FIGO

La stadification est une mesure de l'étendue de la maladie cancéreuse car elle décrit ou classe un cancer en fonction de la quantité de cancer présente dans le corps et de son emplacement lors du diagnostic initial. Le stade du cancer de l'ovaire est établi lors d'une intervention chirurgicale visant à enlever les ovaires et la plus grande partie possible du tissu dans lequel le cancer s'est propagé. En cancer de l'ovaire, le système de stadification le plus utilisé est la classification selon les critères de la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO). La dernière classification FIGO pour le cancer de l'ovaire a été publiée par Jaime Prat au nom du Comité de la Gynécologie oncologique (Prat & FIGO, 2014). Le Tableau 1.1 décrit un résumé sur ces classifications.

Tableau 1.1. La stadification du cancer de l'ovaire selon la FIGO. [Adapté de Prat & FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2014]

Stade principal	Sous-classification
I tumeur limitée aux ovaires ou aux trompes de Fallope	IA tumeur limitée à un ovaire, capsule intacte sans tumeur à la surface ovarienne, absence de cellule maligne dans l'ascite ou le lavage péritonéal
	IB tumeur limitée aux deux ovaires, capsule intacte sans tumeur à la surface ovarienne, absence de cellule maligne dans l'ascite ou le lavage péritonéal
	IC tumeur limitée à un ou aux deux ovaire(s) avec l'un des éléments suivants: <i>IC1: déversement chirurgical peropératoire</i> <i>IC2: tumeur à la surface ovarienne</i> <i>IC3: cellules malignes dans l'ascite ou le lavage péritonéal</i>
II tumeur touchant un ou deux ovaire(s) ou les trompes de Fallope avec extension pelvienne ou le cancer péritonéal primaire	IIA extension et/ou implants sur l'utérus et/ou les trompes de Fallope et/ou les ovaires.
	IIB extension à d'autres tissus pelviens intrapéritonéaux
III tumeur touchant un ou deux ovaire(s) ou les trompes de Fallope, ou le cancer péritonéal primaire, avec la propagation confirmée cytologiquement ou histologiquement du péritoine extrapelvien et/ou la métastase aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux	IIIA ganglions rétropéritonéaux positifs uniquement (cytologiquement ou histologiquement prouvés)
	IIIB métastase péritonéale macroscopique au-delà du pelvis jusqu'à 2 cm dans sa plus grande dimension, avec ou sans métastases aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux
	IIIC métastase péritonéale macroscopique au-delà du pelvis de plus de 2 cm dans sa plus grande dimension, avec ou sans métastases aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux (y compris l'extension de la tumeur à la capsule du foie et la rate sans atteinte parenchymateuse de l'un ou l'autre organe)
IV métastase à distance excluant les métastases péritonéales	

1.2.4 Classification histologique

Le cancer de l'ovaire est une maladie hétérogène qui présente une grande diversité de malignités. Selon la dernière classification de l'OMS en 2014, les tumeurs cancéreuses de l'ovaire peuvent être classées selon le type de cellules dans lequel le cancer apparaît. Leurs différentes origines ont permis leur classification en 3 groupes histologiques principaux: les tumeurs épithéliales, les tumeurs germinales, les tumeurs des cordons sexuels et du stroma gonadique et autres non classifiées. Ces tumeurs proviendraient respectivement de l'épithélium de surface, des ovocytes et de leurs précurseurs et des différents éléments du stroma, incluant la granulosa et la thèque (Kurman, 2014).

Parmi les tumeurs ovariennes, les carcinomes (tumeurs épithéliales malignes) sont les plus fréquents, représentant approximativement le 90% de toutes les tumeurs ovariennes. Elles sont subdivisées en fonction du type histologique du revêtement épithélial qui les compose: carcinomes séreux, endométrioïdes, mucineux, séro-mucineux, à cellules claires, Brenner malignes, et indifférenciés (McCluggage, 2011; Meinhold-Heerlein *et al.*, 2016) (figure 1.1).

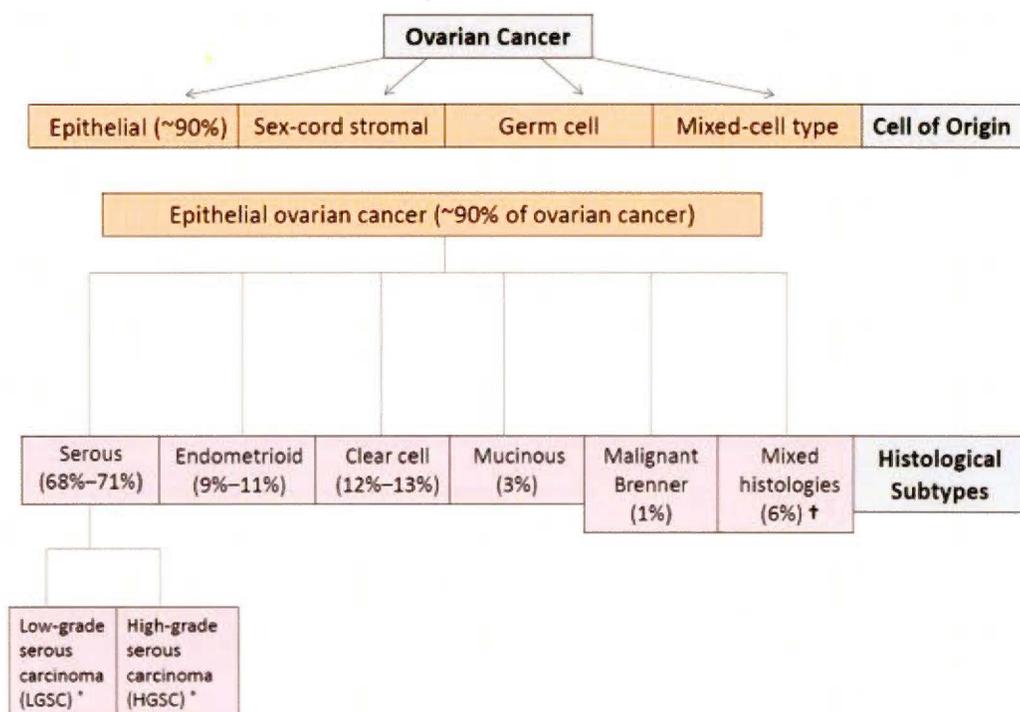


Figure 1.1 Classification histologique du cancer de l'ovaire. Classification du cancer de l'ovaire épithélial et prévalence des sous-types histologiques. [Adapté de Rojas *et al.*, 2016]

1.3 Carcinome de l'ovaire

1.3.1 Les sous-types histopathologiques les plus communs

1.3.2 Les tumeurs séreuses

Les carcinomes séreux sont les plus fréquents et représentent plus de 50% des tumeurs épithéliales de l'ovaire, ce qui correspond à plus de 80% de tous les cas de cancers ovariens (Kurman, 2014). Les cellules cancéreuses de type séreux, lorsqu'elles sont bien ou modérément différenciées, présentent une architecture glandulaire ou papillaire qui ressemble à l'épithélium de surface papillaire de la trompe de Fallope. Par ailleurs, ils sont traditionnellement subdivisés en deux groupes: les carcinomes séreux de bas grade et les carcinomes séreux de haut grade (McCluggage, 2011).

Les carcinomes séreux de bas grade sont les moins fréquents (15% des carcinomes séreux et 2% des carcinomes ovariens). Généralement, ils touchent les femmes plus jeunes que celles avec un carcinome séreux de haut grade (âge médian 43 ans versus 64 ans) (Kurman, 2014). Ils sont diploïdes et présentent de faibles niveaux d'instabilité chromosomique. Ces carcinomes séreux de bas grade ont une progression lente, avec une survie médiane de 4,2 ans et une survie à 5 ans de 40% (Malpica *et al.*, 2004).

Le carcinome séreux de haut grade est un néoplasme agressif qui apparaît rapidement, c'est la forme plus fréquente représentant 85 à 90% des carcinomes séreux et 60% de l'ensemble des carcinomes ovariens (Kurman, 2014). Ces types de carcinomes sont la variante plus observée dans les cancers héréditaires avec mutations constitutionnelles des gènes BRCA. Ils sont aneuploïdes et génétiquement très instables avec une fréquence élevée de mutations dans le gène TP53 « *tumor protein 53* » (Vang *et al.*, 2009). Habituellement, ces néoplasmes agressifs répondent bien au début à la chimiothérapie, mais ils ont un haut degré de récurrence. Généralement, la survie à 5 ans pour le carcinome séreux de haut grade est de 9% avec une survie médiane de 1,7 (Malpica *et al.*, 2004).

1.3.3 Les tumeurs endométrioïdes

Les tumeurs de sous-type endométrioïdes sont le deuxième type histologique le plus fréquent, et représentent environ 10% de tous les cancers ovariens. Les carcinomes endométrioïdes se développent à partir de foyers d'endométriose et ils présentent des événements moléculaires similaires à ceux observés dans les adénocarcinomes endométrioïdes utérins. Ceux-ci comprennent des mutations des gènes PTEN (gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 10), KRAS (gène stimulant la croissance et la prolifération tissulaire), β -caténine et l'instabilité des microsatellites, mais n'expriment pas de mutations dans le gène TP53 (McCluggage, 2011). De plus, le pronostic de survie globale à 5 ans du carcinome endométrioïde est d'environ 64,8%, ce qui est beaucoup mieux comparé à celui associé au carcinome séreux (Mackay *et al.*, 2010).

1.3.4 Les tumeurs mucineuses

Les carcinomes mucineux ovariens primaires sont relativement rares, représentant environ 3% des carcinomes ovariens primaires. Cependant, ils touchent un large groupe d'âge, y compris parfois les enfants et les adolescentes (Köbel *et al.*, 2010). Les carcinomes mucineux sont les carcinomes avec une mucosécrétion de type intestinal. En effet, la plupart des tumeurs mucineuses sont en réalité des métastases provenant de cancers gastro-intestinaux tels que le cancer du côlon ou de l'estomac (McCluggage, 2011). Par ailleurs, les tumeurs mucineuses ovariennes de type intestinal présentent généralement des mutations KRAS. En outre, il a été démontré que les zones bénignes et malignes au sein du même néoplasme peuvent présenter des mutations KRAS identiques, suggérant que la mutation KRAS est un événement précoce dans l'évolution de ces types des tumeurs (Gemignani *et al.*, 2003).

1.3.5 Les tumeurs à cellules claires

Les carcinomes à cellules claires sont généralement associés à des lésions d'endométriose et coexistent avec le carcinome endométrioïde dans 25% des cas. Ils sont typiquement composés de cellules avec un cytoplasme clair abondant, souvent avec des membranes

cellulaires proéminentes (DeLair *et al.*, 2011). La plupart des carcinomes à cellules claires sont diagnostiqués à un stade précoce (stade I ou II), affectant les femmes plus jeunes avec une moyenne de 55 ans. Leur pronostic de survie globale à 5 ans est de 60%, mais la survie des tumeurs de stade I est de 85% (Anglesio *et al.*, 2011). Elles sont caractérisées par un faible taux de prolifération, une stabilité génétique relative, et celles-ci ne présentent pas de mutation du gène TP53. Le carcinome à cellules claires peut être associé au syndrome de Lynch ou à l'endométriase et constitue le cancer ovarien le plus courant avec des symptômes paranéoplasiques (thrombose ou hypercalcémie) (Chene *et al.*, 2015).

1.4 Traitements standards

La prise en charge multidisciplinaire est essentielle afin d'offrir le meilleur plan de traitement possible aux patientes. Ce plan est basé sur les caractéristiques du cancer (type histologique), le stade (degré d'extension) et le grade (degré d'agressivité), ainsi que l'âge, l'état de santé global et les antécédents médicaux. Cependant, la base du traitement est toujours la combinaison de la chirurgie cytoréductrice et de la chimiothérapie. Néanmoins, même avec un traitement optimal, la survie médiane à 5 ans est inférieure à 50% (Horner *et al.*, 2009) et dans le cas du cancer de l'ovaire avancé, elle tombe à moins de 25%. En plus, jusqu'à 70% de toutes les patientes diagnostiquées avec un cancer de l'ovaire rechutent avec une reprise de la maladie, souvent létale chez la plupart et finissent par succomber à leur maladie (Romero & Bast, 2012).

1.4.1 Chirurgie

La chirurgie demeure la pierre angulaire de la prise en charge des cancers de l'ovaire, car elle est souvent requise au départ pour établir le diagnostic, documenter le stade de la maladie et obtenir une cytoréduction optimale (Coleman *et al.*, 2013). Le but est de réaliser à la fois la cytoréduction thérapeutique complète plus une classification correcte du type histologique et de la stadification. Celles-ci sont les deux facteurs les plus importants pour le diagnostic des tumeurs ovariennes, lesquelles requièrent un échantillonnage extensif qui ne peut être obtenu par biopsie (Coleman *et al.*, 2013). La définition de la cytoréduction optimale a évolué au

cours des années. Il existe actuellement un consensus dans lequel elle a été définie comme une résection chirurgicale ne laissant aucun résidu macroscopique en place plutôt qu'une maladie résiduelle $<1 \text{ cm}^3$, comme précédemment accepté (Stuart *et al.*, 2011). Au fil des années, il y a eu un afflux des données qui concluaient qu'une cytoréduction complète, sans maladie résiduelle globale, offre les meilleurs résultats en matière de survie (Chang *et al.*, 2013; Fotopoulou *et al.*, 2013). Cependant, même chez les patientes ayant une cytoréduction complète, le taux de récurrence est élevé (supérieur à 50%), ce qui est associé à de faibles taux de survie, en particulier chez les patientes atteintes de maladie péritonéale (Ozols *et al.*, 2003).

1.4.2 Chimiothérapie

À la suite d'une chirurgie de cytoréduction, la chimiothérapie sert à détruire les cellules tumorales résiduelles, à gérer et réduire les symptômes associés au cancer, ainsi qu'à prévenir un risque sérieux de récurrence ou de métastase (chimiothérapie adjuvante). Dans le cas du cancer épithélial avancé de l'ovaire, une combinaison des médicaments à base de platine, comme la carboplatine ou la cisplatine (agents alkylants classiques), et avec des médicaments à base de taxane (agents antimitotiques), comme du paclitaxel (Taxol) ou du docétaxel sont considérés comme un traitement adjuvant standard. Généralement, la chimiothérapie de première ligne consiste souvent en 6 cycles de Taxol/carboplatine séparés par intervalles de trois ou quatre semaines (Bell *et al.*, 2006). Cependant, dans un nombre croissant de cas, une chimiothérapie initiale (chimiothérapie néoadjuvante) est administrée afin de réduire la masse tumorale pour faciliter son enlèvement par la suite. Cette méthode est utilisée particulièrement chez les patientes qui ne sont pas des candidates idéales pour une intervention chirurgicale ou chez des patientes atteintes d'une maladie étendue dont la cytoréduction est peu envisageable (Vergote *et al.*, 2010).

La voie d'administration de la chimiothérapie pour le cancer de l'ovaire a traditionnellement été intraveineuse (i.v). Cependant, l'administration de chimiothérapie intrapéritonéale (i.p) est très utilisée dans le cas de patientes qui présentent une dissémination et une rechute quasi exclusivement péritonéale, même chez les patientes qui ont subi une chirurgie apparemment

curative et une chimiothérapie adjuvante (figure 1.2) (Coleman *et al.*, 2013). Il a été constaté que certains médicaments étaient éliminés lentement de la cavité péritonéale, ce qui signifie qu'une concentration élevée du médicament peut être administrée par voie i.p, sans entraîner de surdosage systémique du médicament. Les médicaments qui sont particulièrement adaptés à la distribution i.p ont un poids moléculaire élevé et sont solubles dans l'eau tels que le cisplatine, ce qui entraîne une clairance systémique péritonéale retardée, mais élevée, donnant un avantage pharmacologique pour traiter la maladie péritonéale (Fujiwara *et al.*, 2013). Le cancer de l'ovaire est un cancer idéal pour ce type de traitement et les patientes qui ont reçu la chimiothérapie i.p ont augmenté significativement la survie globale médiane (Gonzalez *et al.*, 2011).

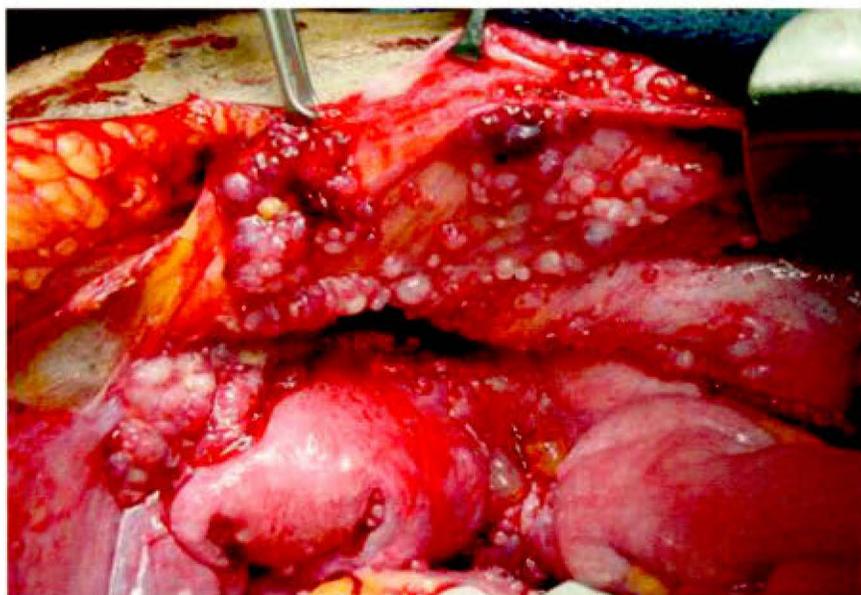


Figure 1.2 Distribution péritonéale typique du cancer de l'ovaire primaire. [Adapté de Coleman *et al.*, 2013]

1.5 Défis thérapeutiques

Bien que les traitements comme la chirurgie et la chimiothérapie soient continuellement améliorés, plus de 90% des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé mourront encore en raison de l'échec clinique de la chimiothérapie (Coukos, 2008). D'une part, la toxicité de ces médicaments ainsi que leurs effets secondaires indésirables peuvent limiter considérablement leur utilisation et, en raison de l'absence fréquente d'agents alternatifs tout aussi efficaces, les chances de survie des patientes peuvent être compromises (Markman, 2007; Morgan *et al.*, 2016). Cependant, le principal obstacle au succès du traitement du cancer de l'ovaire est le développement de la résistance aux médicaments, entraînant une survie globale de 30 à 40% sur 5 ans (Romero & Bast, 2012). En fin de compte, presque toutes ces femmes mourront de la maladie et la plupart mourront éventuellement d'une résistance à la chimiothérapie au platine. De toute évidence, il est nécessaire de progresser davantage dans la résolution de ce problème.

1.6 Chimiorésistance des cancers ovariens

Au cours de la chimiothérapie primaire, environ 70% des patientes avec cancer de l'ovaire répondront au platine seul ou en association avec le paclitaxel (Sandercock *et al.*, 2002). Néanmoins, la plupart d'entre elles finissent par rechuter à cause d'un développement de pharmacorésistance, qui est généralement incurable (Agarwal & Kaye, 2003). Certaines patientes rechutent dans les 6 mois et il est peu probable qu'elles répondent de nouveau avec le même régime de traitement, et ont une courte survie en raison d'une résistance au platine (Davis *et al.*, 2014). D'autres patientes ont des rechutes tardives avec une maladie sensible au platine et une survie nettement plus longue. À l'heure actuelle, il n'existe pas de pronostique efficace qui permette de connaître à l'avance les patientes qui sont destinées à avoir une maladie résistante au sensible ou platine (Davis *et al.*, 2014).

En termes cliniques, la chimiorésistance fait référence à une maladie progressive où les cellules cancéreuses reprennent leur croissance malgré les traitements de chimiothérapie. Cette problématique survient à des doses de traitements médicamenteux associés à une

toxicité gérable car la plupart des agents chimiothérapeutiques ont un indice thérapeutique bas. Même des changements minimes dans la sensibilité des cellules tumorales chez les patientes peuvent les rendre cliniquement résistantes (Coukos *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes sous-jacents de la résistance aux médicaments cliniques restent à être élucidés, ils sont logiquement classés dans trois grandes catégories: la pharmacocinétique, le microenvironnement tumoral et la spécificité des cellules cancéreuses (figure 1.3) (Agarwal & Kaye, 2003). L'échec du traitement pharmacocinétique repose sur l'hypothèse que les cellules tumorales sont exposées à des doses insuffisantes d'agents chimiothérapeutiques. Les données expérimentales indiquent que pour obtenir la mort maximale des cellules tumorales, la chimiothérapie doit être administrée à la dose maximale tolérée. En plus, des études rétrospectives suggèrent qu'à une dose intraveineuse plus élevée, l'émergence d'une population de cellules résistantes aux médicaments est retardée mais pas empêchée (Pedrazzoli *et al.*, 2006). D'autre part, une concentration intratumorale insuffisante du médicament peut être due à de faibles biodisponibilités en raison du métabolisme des médicaments hépatiques, la clairance rénale et la vascularisation tumorale (Agarwal & Kaye, 2003).

Le microenvironnement tumoral permet l'acquisition par les cellules tumorales de diverses propriétés telles que la néoangiogénèse, la progression tumorale et la chimiorésistance (Coukos, 2008). Il a été suggéré que les interactions directes cellules-cellules, les interactions cellules-matrice extracellulaire ainsi que les interactions induites par des cytokines et des facteurs de croissance sécrétés par les cellules stromales peuvent déclencher des cascades de voies de signalisation induisant entre autres des signaux de survie et des signaux anti-apoptotiques aux cellules tumorales (Thibault *et al.*, 2014).

Les facteurs spécifiques des cellules cancéreuses font référence aux modifications génétiques, épigénétiques et d'expressions géniques intrinsèques et acquises somatiquement qui modifient les voies de réponse cellulaire conduisant à la mort cellulaire suite à l'exposition à des agents cytotoxiques. Il existe de nombreuses hypothèses qui suggèrent que la résistance aux médicaments se développe à la suite de mutations somatiques progressivement acquises ou à des changements épigénétiques au sein des cellules tumorales qui échappent à la mort

cytotoxique initiale et deviennent ainsi résistantes (Duesberg & Rasnick, 2000). D'autre part, étant donné que les agents cytotoxiques sont principalement efficaces contre les cellules en prolifération, il est possible que les cellules quiescentes tumorales montrent un certain degré de résistance aux médicaments par rapport aux cellules proliférantes (Faurobert *et al.*, 2015).

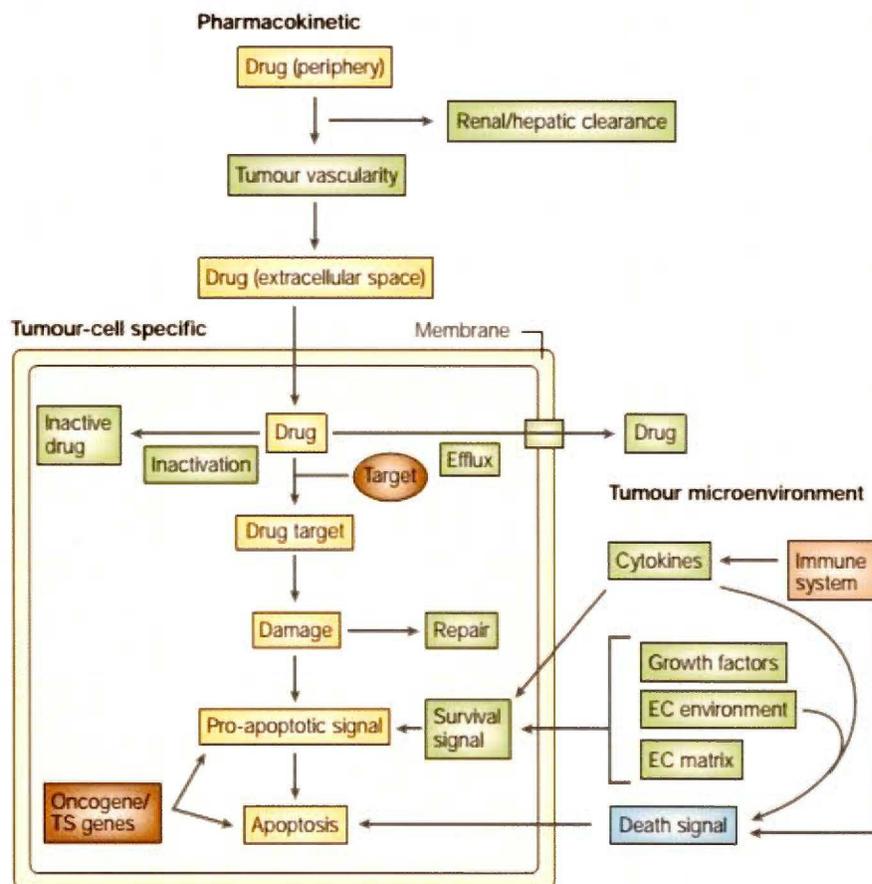


Figure 1.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux médicaments anticancéreux. La chimiorésistance peut être due à la pharmacocinétique, au microenvironnement tumoral ou aux problèmes spécifiques des cellules cancéreuses. Tous ces facteurs influencent la réponse de la chimiothérapie en affectant principalement la concentration intracellulaire de médicament actif, les interactions cible-médicament, le degré de lésion cellulaire induite, la signalisation apoptotique induite par la lésion ou la machinerie

effectrice apoptotique. TS genes: gènes suppresseurs de tumeur; EC matrix: matrice extracellulaire. [Adapté de Agarwal & Kaye, 2003].

En outre, les cellules tumorales peuvent amplifier certains gènes, provoquant une production excessive de protéines qui rendent l'agent anticancéreux en question inefficace. Par exemple, il a été prouvé que la régulation positive de plusieurs oncogènes tels que AKT1 ou 2 « *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* », BAX « *BCL2-associated X* », BCL2 « *B-cell CLL/lymphoma 2* », KRAS « *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* », NFKB1 « *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* » et JUN « *jun proto-oncogene* » sont associés à la résistance aux médicaments dans le cancer de l'ovaire (Liu *et al.*, 2014b). De même, des études antérieures ont indiqué que des gènes suppresseurs de tumeurs (par exemple BRCA1, BRCA2, MLH1, TP53 et p21) contribuent à la résistance aux médicaments par une augmentation de la tolérance aux dommages à l'ADN (Yin *et al.*, 2013). De plus, les cellules cancéreuses peuvent également acquérir la capacité d'expulser certains médicaments via les membres des protéines transporteurs ABC « *ATP binding cassette* ». Les altérations de l'afflux et de l'efflux de médicaments par des protéines de transport membranaire telles que la P-glycoprotéine (Pgp), la protéine de multirésistance aux médicaments (MRP) et la protéine de résistance pulmonaire LRP « *Lung Resistance-related protein* » peuvent affecter leur concentration intracellulaire (Agarwal & Kaye, 2003). Plusieurs études ont démontré que l'expression de Pgp et MRP1 étaient cliniquement significatives chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire. En plus, il a été suggéré que Pgp et MRP1 peuvent être des facteurs prédictifs et pronostiques fiables en ce qui concerne la réponse thérapeutique chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire (Sedlakova *et al.*, 2015).

1.7 Avenues thérapeutiques futures

Étant donné que la résistance à la chimiothérapie chez les femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire au stade avancé est un problème clinique majeur et que la chimiothérapie ne doit pas être utilisée chez elles, il faut les référer vers un autre type de traitement primaire ciblé. Les

nouvelles opportunités pour ces patientes incluent l'immunothérapie avec des anticorps antitumoraux spécifiques, et une caractérisation morphologique précise des tumeurs ovariennes individuelles afin d'adapter les thérapies envers ces patientes.

1.8 Thérapies ciblées

Les approches thérapeutiques ciblées évaluées dans les essais cliniques comprennent l'inhibition de l'angiogenèse par les inhibiteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Dans ce contexte, le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF humanisé, est l'agent anti-angiogénique qui a montré l'activité la plus prometteuse dans plusieurs essais cliniques sur le cancer de l'ovaire récurrent (Ledermann *et al.*, 2011). Selon Burger *et al.*, une durée de réponse médiane de 10 mois a été rapportée chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire récurrent traitées par bevacizumab 15 mg/kg pendant 21 jours en monothérapie (Burger *et al.*, 2007). De façon similaire, d'autres études de phase III ont rapporté une amélioration de la survie sans progression avec l'ajout de bevacizumab à la chimiothérapie dans les deux types des cancers de l'ovaire avancés et récidivants (sensibles et résistants au platine) (Aghajanian *et al.*, 2012; Burger *et al.*, 2011; Perren *et al.*, 2011; Pujade-Lauraine, 2012). Un autre avantage de ce type de thérapie c'est la réduction des effets secondaires du bevacizumab par rapport à ceux de la chimiothérapie de type paclitaxel/carboplatin (Burger *et al.*, 2011). Cependant, les défis clés présentés par la thérapie anti-angiogénique avec le bevacizumab comprennent la résistance secondaire développée à la suite du traitement ainsi qu'à l'absence de marqueurs prédictifs de l'efficacité de la thérapie (Jubb & Harris, 2010).

Les inhibiteurs de poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) constituent l'une des nouvelles classes d'agents ciblés les plus intéressantes pour le traitement du cancer de l'ovaire lié aux femmes porteuses de mutations BRCA1/2 (environ 50-60% des cancers de l'ovaire séreux (Hennessy *et al.*, 2010; Weiderpass & Tyczynski, 2015). Les protéines nucléaires PARP-1 et -2 sont impliquées dans multiples voies de réparation de l'ADN, car leur principale action est l'excision de bases lors de la réparation des cassures d'ADN simple brin (Liu *et al.*, 2014a). D'autre part, les cancers avec des mutations BRCA1/2 sont déficients de la voie de réparation

par recombinaison homologue et ne peuvent pas réparer les cassures d'ADN double brin induites par les composés du platine (Bhattacharyya *et al.*, 2000). Par conséquent, dans les cellules déficientes en BRCA1/2, l'inhibition de l'activité enzymatique de PARP entraîne une accumulation des cassures d'ADN simple brin qui sont convertis à des cassures d'ADN double brin. Ces cassures d'ADN non réparées entraînent l'arrêt du cycle cellulaire et la mort, ce phénomène est appelé « létalité synthétique » puisqu'en soi le blocage d'une de ces deux voies est viable pour la cellule, mais la combinaison des deux ne l'est pas (Liu *et al.*, 2014a). Les inhibiteurs de PARP ont produit des taux de réponse de plus de 40% dans les cancers de l'ovaire avec des mutations BRCA1/2 (Audeh *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de PARP qui ont été testés ou sont actuellement en cours de test chez des patientes atteints d'un cancer de l'ovaire dans le cadre d'une étude de phase I, II ou III comprennent l'olaparib qui était le premier inhibiteur de PARP testé, le véliparib, le niraparib et le rucaparib (Coleman *et al.*, 2015; Liu & Matulonis, 2016).

Le traitement du cancer de l'ovaire demeure toujours un défi malgré de nombreuses avancées thérapeutiques. Il y a encore place pour examiner les meilleures façons d'utiliser des médicaments connus et les résultats des essais au cours des prochaines années augmenteront encore nos connaissances sur l'utilisation optimale de la chimiothérapie. De plus, les thérapies ciblées sont des avenues thérapeutiques plus qu'intéressantes; les agents ciblant sont prometteurs dans de nombreuses situations, ont une bonne efficacité initiale et ont généralement moins de toxicité que la chimiothérapie conventionnelle. La thérapie moléculaire ciblée est une façon élégante de traduire les découvertes de la biologie moléculaire en avancée spectaculaire. Par contre, les thérapies ciblées testées jusqu'à présent induisent presque toujours de la résistance secondaire chez les patientes qui répondent initialement au traitement (Edwards *et al.*, 2008; Norquist *et al.*, 2011). Dans l'état actuel des connaissances, les thérapies ciblées ne sont possiblement pas le traitement définitif du cancer. À ceci se rajoute leur coût excessif qui limite actuellement leur utilisation massive par les systèmes de santé.

1.9 Le cancer est lié à la perturbation de la division cellulaire

1.9.1 Le cycle cellulaire

Au cours des dernières années, une vaste littérature a illustré la pertinence de la dérégulation du cycle cellulaire dans le cancer humain. Les cellules tumorales accumulent des mutations qui résultent en une signalisation mitogène constitutive qui contribuent à la prolifération non programmée (Viallard *et al.*, 2001). De plus, la plupart des tumeurs acquièrent une instabilité génomique qui conduit à des mutations supplémentaires ainsi qu'à de l'instabilité chromosomique (des changements numériques dans les chromosomes) (Duesberg & Rasnick, 2000). En conséquence, comprendre les détails moléculaires de la régulation du cycle cellulaire et les anomalies des points de contrôle dans le cancer offre un aperçu des stratégies thérapeutiques potentielles.

1.9.2 Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire eucaryote prototypique est divisé en quatre phases: G1, S, G2 et M (figure 1.4). La phase G1 «gap 1», c'est une phase de croissance cellulaire et de préparation à la réplication de l'ADN. La phase S (synthèse de l'ADN), les chromosomes se répliquent afin de former deux brins complémentaires identiques (chromatides sœurs). Les cellules dans la phase G2 «gap 2» se préparent pour entrer en mitose (M). La phase M est séparée en 4 étapes différentes: la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Dans la prophase, les chromosomes se condensent, la membrane nucléaire se fragmente et le fuseau mitotique commence à se former. Pendant la métaphase, les chromosomes se placent sur le plan équatorial de la cellule, les centrioles se placent aux pôles cellulaires et les microtubules se lient aux centromères. Au cours de l'anaphase, les chromatides sœurs se séparent vers les pôles cellulaires. À la fin dans la télophase, les chromosomes se décondensent, et l'enveloppe nucléaire se reforme, cette phase se termine par la cytokinèse, qui complète le programme de division cellulaire avec la formation de deux cellules filles en phase G1 séparées par une membrane plasmique (Harvey Lodish *et al.*, 2008).

1.9.3 Le contrôle du cycle cellulaire

La progression à travers le cycle cellulaire est régulée à des points de contrôle distincts. Les principaux points de contrôle sont à l'entrée dans la phase S (passage de G1-S), dans la mitose (passage de G2-M) et le point de contrôle du fuseau mitotique qui contrôle la progression dans l'anaphase (figure 1.4). Le déroulement correct des phases successives du cycle cellulaire est assuré par les cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (Cdk; « *cyclin dependent kinase* »), et les inhibiteurs Cdk « *cyclin dependant kinase inhibitor* ou CKI » (Satyanarayana & Kaldis, 2009). Ces familles de protéines régulatrices jouent des rôles clés dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Des défauts dans les points de contrôle du cycle cellulaire peuvent entraîner des mutations génétiques, des lésions chromosomiques et l'aneuploïdie, qui peuvent toutes contribuer à la tumorigenèse.

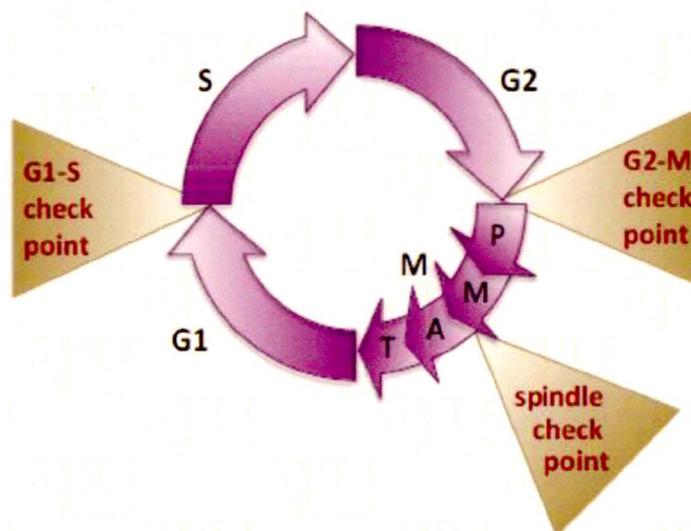


Figure 1.4 Les quatre phases principales du cycle cellulaire et les points de contrôle. La phase G1 c'est une période de croissance cellulaire et de préparation pour la réplication de l'ADN où les protéines nécessaires sont synthétisées. Dans la phase de synthèse (S), s'effectue la réplication du matériel génétique, à la fin de cette phase chaque chromosome comporte 2 molécules d'ADN double hélice identiques. Dans la phase G2 les cellules se développent souvent également et se préparent pour entrer en mitose (M). Enfin, dans la phase M les chromatides sœurs sont séparées et distribuées aux cellules filles nouvellement formées. La

progression dans le cycle cellulaire est contrôlée à des points de contrôle distincts. Les principaux points de contrôle sont à l'entrée dans la phase S (point de contrôle G1-S) et la mitose (point de contrôle G2-M) et le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique qui contrôle la progression dans l'anaphase. [Adapté de Harashima *et al.*, 2013].

1.9.4 Les complexes Cyclines-CDK et leurs régulateurs

Les complexes Cyclines-Cdk sont des complexes enzymatiques dimériques, constitués d'une sous-unité catalytique, la protéine kinase cycline-dépendante (Cdk) et d'une sous-unité régulatrice, la cycline, nécessaire pour l'activation de Cdk (Lim & Kaldis, 2013). Le nombre de Cdk et de cyclines a considérablement augmenté au cours de l'évolution. À ce jour, il y a 21 gènes codants pour Cdk et 29 gènes codants pour des cyclines dans le génome humain (Malumbres *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, les cyclines de type A, B, D, E ainsi que les Cdk1, 2, 4 et 6 ont été identifiées comme les principaux régulateurs du cycle cellulaire. L'expression des Cdk reste relativement constante tout au long du cycle cellulaire alors que les cyclines sont synthétisées et dégradées de manière cyclique selon les différentes phases du cycle (Sánchez & Dynlacht, 2005). Selon le modèle de cycle cellulaire classique (figure 1.5), en phase G1 précoce, les signaux mitogéniques sont d'abord détectés et intégrés par l'expression des cyclines de type D (D1, D2 et D3) qui se lient préférentiellement à Cdk4 et Cdk6 pour les activer (Sherr & Roberts, 2004). À la fin de la phase G1, Cdk2 est activé en se liant aux cyclines de type E (E1 et E2) essentielles pour conduire la transition G1/S (Ohtsubo *et al.*, 1995). La Cdk2 est ensuite activée par la cycline A2 (cycline A1 dans les cellules germinales) pendant les derniers stades de la réplication de l'ADN pour conduire la transition de la phase S/G2. Enfin, Cdk1 est activé par des cyclines de type A à la fin de l'interphase pour faciliter l'apparition de la mitose. La cycline A est exprimée tout au long des phases S et G2 et est requise pour la réplication de l'ADN (Geley *et al.*, 2001). Après la dégradation de l'enveloppe nucléaire, les cyclines de type A sont dégradées, ce qui facilite la formation des complexes Cdk1-cycline B responsable de la progression à travers la phase M (Bai *et al.*, 2017).

Les inhibiteurs des Cdk ou CKI sont classés en deux familles de protéines selon leurs structures et leurs propriétés fonctionnelles: les familles INK4 « *Inhibitors of Cdk4* » et CIP/KIP « *Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein* » (Lim & Kaldis, 2013). Les INK4s regroupent: p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}. Ces inhibiteurs forment des complexes avec Cdk4-6 et inhibent leur activité kinase, interférant avec leur association aux cyclines de type D induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Sherr & Roberts, 1999). La famille CIP/KIP est composée de trois membres: p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}. Ils s'associent à un spectre plus large des complexes cycline/Cdk déjà formés, inhibant leurs activités. Ces complexes comprennent les hétérodimères cycline A-E/Cdk2, cycline D/Cdk4-6 et cycline A-B/Cdk1. Par conséquent, ils sont capables d'inhiber la progression à chaque phase du cycle cellulaire (Pavletich, 1999).

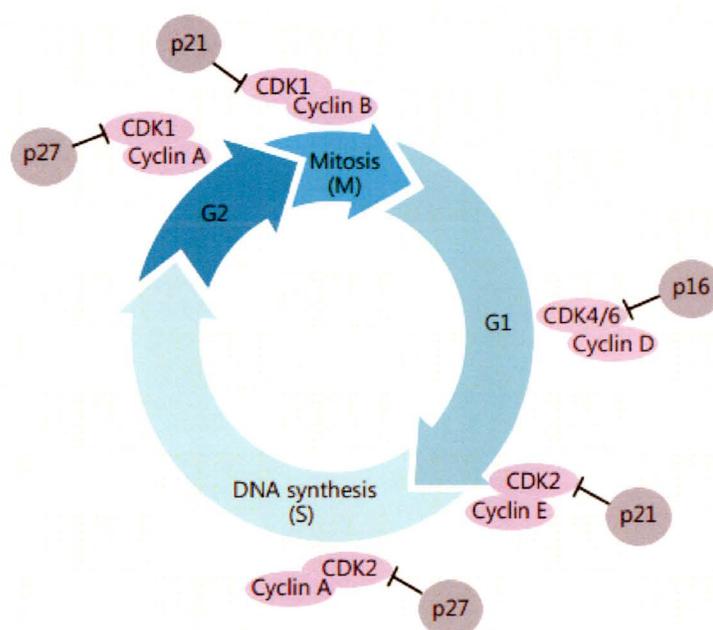


Figure 1.5 Modèle classique du contrôle du cycle cellulaire. Les principaux complexes des cyclines/CDK (Kinases cycline-dépendantes) et leurs protéines régulatrices CKI (inhibiteurs de Cdk) qui contrôlent la progression des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. [Adapté de Bai *et al.*, 2017]

1.10 La mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique d'une importance clé pour le contrôle de l'homéostasie tissulaire, qui est le résultat d'un équilibre entre la survie et la mort cellulaire (Lockshin & Zakeri, 2007). À l'origine, l'apoptose a été considérée comme la seule forme de mort cellulaire programmée. Cependant, au cours de la dernière décennie, la mort cellulaire programmée s'est étendue à l'autophagie et à la nécrose programmée appelée nécroptose (Christofferson & Yuan, 2010). La mort cellulaire programmée, en particulier l'apoptose et la nécroptose sont des barrières naturelles qui empêchent les cellules malignes de survivre et de se disséminer. Cependant, les cellules cancéreuses développent diverses stratégies pour échapper à ce processus naturel en générant des mutations génétiques ou des modifications épigénétiques dans les modulateurs clés des voies de mort cellulaire programmées (Ionov *et al.*, 2000; Wong, 2011).

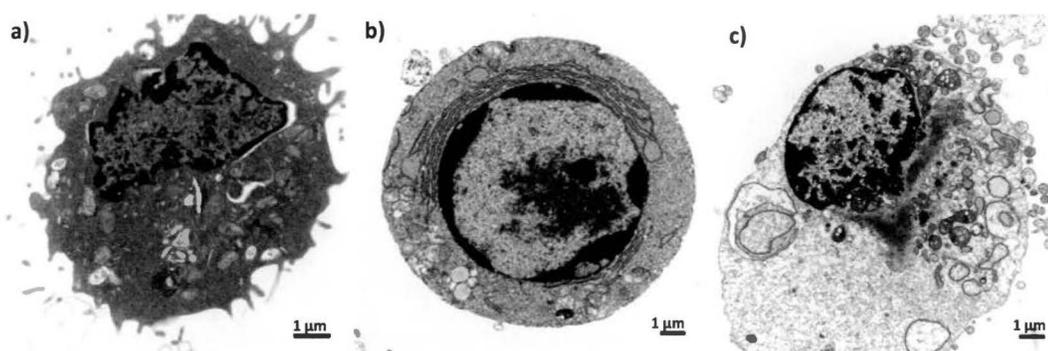


Figure 1.6 Caractéristiques morphologiques des cellules normales, apoptotiques et nécrotiques. (a) Représentation d'une cellule normale. (b) Cellule apoptotique avec les premières manifestations morphologiques caractérisées par une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire, une convolusion des membranes nucléaire et cytoplasmique et une condensation du cytoplasme. (c) Cellule nécrotique caractérisée par une dilatation des mitochondries et du réticulum endoplasmique, dilatation cytoplasmique, rupture des membranes et déversement du contenu cellulaire. [Adapté de Edinger & Thompson, 2004]

L'apoptose implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation. Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose comprennent la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et la formation de corps apoptotiques qui sont digérées par les macrophages environnants (figure 1.6) (Burgess, 2013; Kerr *et al.*, 1972). Il existe deux voies de signalisation apoptotiques de bases: la voie extrinsèque et intrinsèque (Khan *et al.*, 2014). La voie apoptotique intrinsèque est activée par divers stimuli intracellulaires, y compris les dommages à l'ADN, la privation de facteurs de croissance et le stress oxydatif. De façon générale l'apoptose repose sur la formation d'un complexe appelé apoptosome, composé par le cytochrome c, le facteur activateur 1 de protéase apoptotique (Apaf-1) et la procaspase-9 qui activent la cascade des caspase effectrices pour effectuer la mort cellulaire apoptotique. Une série de membres de la famille Bcl-2, tels que Bax, Bak, Bcl-2 et Bcl-xL, contrôlent la libération du cytochrome c en régulant la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Khan *et al.*, 2014). La voie extrinsèque est déclenchée par des membres de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF), qui contiennent des domaines de mort dans leur région cytoplasmique. La fixation des ligands extracellulaires induit la formation d'un complexe de signalisation qui comprend des molécules adaptatrices et les procaspases-8 et -10. Ces caspases vont ensuite activer par protéolyse les procaspases effectrices, comme la caspase-3 et -7, déclenchent une cascade amplificatrice qui conduit à l'apoptose (figure 1.7) (Verbrugge *et al.*, 2010).

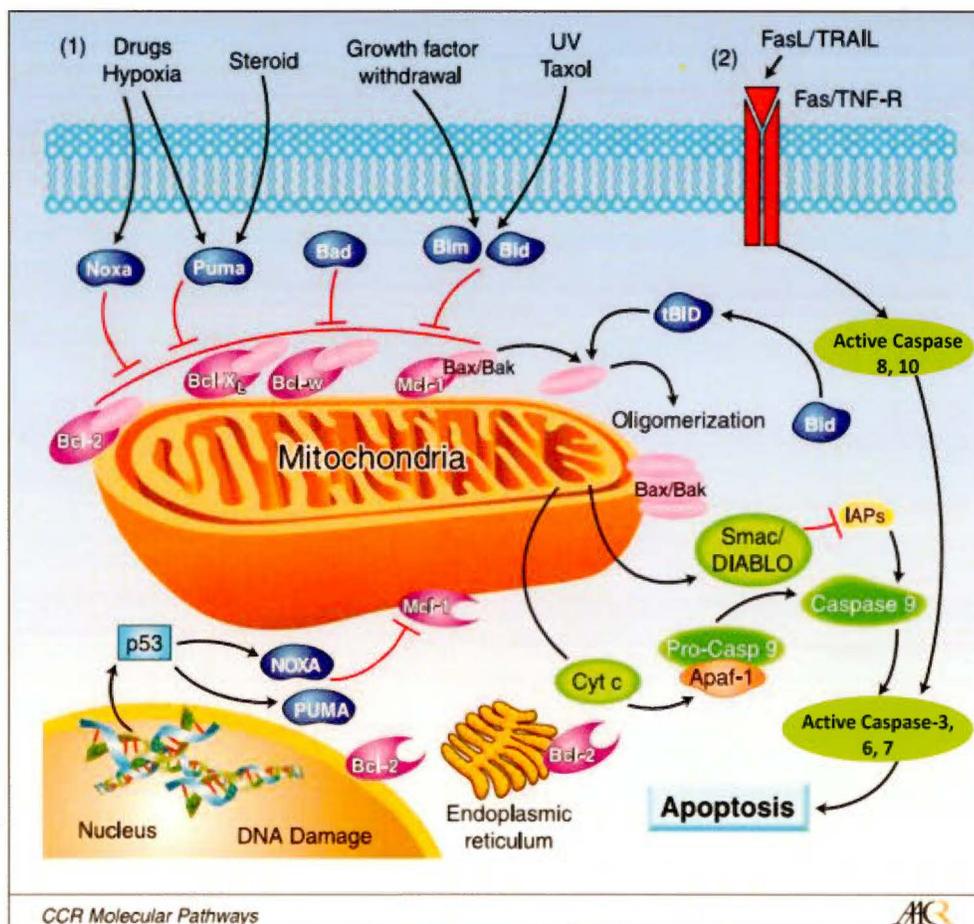


Figure 1.7 Schéma des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose. (1) La voie intrinsèque est initiée par divers signaux, principalement des stimuli extracellulaires. Les protéines BH3 (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma) interagissent avec les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques pour soulager leur inhibition de Bax et Bak pour les activer. Une fois que Bax et Bak sont oligomérisés et activés, conduisent à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permettant la libération dans le cytoplasme du cytochrome c et Smac/DIABLO. Le cytochrome c se combine avec une molécule adaptatrice, APAF-1 et une caspase initiatrice inactive, la procaspase-9 dans un complexe multiprotéique appelé apoptosome. Smac/DIABLO inhibe les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) pour activer la caspase-9 qui active alors la caspase-3, déclenchant une cascade de caspases effectrices conduisant à l'apoptose. (2) La voie extrinsèque est activée par le ligand Fas ou

TRAIL, activant ensuite les caspase-8 et 10. Des taux élevés de caspase-8 active entraînent l'activation de caspases effectrices, telles que la caspase-3, 6, 7, et l'induction de l'apoptose. L'activation de la caspase-8 peut également entraîner le clivage de la BID en sa forme tronquée (tBID), qui favorise alors l'assemblage des oligomères BAK-BAX et transmet le signal de mort de la signalisation extrinsèque à la signalisation intrinsèque. [Adapté de Kang & Reynolds, 2009]

La nécrose a été considérée pendant longtemps comme une mort cellulaire accidentelle, non contrôlée et déclenchée par des stress non spécifiques et non physiologiques. Cependant, avec l'accumulation des études il a été montré que la nécrose peut être induite et également régulée de manière programmée par une voie indépendante de l'activité des caspases (Berghe *et al.*, 2014). La nécroptose est caractérisée par une perte d'intégrité de la membrane plasmique, un gonflement des organites et des cellules et par une lyse cellulaire consécutive qui déclenche une forte réaction inflammatoire (figure 1.6) (Vandenabeele *et al.*, 2010). Comme l'apoptose, la nécroptose implique la formation de complexes multiprotéiques qui entraînent la mort cellulaire. La nécroptose peut être induite par la liaison des ligands tels que TNF- α , FasL « *Fas ligand* » et TRAIL « *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* » avec les récepteurs membranaires de mort TNFR-1 ou -2 « *Tumor necrosis factor receptor 1/2* », le récepteur Fas ou TLR « *Toll-like receptors* », ce qui conduit à l'activation des kinases RIPK1 et RIPK3 « *Receptor interacting protein kinase* » et à la formation du nécrosome (Berghe *et al.*, 2010). L'une des cibles importantes de RIPK3 est la protéine MLKL « *Mixed Lineage Kinase domain-Like protein* » qui s'oligomérisent et forme des pores dans les membranes intracellulaires et la membrane plasmique, compromettant ainsi l'intégrité membranaire et conduisant à la mort cellulaire (Zhang *et al.*, 2009). Même si les événements biochimiques qui interviennent dans la nécroptose demeurent mal compris, de récentes études ont démontré que la nécroptose survient lors de l'inhibition de l'apoptose (figure 1.8) (Vandenabeele *et al.*, 2006).

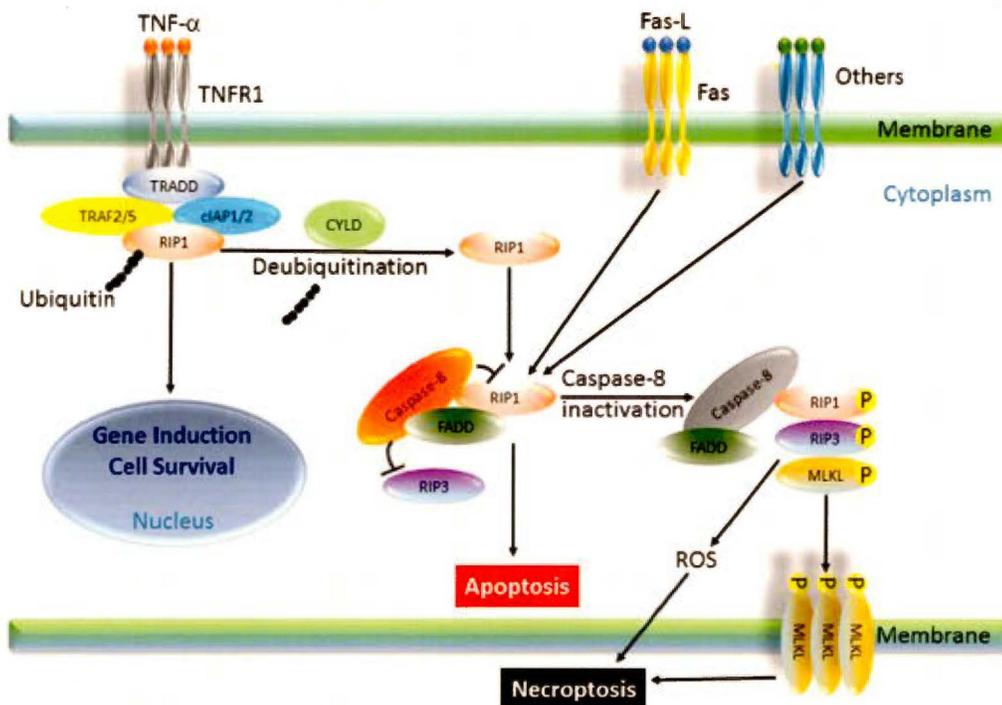


Figure 1.8 Voies de signalisation de la nécroptose. Dans la nécroptose déclenchée par le TNF- α , le TNFR1 est stimulé par le TNF- α induisant la formation d'un complexe constitué de TRADD, RIP1, TRAF2 (ou TRAF5), cIAP, qui conduit à la polyubiquitination subséquente de RIP1. Cette voie conduit à l'induction de gènes et à la survie des cellules. Nonobstant, RIP1 peut être désubiquitinée par l'enzyme CYLD et dissociée du TNFR1 pour former un autre complexe cytosolique constitué de caspase-8, FADD, RIP1 et RIP3. Dans ce complexe, la forme activée de la caspase-8 clive et supprime l'activité de RIP1 et RIP3, bloquant ainsi la nécroptose et favorisant l'apoptose. Cependant, si le clivage de RIP1 et RIP3 est bloqué par l'inhibition ou répression de la caspase-8, un troisième complexe est formé, appelé nécrosome et composé de RIP1, RIP3 et MLKL. La phosphorylation par RIP3 de MLKL semble permettre à MLKL de se déplacer dans la membrane et de former un oligomère établissant un canal permettant la fuite cytoplasmique. TNFR (*TNF receptor*); TRADD (*TNFR-associated death domain*); TRAF (*TNFR-associated factor*); FADD (*Fas associated death domain*); RIP (*protein kinase*); cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis proteins*); CYLD (*Cylindromatosis*); MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*). [Adapté de Dasgupta *et al.*, 2016]

1.10.1 Le rôle de la nécroptose dans la thérapie anticancéreuse

Récemment, la thérapie anticancéreuse à base de nécroptose a été proposée comme une nouvelle stratégie pour le traitement antitumoral. Étant donné que la nécroptose et l'apoptose utilisent des voies moléculaires distinctes, le déclenchement de la nécroptose pourrait être une stratégie alternative prometteuse pour surmonter la résistance aux agents chimiothérapeutiques pro-apoptotiques (Su *et al.*, 2016). Cette hypothèse a été préalablement validée par des études récentes. Par exemple, la Shikonin, une naphthoquinone naturelle, a été rapporté pour induire la mort cellulaire nécroptotique dans les cellules cancéreuses, y compris les cellules cancéreuses résistantes aux médicaments et à l'apoptose avec surexpression de P-glycoprotéine, Bcl-2 ou Bcl-xL (Xuan & Hu, 2009). Le BI2536, un inhibiteur de la kinase mitotique Plk1 « *Polo-like kinase 1* », a été décrit pour initier la nécroptose dans les cellules cancéreuses de la prostate résistantes aux androgènes (Deeraksa *et al.*, 2013). Il a été rapporté aussi que la staurosporine ainsi que ses dérivés, des inhibiteurs des protéines kinases, déclenchent la nécroptose dans les cellules leucémiques, lorsque l'activation de la caspase est inhibée (Dunai *et al.*, 2012). D'autre part, les réponses inflammatoires induites par la nécroptose pourraient être bénéfiques pour la thérapie anticancéreuse. Par exemple, il a été récemment démontré que la nécroptose induite par l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C) peut soutenir l'élimination *in vivo* des cellules tumorales médiée par effecteurs immunitaires (Takemura *et al.*, 2015). De même, il a été montré que les cellules cancéreuses nécrotiques libèrent l'interleukine-1 α (IL-1 α), qui active les cellules dendritiques pour produire l'IL-12, une cytokine critique pour les réponses antitumorales. Il est important de noter que la libération de l'IL-1 et l'activation des cellules dendritiques dépendaient strictement de l'expression de RIPK3 dans les cellules tumorales (Schmidt *et al.*, 2015). Tous ces exemples illustrent clairement la nécessité de continuer à développer des agents anticancéreux qui induisent la nécroptose comme voie alternative pour éradiquer la chimiorésistance provoquée par la plupart des médicaments pro-apoptotiques.

1.10.2 L'apoptose : Une cible pour la thérapie anticancéreuse

L'apoptose a été reconnue toujours comme la forme la plus importante de mort cellulaire. Ses voies de signalisation moléculaire sont des processus hautement régulés avec des changements morphologiques spécifiques qui sont bien connus (Danial & Korsmeyer, 2004). L'apoptose est étroitement régulée par l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques et devient dérégulée lorsque l'équilibre entre celles-ci est altéré. Dans les cancers humains, la surexpression des protéines anti-apoptotiques est fréquemment observée et a été liée à la progression tumorale, à la résistance au traitement et au mauvais pronostic (Hanahan & Weinberg, 2000). Par conséquent, le ciblage des protéines anti-apoptotiques dans le but de restaurer la réponse apoptotique a été considéré comme une stratégie thérapeutique prometteuse contre le cancer au cours de la dernière décennie. Plusieurs médicaments ont été développés pour inhiber les protéines de la famille BCL-2 anti-apoptotiques, et certains d'entre eux sont très prometteurs dans les essais cliniques. Deux stratégies ont été recommandées pour bloquer les protéines Bcl-2 et Bcl-xL, y compris l'application de Bcl-2 antisens et l'application de petites molécules inhibitrices de la famille de protéines BCL-2. Par exemple, l'Oblimersen (G3139), un oligonucléotide anti-sens de 18 bases, a été le premier agent ciblant l'ARNm de Bcl-2 dans les essais cliniques humains de phase I à III. L'effet apoptotique de ce composé se produit par une augmentation de l'expression de BAX, libérant des mitochondries le cytochrome c pour activer les caspases effectrices et Smac/DIABLO pour inhiber les IAPs (Emi *et al.*, 2005). La réduction de l'expression de Bcl-2 par l'Oblimersen dans des études précliniques a montré une toxicité acceptable et des taux de réponse prometteurs dans le cancer du sein (Emi *et al.*, 2005), de l'ovaire (Bartholomeusz *et al.*, 2005), et de la prostate (Leonetti *et al.*, 2007). En outre, la plupart des essais cliniques combinent les agents antisens avec des médicaments anticancéreux cytotoxiques afin de sensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose (Chi *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002). Les petites molécules inhibitrices des protéines BCL-2 ou BH3-mimétiques, toutes de moins de 750 kDa, sont capables de se lier au domaine BH3 «*Bcl2 homology 3*» sur les protéines anti-apoptotiques afin de les inhiber. Les exemples plus encourageants de ces agents comprennent le Gossypol, Obatoclax (GX15-070), ABT-737 et ABT-263 ou Navitoclax qui agissent sur différents membres de la famille BCL-2 (Kang & Reynolds, 2009; Oltersdorf *et al.*, 2005).

Une autre approche thérapeutique attractive est l'activation de la protéine p53 pour induire l'apoptose p53-dépendante dans les tumeurs surexprimant Mdm2 « *murine double-minute 2* », un régulateur négatif critique de p53 qui favorise l'ubiquitination et sa dégradation (Tovar *et al.*, 2006). Les exemples les plus importants de ces agents sont le groupe appelé Nutlins tels que le MI-219 et le MI-77301, efficaces pour bloquer les interactions MDM2-p53 (Bai & Wang, 2014; Shangary *et al.*, 2008).

De plus, des grands espoirs sont mis aussi dans le ciblage de protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs), en particulier la survivine, surexprimée dans de nombreux cancers où elles contribuent aux mécanismes de résistance à l'apoptose (Bertrand *et al.*, 2008). Actuellement, il y a deux approches pour inhiber les IAPs qui comprennent l'emploi de petites molécules antagonistes de XIAP «*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*» et de la survivine ainsi que des molécules susceptibles de mimer l'action de Smac/DIABLO (Dubrez *et al.*, 2013; Fulda & Vucic, 2012).

Malgré notre meilleure compréhension des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose au cours des dernières années, ainsi que les nouvelles approches de ciblage des voies apoptotiques qui ont été testées dans des modèles pré-cliniques et cliniques, la chimiorésistance est aujourd'hui un problème thérapeutique qui limite sévèrement le succès qu'un traitement peut avoir sur le cancer. Dans l'état actuel des connaissances, les thérapies ciblées ne sont donc pas le traitement définitif du cancer. À ceci se rajoute leur coût exorbitant, qui limite actuellement leur utilisation massive par les systèmes de santé. Raisons pour lesquels d'autres alternatives se doivent d'être envisagées, parmi celles-ci une approche alternative serait d'empêcher ou de minimiser l'incidence de certains cancers. Si la survenue d'un cancer pouvait être prévenue ou réduite, certaines de ces options de traitement coûteuses pourraient être évitées.

1.11 La chimioprévention par des composés naturels

Selon l'OMS un tiers au moins de l'ensemble des cas de cancer est évitable puisqu'ils sont directement liés au régime alimentaire et style de vie incluant le manque d'activité physique.

La prévention constitue la stratégie à long terme la plus rentable pour lutter contre le cancer. En plus de modifier le style de vie en tant que méthode primaire de prévention du cancer, la chimioprévention est un autre moyen de réduire l'incidence du cancer à travers de l'utilisation de composés naturels ou synthétiques pour inverser, supprimer ou prévenir le développement du cancer (Khan *et al.*, 2008; Sporn & Suh, 2000). L'intervention chimiopréventive n'est possible que pendant le processus de développement du cancer et improbable lorsque le cancer est déjà établi. La chimioprévention du cancer, lorsqu'elle s'adresse à la bonne population, a le potentiel de ralentir le processus de cancérogenèse (Adhami & Mukhtar, 2013).

Le concept de prévention des maladies utilisant des produits chimiques est appliqué avec succès contre les maladies cardiovasculaires (Hayden *et al.*, 2002), l'athérosclérose (Aboonabi & Singh, 2015), le diabète (Anderson Jr, 2005) et d'autres maladies. D'autre part, dans le cas du cancer il y a suffisamment de preuves de concept d'études humaines qui démontrent que la chimioprévention est une option viable pour la prévention du cancer. Le premier agent chimiopréventif approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) était le tamoxifène en 1998 (Lippman & Brown, 1999). Le tamoxifène est le médicament hormonal le plus administré pour réduire l'incidence du cancer du sein invasif et non invasif chez les femmes qui présentent un risque accru de développer la maladie (Cuzick *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 1998). Les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été rapportés comme des agents efficaces pour la prévention des adénomes colorectaux (Baron *et al.*, 2006; Bertagnolli *et al.*, 2006). Des études cliniques sur l'utilisation de l'alpha-difluorométhylornithine (AGFA) par voie orale chez des patientes ayant des antécédents de cancer de la peau non mélanique ont montré que celles qui avaient pris AGFA avaient des taux inférieurs de non-mélanomes de la peau (Bailey *et al.*, 2010). Entre autre, plusieurs études cliniques ont exploré les effets de la consommation de thé vert chez les patients atteints de cancer de la prostate (Bettuzzi *et al.*, 2006; Brausi *et al.*, 2008). La plupart des polyphénols du thé vert sont des flavanols, connus sous le nom de catéchines, qui sont des molécules aux remarquables pouvoirs antioxydants, tels que la catéchine, la gallocatéchine, l'épicatéchine, l'épicatéchine-3-gallate, l'épigallocatéchine et d'autres (Ren *et al.*, 2000).

La nature est une source attrayante de nouveaux candidats thérapeutiques, car il y a une diversité chimique considérable à travers les millions d'espèces de plantes (Butler *et al.*, 2014). Les produits botaniques ont contribué de manière significative aux thérapies contre le cancer au cours des 30 dernières années et près de 80% des médicaments anticancéreux approuvés sont dérivés de composés naturels (Cragg *et al.*, 2009). Également, les plantes constituent une ressource importante pour un certain nombre d'agents chimiothérapeutiques anticancéreux efficaces actuellement utilisés. Néanmoins, il faut poursuivre les efforts pour exploiter cette ressource et explorer des produits naturels ou des composants actifs botaniques avec des actions chimiopréventives nouvelles, non toxiques et efficaces contre le développement du cancer.

1.11.1 Flore cubaine : Rôle dans la chimioprévention

La médecine traditionnelle est une réalité présente dans le monde entier. Comme son nom l'indique, elle fait partie du patrimoine culturel de chaque pays et utilise des pratiques qui ont été transmises d'une génération à l'autre depuis des centaines d'années avant le développement de notre médecine actuelle. L'OMS encourage l'utilisation de procédures traditionnelles sûres et efficaces dans les soins de santé primaires depuis 1976. Elle continue également d'établir des programmes pour la conservation des plantes médicinales, tel qu'il est apparu dans la déclaration "Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023" (Organisation Mondiale De La Santé, 2013).

Cuba possède une flore immense et une grande tradition populaire dans l'utilisation de la médecine verte pour la prévention et la guérison de diverses maladies (Fiallo, 2008). Cependant, sa flore médicinale a été peu étudiée comme une source de composés capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses, afin de promouvoir les candidats potentiels pour l'inclusion clinique future. En tenant compte du fait que dans le système de santé cubain, les protocoles thérapeutiques souffrent d'une sous utilisation d'antinéoplasiques d'origine naturelle, la recherche de telles entités dans la flore médicinale peut constituer une contribution concrète à la solution de ce problème. À Cuba, les espèces de plantes médicinales sont au nombre de 1 241, et appartiennent à 725 genres de 172 familles (Fiallo,

2008). Une partie appréciable de ces espèces est actuellement utilisée par la population. Dans l'évaluation des enquêtes ethnomédicales menées entre 1980 et 1995, (Fiallo et Montoya, 1997), il a été déterminé que la population cubaine connaît et / ou utilise 655 espèces botaniques, qui sont regroupées en 425 genres de 124 familles. Ces espèces de référence actuelles constituent 52,8% de celles citées comme médicinales pour Cuba, ce qui démontre l'utilisation extensive de plantes par la population cubaine (Álvarez *et al.*, 2014; Fiallo, 2008).

Les espèces endémiques atteignent le nombre de 97 espèces (7,8% du total des espèces médicinales), regroupées en 74 genres de 41 familles. Les familles ayant le plus grand nombre d'espèces médicinales endémiques et pour lesquelles la plus grande quantité d'espèces médicinales citées dans le pays sont: Asteraceae (12), Euphorbiaceae (10) et Rubiaceae (7), (Fiallo, 2008).

1.11.2 *Xanthium strumarium* L.

À Cuba, *Xanthium strumarium* Linn, appartenant à la famille Asteraceae / Compositae et du genre *Xanthium*, est une espèce abondante couramment utilisée en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Le genre *Xanthium*, constitué de 25 espèces, est autochtone de l'Amérique (Pandey & Rather, 2012). Néanmoins, *Xanthium strumarium* L. qui est la principale espèce est largement distribué dans les pays de l'Est en raison de son utilisation en médecine traditionnelle. Cette espèce se retrouve en Europe, en Inde et en Asie occidentale (Kamboj & Saluja, 2010). Elle pousse à l'état sauvage dans les forêts, les prairies, près des rivières ou dans les zones urbaines. À Cuba, elle est largement distribuée dans tout le pays dans les zones urbaines et les zones arables (figure 1.9).



Figure 1.9 *Xanthium strumarium* L. [Adapté de Kamboj & Saluja, 2010]

En Chine, elle est utilisée pour le traitement de la sinusite, des maux de tête, de l'urticaire et de l'arthrite et est incluse dans sa pharmacopée (Han *et al.*, 2007). En Inde, en médecine traditionnelle, elle est utilisée comme diaphorétique, sédatif, sudorifique, diurétique et pour le traitement de la migraine (Lin *et al.*, 2014). Cette espèce est utilisée par plusieurs tribus amérindiennes pour soulager la constipation, la diarrhée ou les vomissements (Kamboj & Saluja, 2010). En particulier, à Cuba, la plante a été utilisée principalement comme diurétique dans le traitement des affections rénales (Pérez Machín *et al.*, 2011).

Selon plusieurs rapports, les composés bioactifs tels que les glycosides, les phytostérols, les acides phénoliques, les xanthiazones et l'extrait dérivé de cette plante présentent des larges propriétés pharmacologiques. Parmi celles-ci, il a été rapporté hypoglycémiant (Hsu *et al.*, 2000), antiulcéreux (Favier *et al.*, 2005), anti-inflammatoire et analgésique (Han *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2005), antitrypanosome, antipaludéen (Le Tran *et al.*, 2003), antifongique (Sato *et al.*, 1997) et diurétique (Cumanda *et al.*, 1991; Pérez Machín *et al.*, 2011). De plus, il a également été montré que l'extrait végétal inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans une grande variété de types de cellules tumorales, y compris: le côlon, le sein, le poumon, le

pancréas, la leucémie, le mélanome et l'estomac (Ferrer *et al.*, 2016; Nibret *et al.*, 2011; Ramirez-Erosa *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012a; Zhang *et al.*, 2012b).

Malgré le grand volume de travail qui existe actuellement sur *Xanthium strumarium* L., les mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquent les effets cytotoxiques et antimoraux de cette plante ou de ses principes actifs chimiques n'ont pas encore été clarifiés.

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

Les patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire, la plupart diagnostiquées tardivement et donc à des stades avancés de la maladie, sont présentement traitées par la chimiothérapie standard. Cependant, le développement de la chimiorésistance pour la majorité d'entre elles constitue un sérieux problème qui peut limiter les chances de succès des traitements.

De nombreux médicaments couramment utilisés aujourd'hui ont été développés à partir de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle. Plusieurs médicaments ont été développés à la suite de criblages ethnobotaniques, et une grande partie des médicaments commerciaux utilisés aujourd'hui pour traiter une variété de maladies, dont le cancer, ont été découverts à l'origine grâce à la recherche sur les plantes. Les recherches consacrées à l'isolement et à l'identification des principes actifs anticancéreux à partir des plantes ont commencé de manière rationnelle en recueillant une variété d'échantillons du monde entier, ou en s'appuyant sur le folklore. Dans ce contexte, les aspects mentionnés précédemment suggèrent la nécessité d'approfondir la recherche scientifique sur les propriétés antinéoplasiques de l'espèce *Xanthium strumarium* L., et de savoir si, dans le contexte de la flore médicinale cubaine, elle constitue l'un des candidats les plus pertinents pour son utilisation comme phytomédicament ou comme une source d'entre eux. Pour le développement de ce travail, l'hypothèse suivante a été proposée.

2.2 Hypothèse de travail

Xanthium strumarium L, qui est largement utilisé dans la médecine populaire traditionnelle, pourrait être une source prometteuse de composés phytochimiques dont les effets sur le cycle cellulaire et les processus biologiques pertinents à la survie et/ou la prolifération cellulaire tumorale demeurent mal documentés.

2.3 Objectifs de recherche

Nous souhaitons caractériser l'impact anticancéreux de l'extrait *X. strumarium* L. en analysant son effet sur la survie et/ou la prolifération de deux modèles de cellules cancéreuses ovariennes humaines. L'un est sensible (lignée cellulaire ES-2) et l'autre résistant (lignée cellulaire SKOV-3) à la chimiothérapie. Afin de mieux caractériser l'effet cellulaire de l'extrait végétal, nous évaluerons son impact sur la prolifération cellulaire, l'induction de l'apoptose, le cycle cellulaire, l'organisation de l'appareil mitotique, et sur certains biomarqueurs protéiques impliqués dans l'apoptose.

CHAPITRE III

TARGETING OVARIAN CANCER CELL CYTOTOXIC DRUG RESISTANCE PHENOTYPE WITH *XANTHIUM STRUMARIUM* L EXTRACT

Article soumis à la revue scientifique *OncoTargets and Therapy*

Contributions des co-auteurs :

Francisco Fernández : Réalisation des expériences, analyse et interprétation des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Annabi : Rédaction du manuscrit, conception et financement du projet.

TARGETING OVARIAN CANCER CELL CYTOTOXIC DRUG RESISTANCE
PHENOTYPE WITH *XANTHIUM STRUMARIUM* L EXTRACT

Marbelis Francisco Fernández, Borhane Annabi*

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, et Centre de Recherche
BIOMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada*

* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA, H3C 3P8

Phone : (514) 987-3000 ext 7610

E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Running title : Targeting ovarian cancer chemoresistance

*Key words : Chemoresistance, Herbal medicine, Ovarian cancer, *Xanthium strumarium* L.*

*The abbreviations used are : Cdk, Cyclin-dependent kinase, CHO, Chinese hamster ovary;
Nrf2, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase;
XFC, *Xanthium strumarium* L extract.*

3.1 Résumé

Actuellement, les nouveaux médicaments de chimiothérapie visent à cibler l'intégrité génomique et les mécanismes de réplication dans le cancer de l'ovaire. Alors que l'activité antiproliférative de l'extrait de *Xanthium strumarium* L (XFC), un extrait médicamenteux à base de plantes traditionnelles a été rapporté altérer l'appareil mitotique des cellules épithéliales des ovaires de hamster chinois (CHO), sa capacité à cibler et à surmonter le phénotype de chimiorésistance du cancer de l'ovaire demeure peu documentée. Parmi les lignées cellulaires cancéreuses évaluées, nous avons constaté que le meilleur effet inhibiteur de la prolifération de XFC était contre les cellules cancéreuses de l'ovaire (IC₅₀ de 30 à 35 µg/mL). L'extrait XFC ciblait efficacement à la fois le phénotype SKOV3 chimiorésistant aux médicaments cytotoxiques, ainsi que les cellules ES-2 chimiosensibles. L'apoptose précoce et tardive étaient efficacement induite par l'extrait de XFC dans les cellules ES-2, tandis que l'apoptose tardive et la nécrose étaient déclenchées dans les cellules SKOV-3. L'arrêt du cycle cellulaire induit par l'extrait XFC s'effectuait dans la phase G2/M au sein des deux modèles cellulaires ES-2 et SKOV-3. Cet effet était en partie attribuable à l'augmentation de la polymérisation de la tubuline en fonction de la concentration, un effet qui était plus élevé dans les cellules résistantes SKOV-3. L'extrait XFC a déclenché le clivage de la poly (ADP-Ribose) polymérase (PARP), alors qu'il abaissait les niveaux de Nrf2 et d'Akt phosphorylé dans les cellules ES-2. Par contre, aucune expression de ces derniers biomarqueurs n'a été modifiée dans les cellules SKOV-3, tandis que le clivage de PARP était toujours observé. De manière intéressante, les régulateurs du cycle cellulaire Cdk4, cycline D3 et p27 étaient diminués dans les cellules SKOV-3. L'extrait de XFC s'est avéré efficace pour inhiber la migration *in vitro* dans les deux modèles de cellules cancéreuses de l'ovaire. Collectivement, nos données confirment le potentiel de ciblage anticancéreux de l'extrait XFC contre le cancer de l'ovaire humain chimiorésistant.

3.2 Abstract

Emerging drugs aim at targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. Whereas the anti-proliferative activity of *Xanthium strumarium* L extract (XFC), a traditional herbal medicine believed to alter the mitotic apparatus of Chinese hamster ovary epithelial cells, its capacity to target and overcome the chemoresistance phenotype of ovarian cancer is unknown. Among the cancer cell lines tested, we found that the best proliferation inhibitory effect of XFC was against ovarian cancer cells and ranged from 30-35 $\mu\text{g/ml}$. XFC efficiently targeted both the cytotoxic drug chemoresistance phenotype of SKOV-3 as well as the chemosensitive ES-2 cells. Early and late apoptosis were effectively induced by XFC extract in ES-2 cells, whereas late apoptosis and necrosis events were triggered in SKOV-3. Cell cycling regulation was found trapped by XFC extract in the G2/M phase in both ES-2 and SKOV-3 cell models. Such effect was, in part, attributable to increased dose-dependent tubulin polymerization which was found higher in SKOV-3 cells. XFC extract triggered poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) cleavage, whereas it lowered Nrf2 and phosphorylated Akt levels in ES-2 cells. In contrast, none of the latter biomarkers were altered in SKOV-3 cells, whereas PARP cleavage was still observed. Interestingly, cell cycling regulators Cdk4, Cyclin D3, and p27 were all found decreased in SKOV-3 cells. XFC extracts were effective in inhibiting in vitro migration in both ovarian cancer cell models. Our data support the potential anticancer targeting of chemoresistant human ovarian cancer cells phenotype by XFC extract.

3.3 Introduction

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer mortality. Despite the fact that first-line chemotherapy is effective in reducing tumor burden following cytoreductive surgery, the 5-year survival rate for stage III and IV disease is ~20-30% (Berek, 2000). One of the major reasons for such low survival rate is the appearance of drug resistance. Attempts to overcome resistance to antitumor drugs in ovarian cancer has defined the combination chemotherapy of Cisplatin (CDDP) and Taxol as the first-line therapeutic protocol via long-term prospective studies of clinical trials (Shen, 2002). Whereas many resistant tumor cells in humans are gradually acquired during chemotherapy, the elucidation of drug resistance mechanisms remains insufficient to overcome clinical failure. Differential molecular and cellular studies with chemoresistant and chemosensitive cell line models can thus serve as an initial screen for agents that may circumvent drug resistance phenotypes.

Resistant cell lines, selected by exposure to antitumor agents, have been valuable tools for the illumination of the factors underlying *in vitro* drug resistance. The usage of the resistant cell lines has greatly promoted the understanding of mechanisms of resistance and drug resistance-associated genes, such as multidrug resistance gene 1 (MDR1) and glutathione S-transferase pi (GST-pi) (Roninson et al., 1986; Whelan et al., 1989). However, the crucial problem is that studies with cells in culture might not always reflect the situation in clinical tumors and contradictory evidence concerning the mechanisms of drug resistance have been reported (Vaisman et al., 1997; Brown *et al.*, 1993; Herod et al., 1996; Di Leo et al., 1995). The situation may be due, at least in part, to the difference of the resistant cells selected by dissimilar approach and a failure in combination of the laboratory and the clinic.

Throughout history, plants have been the main sources of discovery of natural-based medicines. In the anticancer area, plant-derived agents such as the Vinca alkaloids, the epidodophyllotoxin, the taxanes, and the camptothecin derivatives are among the most effective cancer chemotherapeutics currently available (Cragg and Newman, 2013). Discovery of new phytochemicals for cancer therapy is therefore a worthwhile endeavor, and identification of anticancer plant principles is classically performed by collecting a variety of

samples from around the world, or by relying on folklore. This is the case of the plant *Xanthium strumarium* L (Family: Asteraceae) which exhibits a global distribution and is found abundantly throughout Eurasia and America (Kamboj and Saluja, 2010). Historically, *Xanthium* species have been used as traditional herbal medicines in oriental countries. It has also been used abundantly as analgesics, antibacterial, anti-inflammatory and throughout America against chronic bronchitis, chronic rhinitis, and allergic rhinitis to relieve constipation, diarrhea, and vomiting (Kamboj and Saluja, 2010). Moreover, plant infusions have been used in the treatment of rheumatism and kidney diseases (Lin et al., 2014). It has also been reported that the genus *Xanthium* provides many interesting compounds such as sesquiterpene lactones with xanthanolide-type skeleton that had significant antitumor activity in a variety of cell culture systems (Kim et al., 2003; Kovács et al., 2009; Ramírez-Erosa et al., 2007; Vasas and Hohmann, 2011), with terpenoids, thiazindiones, sterols and caffeoylquinic acid as major secondary metabolites. Despite the many studies carried out on *Xanthium strumarium* L, the cellular and molecular mechanisms underlying the anticancer actions of this plant remained poorly characterized.

In the present study, we induced SKOV-3 cells, an established ovarian cancer cell line model resistant to tumor necrosis factor and to several cytotoxic drugs including diphtheria toxin, cis-platinum and Adriamycin (Yan et al., 2007), and compared it to established chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells. We investigated the effects of *Xanthium strumarium* L extract (XFC) administration and assessed its potential to circumvent drug resistance phenotype in SKOV-3 chemoresistant ovarian cancer cell model. We found it to significantly alter cell proliferation, cell cycle, and pro-apoptotic/necrotic events. This evidence suggest that XFC content in anticancer molecules could efficiently target and circumvent the molecular processes which contribute to ovarian cancer cells resistance to current cytotoxic therapies.

3.4 Materials and Methods

Materials. Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The monoclonal antibody against GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). The Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG antibody was purchased from Invitrogen (Carlsbad, NM). Polyclonal antibodies against Survivin, Nrf2, AKT, and phospho-AKT, PARP, Cyclin D1, Cyclin D3, Cdk2, Cdk4, Cdk6, and monoclonal antibody against p27 were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Plant material and preparation of chloroform extract of Xanthium strumarium L (XFC). *Xanthium strumarium L.* was collected from the Medicinal Plants Experimental Station “Dr. Juan Tomás Roig” in San Antonio de los Baños city (Artemisa, Cuba). A voucher specimen with number ROIG 4594 was deposited at the herbarium of this institution. Plant parts (500 g) were extracted with 70% ethanol as described elsewhere (Piloto-Ferrer et al., 2014). A fluid extract was prepared from the dried material by hydroalcoholic extraction in four rounds of percolation. It was concentrated under reduced pressure to obtain a raw extract (whole extract). Extraction of chloroform-soluble compounds was described in details previously (Sanchez-Lamar et al., 2016). Chloroform was removed by reduced pressure (Büchi Rotavapor) and the residual pale yellow oil was re-suspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) for the evaluations. This defines the *Xanthium strumarium L* chloroform extract as the XFC extract used throughout the study to treat the cells.

Cell culture. Human SKOV-3 ovarian adenocarcinoma cells as well as human ES-2 ovarian clear cell carcinoma cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown as a monolayer with McCoy's 5a Medium Modified (Wisent, 317-010-CL) containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies, 12483-020), 100 U/mL

penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Wisent, 450-202-EL). All other cell lines used in the study were from ATCC: MDA MB-231 and MCF-7 (breast cancer cells) as well as HT-29 and C2BBE-1 (colon cancer cells) were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-036-CL) or in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (319-005-CL), respectively, containing 10% FBS and antibiotics. All the cells were cultured at 37°C under a humidified 95%–5% (v/v) mixture of air and CO₂.

Cell proliferation assays. The MDA-MB-231, MCF-7, ES-2, SKOV-3, HT-29, and C2BBE1 cells were seeded in complete medium (10³ cells/200 µL/well) in 6 replicates wells of 96-well plates, allowed to adhere for 6 hours and the medium supplemented with serial dilution of XFC (200 µL/well, final volume). Cell proliferation was measured after 72 hours using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] cytotoxicity assay in accordance with the protocol described by Mosmann with some modifications (Mosmann, 1983). The cells were incubated with MTT (5 mg/mL) at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 4 hours. After incubation, 100 µL DMSO (solubilizing reagent) were added to each well and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. Presence of viable cells was visualized by the development of a purple color due to formation of formazan crystals. The plates were read on a SpectraMax Plus reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) using a test wavelength of 570 nm and reference wavelength of 630 nm. The samples IC₅₀ values were determined from a dose–response curve obtained by using 7 different sample concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL). Analyses were made in triplicate for each condition.

Immunoblotting procedures. Proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA, followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive

material was visualized by ECL detection system. The immunoreactive bands were quantified using ImageJ software (NIH).

Immunofluorescence staining. ES-2 and SKOV-3 cells were seeded on cover slips and treated with the indicated concentrations of XFC or with Nocodazol (50 ng/mL) for 24 hours. Cells were rinsed in PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂), fixed in 4% formaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min. After the reaction was blocked in 10% PBS/BSA, the cells were incubated with mouse anti α -tubulin antibody (1/2,000; T5168; Sigma) for 1 hour at room temperature. After several washes, the cells were incubated with Alexa Fluor-488 conjugated anti-rabbit IgG antibody (1/1,000) for 1 hour at room temperature. The cell nuclei were visualized with one μ g/mL DAPI staining for 5 min. Slides were then dried, mounted with the ProLong Gold antifade reagent (FisherScientific, Ottawa, ON). The cells were visualized with an A1R Nikon confocal unit attached to the inverted Eclipse Ti microscope suited for a Plan Apo 60/1.4 N.A oil objective (Nikon Canada, Mississauga, ON). The resulting micrographs were acquired and processed with NIS Element (Nikon Canada) and Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) software packages.

Cell-cycle analysis. ES-2 and SKOV-3 cells were incubated for 48 hours in medium without FBS at 37°C in 5% CO₂ for synchronization of the cell cycle. Cells were then treated for 24 hours with either 0.1% DMSO (controls) or various concentrations of XFC (20, 30, 40, 50 or 60 μ g/mL). Treatments were performed in medium containing 10% FBS. At the end of treatment, the cells were collected by mild trypsin digestion, washed with ice-cold PBS and fixed in ice-cold 70% ethanol in PBS overnight at -20°C. Cells were then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, followed by careful removal of the supernatant. Three volumes of staining solution in PBS, containing propidium iodide (PI, 40 μ g/mL; Calbiochem, San Diego, CA) and DNase-free RNase (100 μ g/mL), were added for at least 30 min at 37°C in the dark before analysis. The proportion of the cell population in each phase of the cell cycle was determined as a function of the DNA content using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON). Cell cycle analysis was performed with the BD Accuri™ C6 software (version 1.0.264.21). For each measurement, at least 10,000 cells were counted.

Apoptosis analysis. Apoptosis was determined by FITC-labeled Annexin-V/PI double staining and flow cytometry analysis. Briefly, SKOV-3 and ES-2 cells were treated with XFC at 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 or 48 hours. At the indicated time, cells were harvested, fixed, and apoptosis was then measured by the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences, Mississauga, ON) according to the manufacturer's protocol. Percentages of cells within early and late stages of apoptosis were determined using a BD Accuri C6 flow cytometer. The data were analyzed using FlowJo 10.1 software. At least 10,000 cells were counted for each measurement. The following controls were used to set up gates: unstained cells, cells with FITC Annexin V only and cells with PI only.

Wound-healing assay. ES-2 and SKOV-3 cells were seeded into 6-well tissue culture dishes and grown to nearly confluent cell monolayers. Then, a linear wound was generated in the monolayer with a sterile 200 μl pipette tip creating a cell-free area (Liang et al., 2007). Cultures were gently washed with the growth medium to remove loose cells. The cells were then treated with either vehicle or XFC (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in culture medium supplemented with 1% FBS. Cells for control conditions were also scratched, washed, and maintained in culture medium supplemented with 1% FBS after the scratch. Immediately after the scratch and at 4, 8, and 24 h, at least four images of the scraped area were captured using phase contrast microscopy and analyzed using ImageJ software. Two independent experiments were performed, using three wells for each stimulating condition. The same scratched area was selected for the measurements at each time of the study.

Statistical data analysis. Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test and was used to compare the XFC effect to vehicle treated cells. To compare two or more groups with the control group, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test was used. All statistical analyses and graphs were performed using the GraphPad Prism software version 5.0b (San Diego, CA). Where indicated, data were presented as means \pm SD of three independent experiments. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. the negative control.

3.5 Results

Impact of the Xanthium strumarium L extract (XFC) on breast, ovarian and colorectal cancer cells proliferation.

The antiproliferative capacity of XFC was first assessed on established human cancer cell models respectively derived from breast adenocarcinomas (MCF-7, MDA-MB-231), from colorectal adenocarcinomas (HT-29, C2BBE-1), from ovarian clear cell carcinoma (ES-2), and from ovarian adenocarcinoma (SKOV-3). XFC was able to dose-dependently inhibit cell proliferation (Fig.1A), with the best inhibition potential observed towards the two tested ovarian cancer cell models where IC_{50} values ranged from 30-35 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.1B). This suggests that XFC possesses the capacity to inhibit cancer cell proliferation, with the best effect against ovarian cancer cells.

XFC triggers late apoptosis in ES-2 ovarian cancer cells.

Whether XFC further triggered any pro-apoptotic events was next assessed at 24 and 48 hours of XFC treatment by flow cytometry (Fig.2A, Fig.3A). We found that early and late apoptosis were effectively induced by XFC in ES-2 cells and increased with time treatment (Fig.2B), whereas late apoptosis and necrosis events were triggered in SKOV-3 cells (Fig.3B). XFC can therefore efficiently target the effective cytotoxic drug chemoresistance phenotype reported for SKOV-3 as well as the chemosensitive ES-2 cells.

XFC alters ES-2 and SKOV-3 cell cycle division.

Given its anti-proliferative and pro-apoptotic effects, we next addressed how XFC could alter cell cycle division by assessing subG1, G0/G1, S, and G2/M phases (Fig.4A). Cells were found trapped upon XFC treatment in the G2/M phase in both ES-2 and SKOV-3 cell models (Fig.4B, red bars). This again suggests that XFC can significantly alter molecular events regulating cell division processes controlling cell proliferation.

XFC alters tubulin cytoskeleton in SKOV-3 ovarian cancer cells.

Increased tubulin levels and decreased polymerization ratio are a hallmark of resistant cells (Nishio and Saijo, 1999; Perez, 2009). Here, we tested whether antimitotic activity of XFC

extract altered tubulin polymerization (Menon et al., 2001) in human ovarian cancer cells, and this was compared to the microtubules depolymerizing agent Nocodazol (Guzmán-Ocampo et al., 2018). We found that XFC altered microtubules organization (Fig.5A-B) as it increased tubulin polymerization in SKOV-3 cells as compared to ES-2 cells (Fig.5C). By examining the morphologies of microtubules and chromosomes, we found increased multipolar mitotic spindles consequent to the aggregation of asters as well as increased monopolar spindles consequent to non-separated centrioles in both cells treated with XFC. In agreement, we further noticed that the chromosomes remained condensed but were not able to align properly, which can be explained by the formation of the multipolar acentrosomal spindle leading to a failure of chromosomal segregation. In addition, treated cells that were able to eventually exit mitosis showed aberrations associated with abnormal karyokinesis (increased frequency of cells bearing micronuclei) and failure of cytokinesis (increase in cells containing multiple nuclei) (Fig.5A-B). Such phenomena are the typical outcomes of anti-mitosis drugs. Taken together, these data indicate that XFC directly affects mitosis progression by disrupting the assembly of the normal mitotic spindle.

XFC signals PARP cleavage in SKOV-3 ovarian cancer cells.

Differential alterations in apoptotic versus necrotic cell death balance as well as in cell cycling prompted us to investigate whether several intracellular stress biomarkers were also altered. Among these, Survivin was recently identified as an antagonist of chemotherapy-induced cell death in colorectal cancer cells (Rauch et al., 2018). Interestingly, transient increase in Survivin expression was observed in ES-2 cells, whereas it remained unchanged in SKOV-3 cells suggesting that Survivin the latter cells was not required to resist to XFC stress inducer. However, global phosphorylation status of Akt decreased in ES-2 cells, and more significantly in SKOV-3 cells (Fig.6B). Expression of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), an emerging regulator of cellular resistance to oxidants (Ma, 2015) believed to control the expression of antioxidant response element (ARE)-dependent genes which regulate cellular resistance to oxidants (Iranshahy et al., 2018), was found to decrease in XFC-treated ES-2 cells but not in SKOV-3 cells. This confirmed the chemoresistance phenotype of SKOV-3 cells. Finally, cleaved PARP immunoreactive material was significantly induced in ES-2, whereas it was also induced in SKOV-3 cells. Altogether, this

confirms the high drug resistance phenotype of SKOV-3 cells to cytotoxics, as compared to that of the chemosensitive ES-2 cells. Nevertheless, our data still support some aspects of the cytotoxic properties of XFC which can circumvent such resistance phenotype.

XFC alters cell cycle regulators in SKOV-3 ovarian cancer cells.

A common mechanism of cell-cycle arrest involves upregulation of endogenous Cdk inhibitors, including p27^{Kip1} and p21, which prevent cell-cycle progression by blocking Cdk activity (Vidal and Koff, 2000). Immunoblotting indicated that p27^{Kip1} levels did significantly increase in ES-2 cells (Fig.7A), whereas they significantly decreased in chemoresistant SKOV-3 cells (Fig.7B). When Cdk2, Cdk4, and Cdk6 expression levels were assessed, that of Cdk2 decreased upon XFC treatment in both cell lines (Fig.7B). Whereas Cdk6 only increased in ES-2 cells, Cdk4 in contrast decreased upon XFC treatment in SKOV-3 cells, but remained unchanged in ES-2 cells (Fig.7B). We found that XFC treatment drastically decreased protein levels of Cyclin D1 in ES-2 cells, whereas they remained unchanged in SKOV-3 cells (Fig.7B). Cyclin D3 expression was significantly downregulated in both SKOV-3 and ES-2 cells. Collectively, these data suggest that XFC contains anticancer molecules that could efficiently target crucial cell cycle division processes, which regulate chemoresistance.

SKOV-3 ovarian cancer cells cannot reverse the impact of XFC in a wound-healing assay.

Here, we assessed the impact of XFC against the capacity of cells to migrate in response to a wound (Fig.8A). While ES-2 cells were able to partly rescue wounding, XFC treatment in SKOV-3 cells prevented migration of the wound region (Fig.8B). This property suggests that XFC can halt SKOV-3 cell migration.

3.6 Discussion

Although, ovarian cancer is the most deadly gynecologic malignancy worldwide, chemotherapy remains the mainstay treatment. Despite initial response is promising, frequent recurrence in patients with advanced stage of the disease remains a therapeutic challenge. Thus, understanding the biology of chemoresistance is of great importance to overcome this challenge and will conceivably benefit the survival of ovarian cancer patients. Although complex mechanisms underly the development of ovarian cancer chemoresistance, here we show that XFC may significantly alter cell survival properties associated with such resistance phenotype in a cytotoxic drug resistant SKOV-3 ovarian cancer cell model.

In this study, we have further shown that XFC exhibited antiproliferative activity against several cell line models of breast, ovarian and colon cancer. We found that the percentage of growth inhibition was dose dependent with the best XFC antiproliferative effect against ovarian chemosensitive ES-2 and chemoresistant SKOV-3 cancer cells. It has been reported that XFC contains 3,4-dihydroxybenzaldehyde that inhibits human U937 cancer cells (Lee et al., 2008). Two xanthanolate sesquiterpene lactones, 8-epi-xanthatin and 8-epi-xanthatin-5 β -epoxide have also been isolated from leaves that inhibit different cancer cell lines such as A549 (lung), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (CNS) and HCT-15 (colon) (Kim et al., 2003). Whether these also alter ES-2 and SKOV-3 cell lines will have to be further examined although traditional medicinal research emphasises that the mixture of herbal extracts usually has lower toxicity and higher efficacy than individual molecules (Wong et al., 2010). For instance, the crude extract of *Rabdosia rubescens* has shown higher synergistic effects at several concentrations than its individual active ingredients. Furthermore, the total phenolic extract of blueberry was also found to significantly inhibit the growth of several oral (CAL27 and KB) and prostate (22RV1, RWPE-2, and RWPE-1) cancer cell lines (Seeram et al., 2004). As reported previously, the impact of XFC treatment is therefor not just related to one specific chemical compound, but it is the synergistic actions of different compounds that gives such an inhibitory effect (Al-Mekhlafi et al., 2017). Therefore, further fractionation of XFC may result in the loss of its integrity and potential therapeutic potential. This further justifies the use of total extracts in the treatment of various diseases.

Natural or synthetic anti-mitotic molecules constitute a considerable source of anti-cancer drugs since tumor cells are characterized by high mitotic activity as compared to normal cells. As such, anti-mitotic drugs have proven very effective against a wide range of tumors (Jordan and Wilson, 2004). In response to induced mitotic spindle disturbances, cells are arrested in mitosis and, after prolonged mitotic arrest, undergo apoptosis, a feature of the anti-cancer effects elicited by these drugs (Mollinedo and Gajate, 2003; Jordan and Wilson, 2004; Rieder and Maiato, 2004). Our study demonstrates that XFC selectively induces a mitotic arrest in ES-2 and SKOV-3 cells, leading to decreased cell growth and viability in a dose- and time-dependent manner (Fig.4). XFC also inhibited normal mitotic progression by interfering with the metaphase to anaphase transition, consistent with previous data showing an anti-tubulin action of the extract (Piloto Ferrer et al., 2011; Sánchez-Lamar et al., 2016). Our data, showing an impairment in anaphase entrance, demonstrate that XFC interferes with the normal function of the mitotic spindle, which effects resemble to those displayed by other well-known anti-mitotic drugs (Manchado et al., 2012).

Recurrence and therapy resistance following chemotherapy recently highlighted an integral role of ovarian cancer stem cells (CSC) (Walters Haygood et al., 2014). Overcoming such therapeutic resistance phenotype conferred by CSC has gained interest, as a reason of chemoresistance in ovarian tumors, through the use of chemotherapeutic drugs in combination with metabolism targeting approaches (Li et al., 2018). Whether XFC or dietary-mediated intervention can also target ovarian CSC death remains to be explored. Evidence suggests that deregulation of key pro- and anti-apoptotic pathways represents a key event in the acquisition and maintenance of ovarian cancer chemoresistance (Fraser et al., 2003). Furthermore, the discovery of novel interactions between apoptosis and necrosis pathways confirms that chemoresistance may be multi-factorial. In our study, we provide evidence that XFC is able to trigger apoptosis in both sensitive (ES-2) and chemoresistant (SKOV-3) ovarian cancer cells (Fig.2 and Fig.3). Interestingly, significant XFC-mediated necrosis induction was only observed in SKOV-3 cells, suggesting that the ability of the ovarian cancer cell to escape the cytotoxic insult to XFC is a consequence of the overall necroptotic balance response of that cell.

Key proteins in cell cycle regulation, including c-myc, p21, Cdk4 and Cyclin D3, were all recently documented as potential prognostic factors in myoepithelial carcinoma of salivary glands (Passador-Santos et al., 2016). Among the numerous target genes of MYC, Cdk4 and Cyclin D1 impact cell division as both regulate cell cycle progression and lead to enhanced proliferation (Weinberg, 2007). Furthermore, Cdk inhibitors p15, p21 and p27 are downregulated by MYC, which impacts cell cycle progression in early and mid-G1 (Weinberg, 2007). Our study currently highlights the capacity of XFC to specifically decrease Cdk4, Cyclin D3, and p27 expressions in chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells (Fig.7B). Moreover, its capacity to differentially target the microtubule dynamics, and to further trigger necrosis events in that same model suggests that differential cell death decisions may be involved in line with the nature of the anticancer molecules content. The XFC-mediated mitotic arrest and increased necrosis that we observed in our SKOV-3 ovarian cancer cell model further appeared to be secondary to accumulation of polymerized microtubules, in line with previously reported Taxol-induced transient mitotic arrest also associated with cell necrosis (Hruban et al., 1989). Finally, caspase-independent apoptosis, triggered by the inhibition of cancer cell proliferation by berry juices, appeared to, similarly to XFC treatments, involve cell-cycle arrest, as evidenced by down-regulation in the expression of Cdk4, Cdk6, Cyclin D1 and Cyclin D3 in PC-3 prostate cancer cells (Boivin et al., 2007).

In conclusion, the cell death biochemical pathways believed to downregulate cell survival and how XFC counteracts therapy resistance mechanisms will still require some more research. However, our study provides the fundamental cellular mechanisms which appear to be efficiently targeted by XFC and which may enable to circumvent ovarian cancer cell chemoresistance.

Acknowledgments : We thank Annie Levert and Denis Flipo for helpful technical assistance.
BA holds an Institutional UQAM Research Chair in Cancer Prevention and Treatment.

3.7 References

- Al-Mekhlafi FA, Abutaha N, Mashaly AMA, Nasr FA, Ibrahim KE, Wadaan MA. (2017) Biological activity of *Xanthium strumarium* seed extracts on different cancer cell lines and *Aedes caspius*, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi J Biol Sci.* 24(4):817-821.
- Berek JS: Epithelial ovarian cancer. (2000) In: *Practical Gynecologic Oncology*. Berek JS and Hacker NF (eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp457.
- Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Béliveau R. (2007) Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer Res.* 27(2):937-948.
- Brown R, Clugston C, Burns P, Edlin A, Vasey P, Vojtesek B, Kaye SB (1993) Increased accumulation of p53 protein in cisplatin resistant ovarian cell lines. *Int J Cancer* 55:678-684.
- Cragg GM, Newman DJ. (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 1830(6):3670-3695.
- Di Leo A, Bajetta E, Biganzoli L, Bohm S, Mariani L, Mènard S, Pilotti S, Fabbiani M, Gebbia V, Oriana S, et al. (1995) An I.T.M.O. group study on second-line treatment in advanced epithelial ovarian cancer: an attempt to identify clinical and biological factors determining prognosis. *Eur J Cancer* 31A: 2248-2254.
- Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, Yan X, Thompson WE, Tsang BK. (2003) Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:66.
- Guzmán-Ocampo DC, Aguayo-Ortiz R, Cano-González L, Castillo R, Hernández-Campos A, Dominguez L. (2018) Effects of the Protonation State of Titratable Residues and the Presence of Water Molecules on Nocodazole Binding to β -Tubulin. *ChemMedChem.* 13(1):20-24.
- Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ (1996) The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 56:2178-2184.

- Hruban RH, Yardley JH, Donehower RC, Boitnott JK. (1989) Taxol toxicity. Epithelial necrosis in the gastrointestinal tract associated with polymerized microtubule accumulation and mitotic arrest. *Cancer*. 63(10):1944-1950.
- Iranshahy M, Iranshahi M, Abtahi SR, Karimi G. (2018) The role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in hepatoprotective activity of natural products: A review. *Food Chem Toxicol*. 120:261-276.
- Jordan, M.A., Wilson, L. (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4:253-265.
- Kamboj, A., Saluja, AK. (2010) Phytopharmacological review of *Xanthium strumarium* L. *International Journal of Green Pharmacy* 4(3):129-139.
- Kim, H., Lee, I., Yeo, S., Seong, L., Yu, T. (2003) Isolation and Characterization of Antitumor Agents from *Xanthium strumarium* L. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* 18:324-328.
- Kovács A1, Vasas A, Forgo P, Réthy B, Zupkó I, Hohmann J. (2009) Xanthanolides with antitumour activity from *Xanthium italicum*. *Z Naturforsch C*. 64(5-6):343-349.
- Lee DH., Szczepanski M., Lee Y.J., Lee D.H., Szczepanski M., Lee Y.J. (2008) Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 75:2345–2355.
- Li SS, Ma J, Wong AST. (2018) Chemoresistance in ovarian cancer: exploiting cancer stem cell metabolism. *J Gynecol Oncol*. 29(2):e32.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2(2):329-333.
- Lin B, Zhao Y, Han P, Yue W, Ma XQ, Rahman K, Zheng CJ, Qin LP, Han T. (2014) Anti-arthritic activity of *Xanthium strumarium* L. extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol*. 155(1):248-255.
- Ma Q. (2015) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-426.
- Manchado, E., Guillamot, M., Malumbres, M. (2012) Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ*. 19:369–377.
- Menon GS1, Kuchroo K, Dasgupta D. (2001) Interaction of microtubules with active principles of *Xanthium strumarium*. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 33(2):153-162.

- Mollinedo, F., Gajate, C. (2003) Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8:413-450.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2):55-63.
- Nishio K, Saijo N. (1999) Cytoskeletons and antimetabolic agents developed in Japan. *Anticancer Drug Des*. 14(2):133-141.
- Passador-Santos F, Grönroos M, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Perez-Ordóñez B, Mäkitie A, Leivo I. (2016) Clinicopathological characteristics and cell cycle proteins as potential prognostic factors in myoepithelial carcinoma of salivary glands. *Virchows Arch*. 468(3):305-312.
- Perez EA. (2009) Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther*. 8(8):2086-2095.
- Piloto Ferrer J, Cozzi R, Cornetta T, Stano P, Fiore M, Degrassi F, De Salvia R, Remigio A, Francisco M, Quiñones O, Valdivia D, González ML, Pérez C, Sánchez-Lamar A. (2014). *Xanthium strumarium* L. extracts produce DNA damage mediated by cytotoxicity in in vitro assays but does not induce micronucleus in mice. *BioMed Res. Int.*, 575197.
- Ramírez-Erosa I, Huang Y, Hickie RA, Sutherland RG, Barl B. (2007) Xanthatin and xanthosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. *Can J Physiol Pharmacol*. 85(11):1160-1172.
- Rauch A, Carlstedt A, Emmerich C, Mustafa AM, Göder A, Knauer SK, Linnebacher M, Heinzl T, Krämer OH. (2018) Survivin antagonizes chemotherapy-induced cell death of colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 9(45):27835-27850.
- Rieder, C.L., Maiato, H. (2004) Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* 7:637-651.
- Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(12):4538-4542.
- Sánchez-Lamar A, Piloto-Ferrer J, Fiore M, Stano P, Cozzi R, Tofani D, Cundari E, Francisco M, Romero A, González ML, Degrassi F. (2016) *Xanthium strumarium*

- extract inhibits mammalian cell proliferation through mitotic spindle disruption mediated by xanthatin. *J Ethnopharmacol.* 194:781-788.
- Seeram N.P., Adams L.S., Hardy M.L., Heber D. (2004) Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 52:2512-2517.
- Shen K: Chemotherapy in ovarian cancer. (2002) In: *Challenges and Controversies in Gynecologic Oncology*. Shen K and Lang JH (eds). People's Medical Publishing House, Beijing, pp99-100.
- Vasas A, Hohmann J. (2011) Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity. *Nat Prod Rep.* 28(4):824-842.
- Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney SG (1997) Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity. *Cytometry* 27:54-64.
- Vidal A, Koff A. (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene.* 247(1-2):1-15.
- Walters Haygood CL, Arend RC, Straughn JM, Buchsbaum DJ. (2014) Ovarian cancer stem cells: Can targeted therapy lead to improved progression-free survival? *World J Stem Cells.* 6(4):441-447.
- Weinberg R (2007) pRB and control of the cell cycle clock. In: Weinberg R (ed) *The biology of cancer*, first Edn. Garland Science, New York, pp 255–306
- Whelan RD, Hosking LK, Townsend AJ, Cowan KH, Hill BT. (1989) Differential increases in glutathione S-transferase activities in a range of multidrug-resistant human tumor cell lines. *Cancer Commun.* 1(6):359-365.
- Wong A.M., Zhang Y., Kesler K. (2010) Genomic and in vivo evidence of synergy of a herbal extract compared to its most active ingredient: *Rabdosia rubescens* vs. oridonin. *Exp. Ther. Med.* 1:1013-1017.
- Yan XD, Li M, Yuan Y, Mao N, Pan LY. (2007) Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different administrations. *Oncol Rep.* 17(5):1163-1169.

3.7 Figure Legends

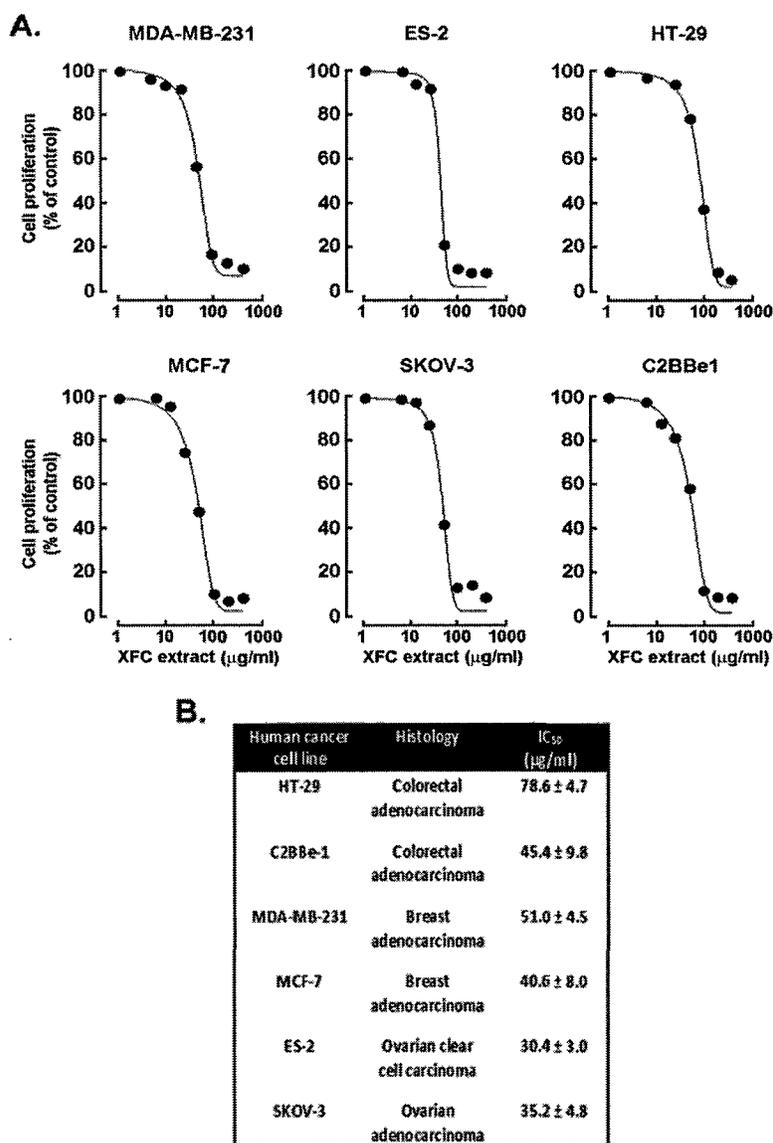


Fig.1. Impact of the Xanthium strumarium L extract (XFC) on breast, ovarian and colorectal cancer cells proliferation. Mid-log phase human cancer cell models derived from breast adenocarcinomas (MCF-7, MDA-MB-231), from colorectal adenocarcinomas (HT-29, C2BBE-1), from ovarian clear cell carcinoma (ES-2), and from ovarian adenocarcinoma (SKOV-3) were seeded in a 96-well plate at 10³ cells/well density in 200 µl medium, and cultured as described in the Methods section. Cells were then A) treated with increasing concentrations of XFC for 72 hours, then were incubated with MTT (5 mg/mL) for 4 hours in order to quantify cell proliferation (a representative curve is shown for each cell line). B) IC₅₀ values were extracted for each cell line treatment which was performed in three independent experiments.

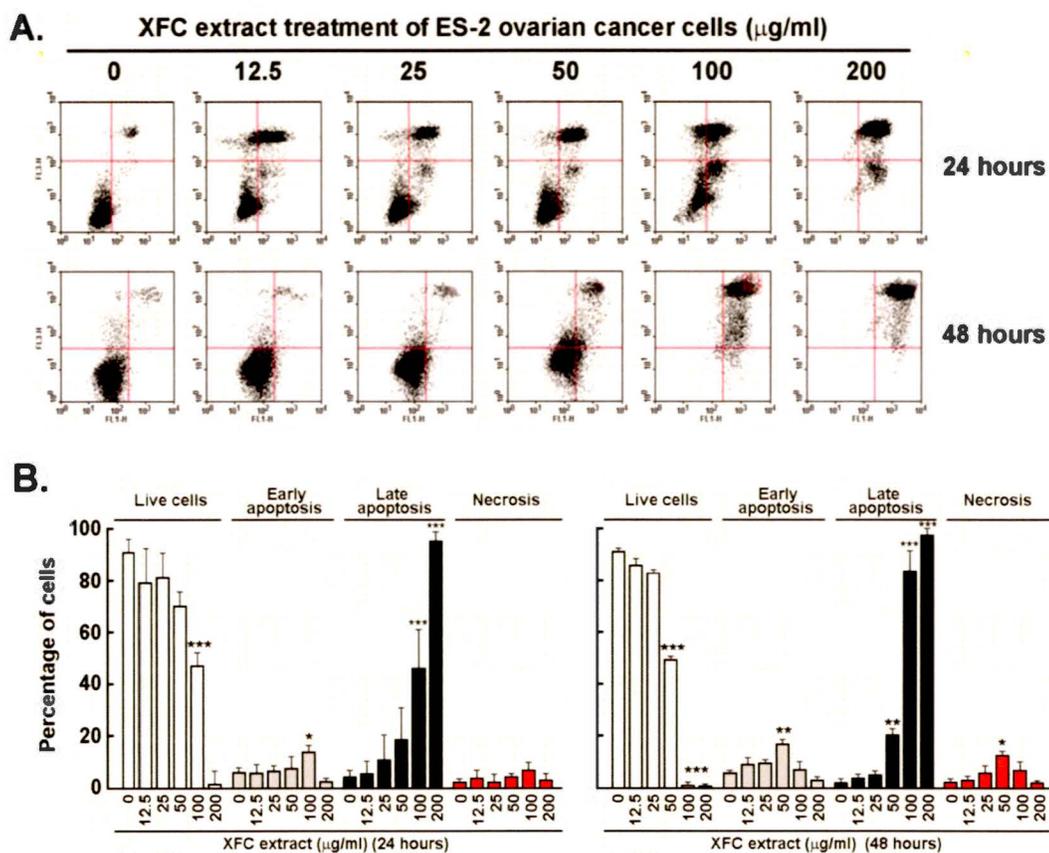


Fig.2. XFC triggers late apoptosis in ES-2 ovarian cancer cells. Human ovarian clear cell carcinoma (ES-2) were cultured as described in the Methods section. Treatment with increasing concentrations of XFC was performed in serum-free media for 24 or 48 hours and A) data acquisition by flow cytometry was determined by fluorescence intensity of incorporated Annexin V/PI in order to assess cell death phases. B) Histogram distribution of percentage of live cells, early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Values are means \pm SEM of three independent experiments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control; ANOVA with Dunnett's post hoc).

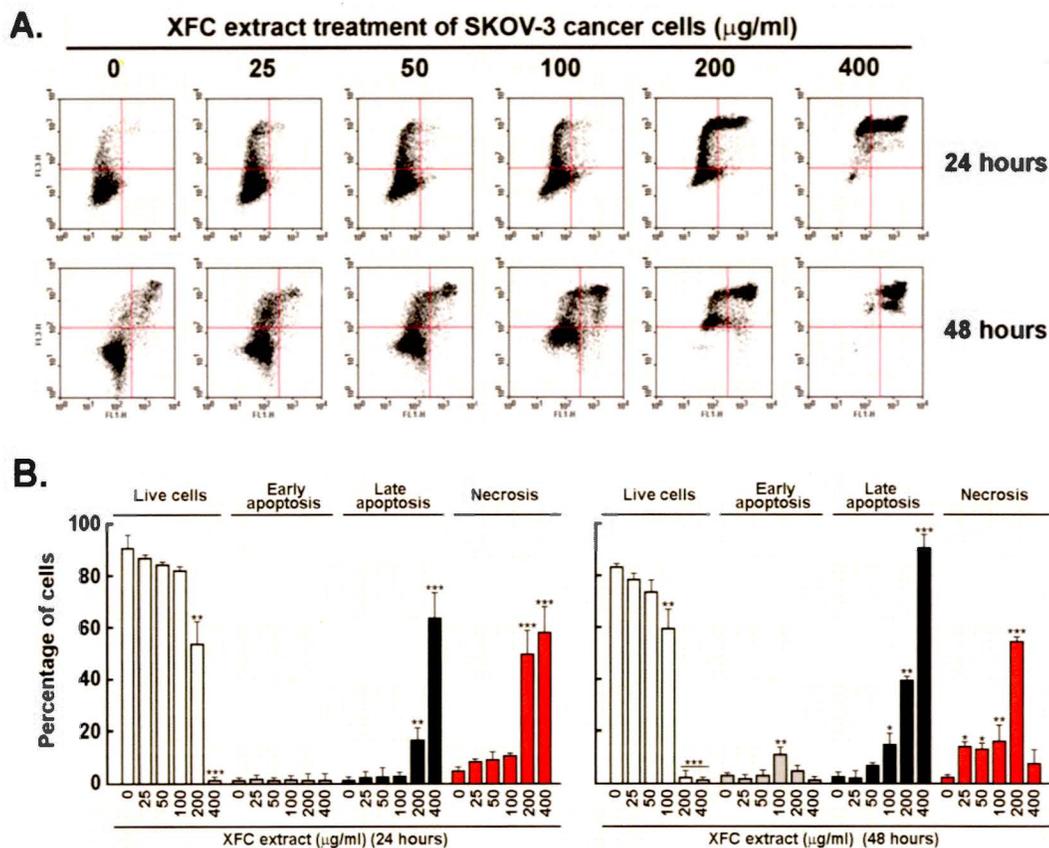


Fig.3. XFC triggers late apoptosis and necrosis in SKOV-3 ovarian cancer cells. Human ovarian adenocarcinoma (SKOV-3) cells were cultured as described in the Methods section. Treatment with increasing concentrations of XFC was performed in serum-free media for 24 or 48 hours and A) data acquisition by flow cytometry was determined by fluorescence intensity of incorporated Annexin V/PI in order to assess cell death phases. B) Histogram distribution of percentage of live cells, early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Values are means \pm SEM of three independent experiments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control; ANOVA with Dunnett's post hoc).

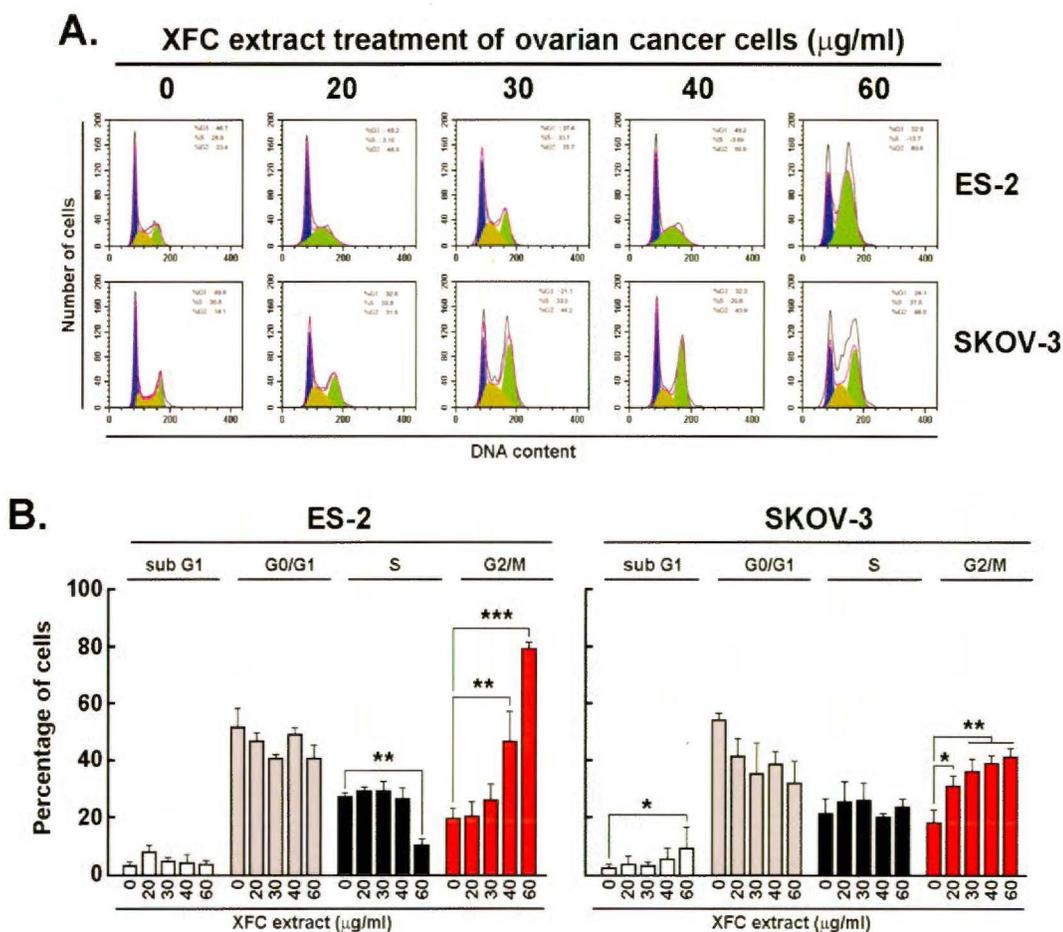
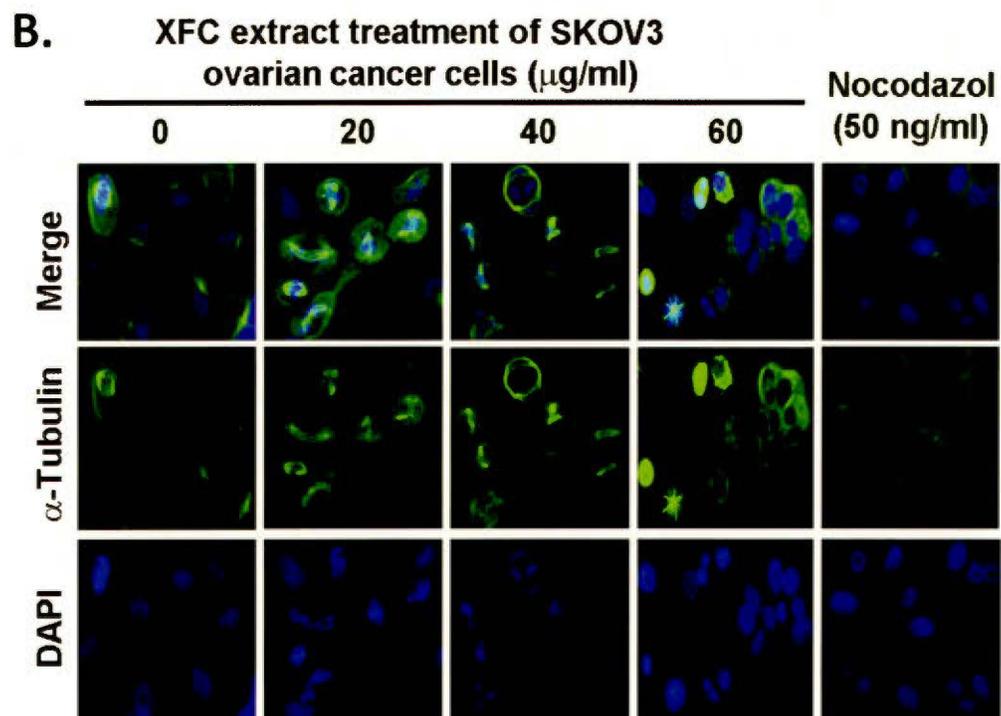
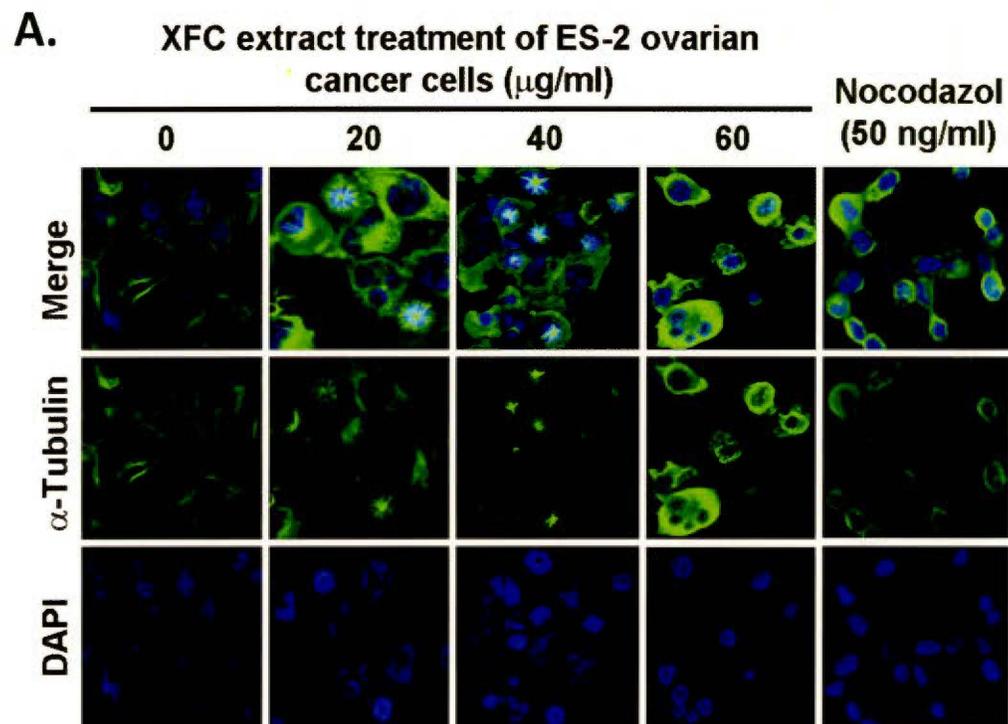


Fig.4. XFC extract alters ES-2 and SKOV-3 cell cycle division. Human ovarian clear cell carcinoma (ES-2) and human ovarian adenocarcinoma (SKOV-3) cells were cultured, followed by treatments with increasing concentrations of XFC performed in serum-free media for 24 hours, fixation, and by PI staining. A) Data acquisition was performed by flow cytometry as described in the Methods section in order to assess cell cycle phases. The individual DNA content was determined by fluorescence intensity of incorporated PI. B) Data analysis was also performed in order to assess the levels of cells in subG1, G0/G1, S, and G2/M phases. Values are means \pm SEM of three independent experiments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control; ANOVA with Dunnett's post hoc).



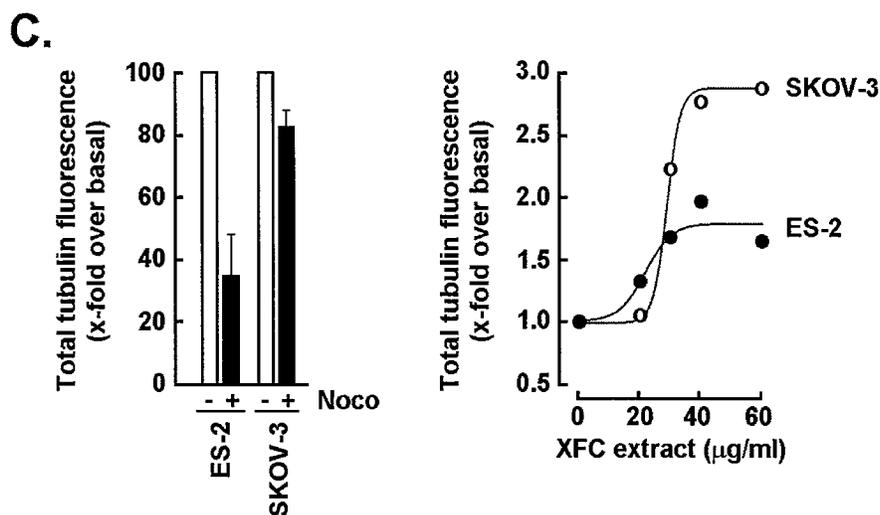


Fig.5. Preferential alteration of the tubulin cytoskeleton in the SKOV-3 ovarian cancer cells by XFC. Human ovarian clear cell carcinoma (ES-2) and human ovarian adenocarcinoma (SKOV-3) cells were cultured as described in the Methods section. Treatment with increasing concentrations of XFC or with Nocodazol was performed in serum-free media for 24 hours. Immunostaining of Tubulin was performed with anti α -Tubulin antibody. DAPI was used as a nuclear stain. Fluorescence microscopy was used for data acquisition in A) ES-2 and B) SKOV-3 ovarian cancer cells. C) Total fluorescence was acquired and data processed as described in the Methods section. Data are representative of two independent experiments.

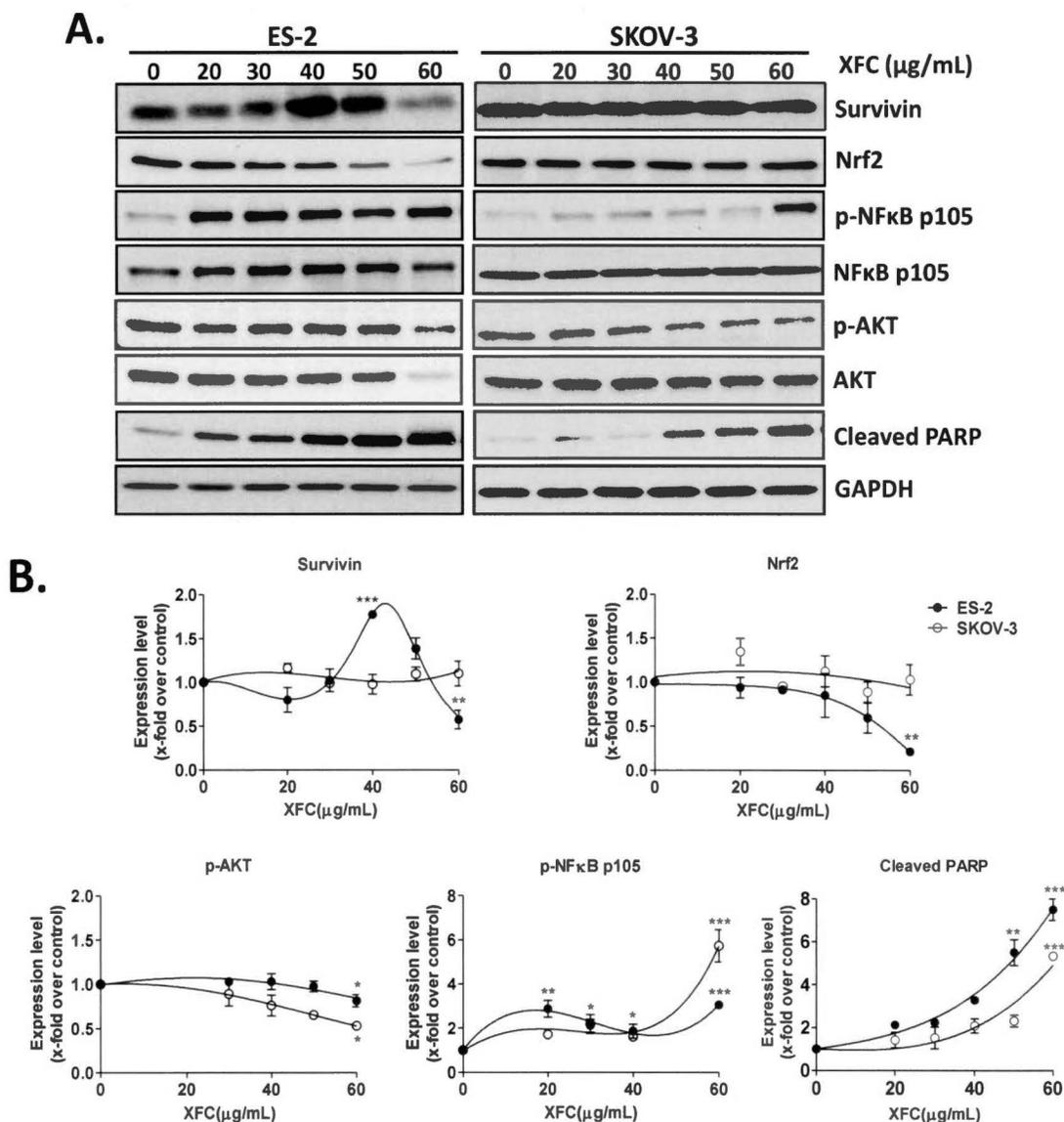


Fig.6. XFC extract triggers PARP cleavage in SKOV-3 ovarian cancer cells. Human ovarian clear cell carcinoma (ES-2) and human ovarian adenocarcinoma (SKOV-3) cells were cultured as described in the Methods section. Treatment with increasing concentrations of XFC was performed in serum-free media for 24 hours. Cell lysates were harvested, then processed for A) SDS-PAGE and Western blotting in order to assess the phosphorylation status of NF- κ B p105 and Akt, expression levels of Survivin, Nrf2, GAPDH, and cleaved PARP. B) Levels of expression were quantified using scanning densitometry using ImageJ software. GAPDH expression was used as a loading control. The relative levels of protein expression were normalized to those seen in the respective control (value=1) and indicated by x-fold. Statistically significant differences were calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control). Data are representative of three independent experiments.

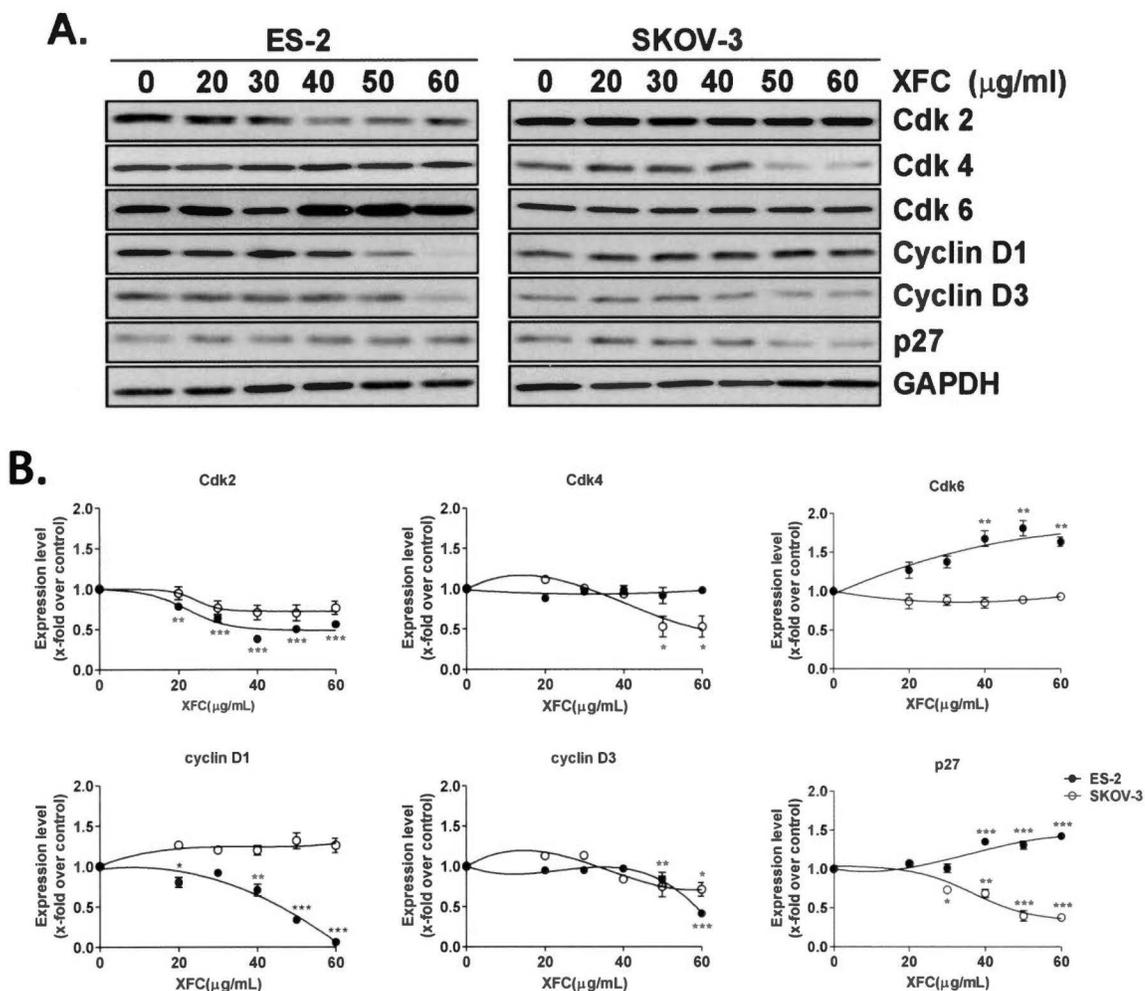


Fig. 7. XFC extract inhibits CDK4 and cyclin D3 in SKOV-3 ovarian cancer cells. Human ovarian clear cell carcinoma (ES-2) and human ovarian adenocarcinoma (SKOV-3) cells were cultured as described in the Methods section. Treatment with increasing concentrations of XFC was performed in serum-free media for 24 hours. Cell lysates were harvested, then processed for A) SDS-PAGE and Western blotting in order to assess the expression levels of Cdk2, Cdk4, Cdk6, Cyclin D1, Cyclin D3, p27, and GAPDH. B) Levels of expression were quantified using scanning densitometry using ImageJ software. GAPDH expression was used as a loading control. The relative levels of protein expression were normalized to those seen in the respective control (value=1) and indicated by x-fold. Statistically significant differences were calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus control). Data are representative of three independent experiments.

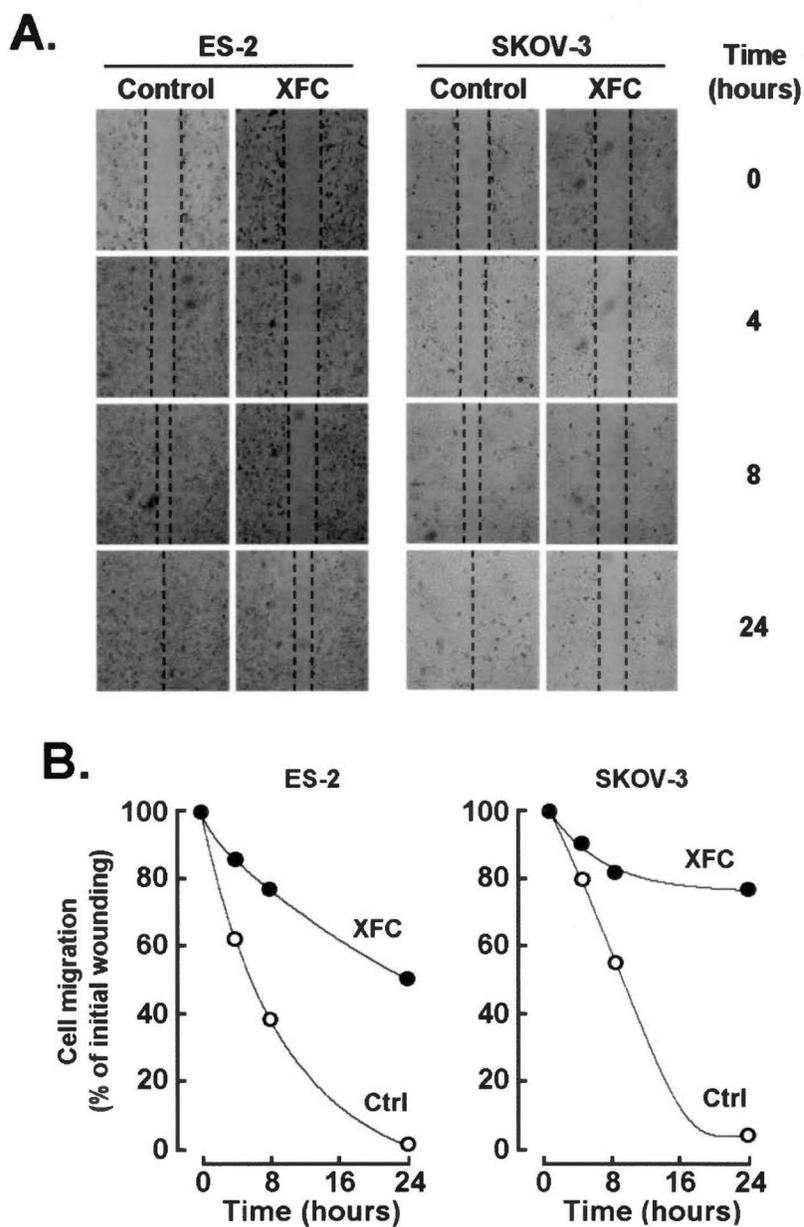


Fig.8. SKOV-3 ovarian cancer cells are resistant to the impact of XFC in a wound-healing assay. A) Photomicrographs of ES-2 and SKOV-3 cell migration, in the presence or not of 60 μ g/ml XFC, to the scratched zone at different time points (magnification, $\times 20$). B) Quantitative assessment of cells migrated into the scratched zone. For each condition, representative fields within the scratch were photographed. Data is representative from two independent experiments and are presented as a percentage of cell migration into the scratched zone in each culture medium group (control, 100%).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le cancer de l'ovaire représente la cause la plus importante de décès parmi les tumeurs malignes gynécologiques. Le cancer épithélial de l'ovaire, appelé aussi carcinome, est le plus fréquent, totalisant ensemble plus de 90 à 95% de tous les cas (McCluggage, 2011). Le carcinome de l'ovaire est souvent asymptomatique et difficile à détecter, attendu que le diagnostic survient généralement après la dissémination de la maladie au-delà des ovaires (Colombo *et al.*, 2012). La plupart des patientes atteintes du carcinome de l'ovaire sont diagnostiquées à un stade avancé (stade III-IV, FIGO), et jusqu'à 70% de celles traitées avec une approche curative finissent par récidiver et succomber à leur maladie (Coleman *et al.*, 2013). Le taux de survie globale de cinq ans généralement est de seulement 30 à 40% chez les femmes atteintes du cancer de l'ovaire avancé (Reid *et al.*, 2017).

Bien que la chimiothérapie centrée à base de platine et de taxol, qui est actuellement la modalité de traitement de choix du cancer de l'ovaire, réduise significativement les taux de mortalité et prolonge le temps de survie des patientes, le principal obstacle au succès du traitement du cancer de l'ovaire est le développement de la pharmacorésistance à la chimiothérapie combinée. Les taux de réponse de chimiothérapie initiale pour les régimes standard dans le cancer de l'ovaire épithélial varient de 60 à 75%, indiquant qu'au moins 20% des patientes sont résistantes à la chimiothérapie de première ligne (Sandercock *et al.*, 2002). Cependant, parmi celles qui répondent positivement au traitement de première ligne, une proportion rechute dans les 6 mois après leur traitement initial, ce qui indique une maladie résistante au platine. Ces patientes ont typiquement un faible taux de réponse à la chimiothérapie de deuxième ligne administrée (<15%), avec une survie sans progression de 3-4 mois et une survie médiane inférieure à une année (Davis *et al.*, 2014). Tandis que les patientes avec un intervalle sans traitement de plus de 12 mois ont un pronostic plus favorable. Néanmoins, la majorité d'entre elles finissent par succomber à la résistance à la chimiothérapie à la fois à base de platine et d'autres thérapies dans un délai de cinq ans (Borley & Brown, 2015). Malheureusement, malgré les progrès médicaux accomplis, ce type

de cancer a conservé son mauvais pronostic. Le taux de mortalité pour cette maladie n'a pas changé beaucoup pendant les 50 dernières années. De toute évidence, il est nécessaire de progresser davantage dans la résolution de ce problème.

Depuis plusieurs années déjà le lien entre la diminution dans l'incidence de certains cancers et la diète est désormais d'une évidence indéniable. De nombreuses études basées sur la population ont mis en évidence la capacité des macronutriments et des micronutriments dans les légumes et les fruits à réduire le risque de cancer (Surh, 2003). Récemment, l'attention a été concentrée sur les composés phytochimiques dérivés de plantes qui possèdent des propriétés anticancéreuses. De nombreuses études ont démontré que les composés phytochimiques chimiopréventifs peuvent bloquer l'initiation ou inverser le stade de promotion de la cancérogenèse en plusieurs étapes. Ils peuvent également arrêter ou retarder la progression des cellules précancéreuses en cellules malignes (Brausi *et al.*, 2008; Cragg & Pezzuto, 2016; Newman & Cragg, 2007; Nobili *et al.*, 2009). Dans ce sens, un extrait chloroformique obtenu à partir des parties aériennes de la plante *Xanthium strumarium* L. provenant de la flore médicinale cubaine a donc été testé sur deux lignées d'adénocarcinome ovarien, un sensible et l'autre résistante aux médicaments chimiothérapeutiques. Nous avons démontré que les composés phytochimiques présents dans cet extrait végétal sont capables de bloquer la prolifération cellulaire *in vitro* en altérant la dynamique des microtubules, affectant aussi la transition métaphase-anaphase, provoquant l'arrêt du cycle cellulaire et induisant l'apoptose par la catastrophe mitotique.

Inhibition de la prolifération cellulaire par l'extrait chloroformique de Xanthium strumarium L. (XFC)

Au cours de nos travaux, nous avons d'abord évalué l'effet antiprolifératif de l'extrait végétal sur six lignées cellulaires cancéreuses d'origine humaine, dont deux étaient des adénocarcinomes du sein, deux adénocarcinomes colorectaux et deux adénocarcinomes d'ovaire. Nous avons remarqué que l'extrait XFC a inhibé la prolifération cellulaire des six lignées cellulaires en fonction de la concentration.

La composition phytochimique de l'extrait de *X. strumarium* utilisé dans le présent travail a été rapportée par Ferrer *et al.*, dont le travail d'origine a été l'inspiration pour le développement de ce projet de recherche. La préparation de la fraction chloroformique a été effectuée au sein du laboratoire de ces groupes d'auteurs afin d'obtenir la même fraction avec les composants actifs déjà rapportés (Ferrer *et al.*, 2016). Les résultats rapportés par Ferrer *et al.*, ont montré l'activité cytotoxique de la fraction chloroformique de *X. strumarium* sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, et identifié le (-)spathulénol comme le métabolite sesquiterpénique responsable de cette activité. De même, d'autres études ont rapporté que l'extrait contient des sesquiterpènes lactones, reconnus comme les métabolites responsables de la plupart des activités biologiques de cette espèce, principalement isolés lors de l'extraction au chloroforme (Li *et al.*, 2013; Ramirez-Erosa *et al.*, 2007; Rozenblat *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2013; Vasas & Hohmann, 2011; Zhang *et al.*, 2012b). De plus, plusieurs autres phytochimiques sont contenus dans l'extrait tels que les flavonoïdes, les glycosides, les phytostérols, les acides phénoliques, les xanthiazones et il est raisonnable de penser qu'ils sont également responsables des propriétés anticancers ou qu'ils agissent en synergie entre eux.

Bien que l'extrait ait montré une inhibition de la prolifération cellulaire de plus de 50% sur toutes les lignes évaluées, il s'est montré plus efficace à inhiber la prolifération des deux lignées de cancer de l'ovaire. En comparant les valeurs d'IC₅₀ (figure 3.1B), il est constaté que les deux adénocarcinomes d'ovaire (ES-2 et SKOV-3) étaient les plus affectés par l'extrait chloroformique de *X. strumarium*. À la suite de ce résultat, nous avons dirigé nos recherches sur ces deux modèles cellulaires en tenant compte du fait qu'il était très intéressant de faire un travail comparatif entre deux lignées cellulaires avec la même origine histologique, mais avec de grandes différences dans leurs caractéristiques de pharmacorésistance. La lignée cellulaire ES-2 a été décrite comme un carcinome ovarien à cellules claires peu différenciées. Les cellules ES-2 expriment de faibles taux de P-glycoprotéine et se caractérisent par une résistance faible à modérée à un certain nombre d'agents chimiothérapeutiques, y compris la doxorubicine, le cisplatine, la carmustine, l'étoposide et la cyanomorpholinodoxorubicine (MRA-CN) (Lau *et al.*, 1991). Tandis que la lignée cellulaire SKOV-3, un adénocarcinome modérément bien différencié, présente des

mutations génomiques dans le gène TP53, est naturellement pharmorésistante au facteur de nécrose tumorale et à plusieurs médicaments cytotoxiques, y compris le cisplatine et la doxorubicine (Yan *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 1993).

En somme, les résultats obtenus sur l'inhibition ici par notre extrait démontrent donc un potentiel intéressant et prometteur dans la prévention de la formation des tumeurs solides de l'ovaire. De façon intéressante, ces données montrent que le contenu en phytochimiques actifs dans notre extrait de *X. strumarium* possède une forte action antiproliférative, même sur une lignée très résistante aux médicaments anticancéreux, résultats qui sont représentés pour la première fois dans notre travail et pour lequel il est donc impossible encore de comparer aux données de la littérature.

Perturbation du cycle cellulaire et induction de l'apoptose par l'extrait XFC

Étant donné que la résistance à l'apoptose est une caractéristique principale acquise par les cellules cancéreuses (Hanahan & Weinberg, 2000), il est important d'étudier les voies de mort cellulaire et de résistance pour sensibiliser les cellules à la mort et contrer ou contourner la chimiorésistance tumorale. La sensibilisation à la mort cellulaire est, en effet, un axe thérapeutique important dans la lutte antitumorale. Dans ce but, afin d'approfondir notre compréhension du potentiel antiprolifératif d'extrait XFC, nous avons voulu étudier l'induction de la mort cellulaire ainsi que la phase et les protéines régulatrices du cycle cellulaire.

De façon générale, le traitement avec l'extrait de *X. strumarium* a révélé que les deux lignées cellulaires ont induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M (croissance et mitose), bien qu'un effet plus prononcé ait été observé dans les cellules plus sensibles (ES-2) que dans les cellules résistantes (SKOV-3). La division cellulaire est constituée de plusieurs étapes hautement régulées et synchronisées par des protéines intervenant transitoirement et dans un ordre précis. Par conséquent, la plupart des cancers proviennent d'anomalies dans la régulation de la division cellulaire et/ou de l'apoptose. Nombreux sont les exemples, dans les tumeurs humaines, de surexpressions de cyclines, de mutations de CDKs, de mutations ou même de délétions des inhibiteurs naturels (Evan & Vousden, 2001). Dans notre étude, les

résultats obtenus sur l'arrêt des cellules tumorales dans la phase G2/M sont soutenus par des perturbations au niveau des protéines régulatrices du cycle, variant selon la lignée cellulaire. Pour les cellules ES-2 par exemple, les cyclines D1 et D3 ainsi que la kinase Cdk2 ont été inhibées de façon plus efficace, ce qui pourrait expliquer le plus grand pourcentage de cellules arrêtées en G2/M. La phase G2/M est contrôlée par les complexes formés des cyclines A et B et des kinases Cdk1 et Cdk2, alors les cellules sont bloquées dans cette phase lorsque l'une de ces protéines est diminuée (Malumbres & Barbacid, 2009). Dans le cas des cellules SKOV-3 résistantes, l'extrait a causé une accumulation des cellules en G2/M accompagnée d'une augmentation de la fraction de cellules en phase sub-G1, caractéristique des cellules apoptotiques. Cependant, aucun changement significatif n'a été observé dans les niveaux d'expression protéiques de Cdk2, Cdk6, cycline D1 et D3, tandis que les protéines Cdk4 et p27 ont diminué en fonction de l'augmentation de la concentration de l'extrait XFC. La diminution de l'expression des protéines formant le complexe cycline D:Cdk4/6 et p27 suggère généralement un arrêt des cellules en G1, mais il est également possible que ce soit à cause des cellules bloquées dans la phase G2/M, car celles-ci ont été désengagées du cycle et conservent une faible expression. Ces résultats concordent avec d'autres études qui ont montré des interférences dans le cycle cellulaire, mais seulement des constituants isolés de plantes du genre *Xanthium*, en tant qu'entités indépendantes (Bui *et al.*, 2012; Kovács *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2013).

De plus, des mesures par cytométrie en flux ont révélé l'induction de la mort cellulaire programmée par l'extrait XFC, suite à l'arrêt du cycle cellulaire des deux modèles cellulaires cancéreux ovariennes. Les cellules plus sensibles ES-2 ont montré une forte induction de l'apoptose dépendant de la concentration de l'extrait contrairement aux cellules plus résistantes SKOV-3 qui ont montré être plus sensibles à l'induction de la nécrose plutôt qu'à l'apoptose. Nos résultats obtenus sur l'induction de l'apoptose dans la lignée cellulaire ES-2 sont supportés par l'obtention de l'augmentation de la quantité de PARP clivée de façon dose dépendante de l'extrait XFC. En tant que protéine de signalisation importante impliquée dans la réparation de l'ADN et dans l'apoptose, la PARP est clivée par les caspases effectrices -3 et -7 lorsque survient l'apoptose. Par conséquent, le clivage de PARP est largement utilisé comme marqueur de l'apoptose (Liu *et al.*, 2014a). En outre, nous avons constaté que l'extrait

XFC inhibait l'activation d'Akt, une kinase que joue des rôles critiques dans la signalisation de la survie des cellules de mammifères et a été rapportée pour être activée dans divers cancers (Chang *et al.*, 2003; Clarke, 2003). Il est bien connu que l'activation d'Akt favorise la survie cellulaire en activant la voie de signalisation NF- κ B (Bai *et al.*, 2009; Ozes *et al.*, 1999) et en inhibant l'apoptose par l'inactivation de plusieurs facteurs pro-apoptotiques, par exemple en ciblant la protéine apparentée à Bcl-2 pro-apoptotique, BAD (Downward, 2004; Shultz *et al.*, 2010). Il affecte également la réponse transcriptionnelle aux stimuli apoptotiques, par exemple en agissant sur la transcription de la caspase-9 (Shultz *et al.*, 2010). Cette kinase a également été considérée comme une cible intéressante pour la prévention et le traitement du cancer. Plusieurs composés phytochimiques dont la génistéine (une isoflavone) (Kikuno *et al.*, 2008), la diosgénine (un stéroïde végétal) (Shishodia & Aggarwal, 2006), les curcuminoïdes (des composés polyphénoliques) (Aggarwal *et al.*, 2005), l'EGCG (le flavanol le plus abondant du thé vert) (Tang *et al.*, 2003) et les framboises noires (Huang *et al.*, 2006) sont connus pour inhiber l'activation d'Akt.

En plus, nous avons obtenu une augmentation de la phosphorylation du NF- κ B p105 induite par l'extrait et il a été démontré que l'activation du NF- κ B possède à la fois des fonctions pro- et anti-apoptotiques dans divers types cellulaires (Baichwal & Baeuerle, 1997; Kochupurakkal *et al.*, 2015; McNulty *et al.*, 2001). Le facteur de transcription NF- κ B est un régulateur de nombreuses fonctions telles que l'inflammation, l'angiogenèse, le cycle cellulaire, la différenciation, l'adhésion, la migration et la survie (Christian *et al.*, 2016; Karin & Lin, 2002). Dans le contexte de la mort cellulaire, NF- κ B contrôle divers facteurs de survie qui interfèrent avec les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques (Karin & Lin, 2002). Cinq facteurs de transcription RelA, RelB, cRel, NFKB1 (p105 / p50) et NFKB2 (p100 / p52) constituent la famille des facteurs de transcription de NF- κ B. Tous les cinq codent pour le domaine de liaison à l'ADN d'homologie Rel (Hoffmann *et al.*, 2006). Cependant, il a été rapporté que la protéine Rel p105, précurseur de la p50 de NF- κ B, fonctionne aussi comme un inhibiteur en liant RelA (p65) et en la maintenant dans le cytoplasme (Kochupurakkal *et al.*, 2015; McNulty *et al.*, 2001). Il y a des études qui ont montré que dans les mélanomes, la voie NF- κ B peut être altérée par l'augmentation de l'expression des sous-unités de NF- κ B p50 et RelA (McNulty *et al.*, 2001; Meyskens Jr *et al.*, 2001). Il a été étudié que l'inhibition

de NF- κ B empêche les tumeurs d'acquérir une chimiorésistance. Ainsi, divers inhibiteurs de NF- κ B ont été développés pour sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies. Plusieurs agents diététiques comme la curcumine (Nakanishi & Toi, 2005; Surh *et al.*, 2000), le resvératrol (Manna *et al.*, 2000), le gingérol (Kim *et al.*, 2004) et le flavopiridol (Takada & Aggarwal, 2003) sont des agents chimiopréventifs naturels qui se sont révélés être de puissants inhibiteurs de NF- κ B *in vitro* et *in vivo* sur divers modèles de cancers.

Parallèlement, les cellules ES-2 traitées avec l'extrait XFC ont présenté une diminution d'expression du facteur de transcription Nrf2 qui joue un rôle central dans l'activation d'une réponse antioxydante qui diminue les espèces réactives de l'oxygène (ROS), détoxifie les produits chimiques nocifs, et protège contre les dommages cellulaires. Nrf2 régule une batterie de gènes qui jouent un rôle important dans une grande variété de fonctions, telles que l'homéostasie redox cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose, la réparation de l'ADN, la réponse inflammatoire et la voie de dégradation médiée par l'ubiquitine (Homma *et al.*, 2009; Zhang, 2006). Il a été démontré que la surexpression stable de Nrf2 augmente la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques (Wang *et al.*, 2008), tandis que sa déplétion ou la surexpression de Keap1, son inhibiteur, augmente la sensibilité (Qu *et al.*, 2010). De même, certaines études ont montré que les cellules cancéreuses de l'endomètre avec des niveaux élevés d'expression de Nrf2 étaient plus résistantes aux effets toxiques des médicaments anticancéreux, tandis que l'inactivation de Nrf2 pourrait augmenter l'efficacité de la chimiothérapie (Jiang *et al.*, 2010). La voie de signalisation Nrf2 est une cible moléculaire commune pour une variété de produits naturels, qui exercent leurs activités chimiopréventives contre un large éventail de types de cancer (Surh *et al.*, 2008). Par exemple, l'étude de Zhong *et al.*, a montré que la résistance acquise des cellules MCF-7 du cancer du sein humain à la doxorubicine était liée à l'augmentation de l'expression endogène des gènes régulés par Nrf2 et Nrf2 (Zhong *et al.*, 2013). En plus, il a également été démontré que le traitement avec la wogonine, l'un des flavonoïdes actifs isolés à partir de la racine de *Scutellaria baicalensis* Georgi, a diminué la quantité de Nrf2 totale et nucléaire et rétabli la sensibilité à la doxorubicine (Zhong *et al.*, 2013). En outre, la quercétine, un flavonoïde abondant dans les fruits et les légumes, est connue pour exercer des activités

antiprolifératives contre les cellules tumorales par la dérégulation de la voie de signalisation Nrf2 (Lee *et al.*, 2015; Tanigawa *et al.*, 2007).

Au contraire de tous ces résultats, dans les cellules SKOV-3 les plus résistantes aux agents chimiothérapeutiques aucun changement du niveau d'expression de p-Akt, Akt, Nrf2 et Survivine n'a été trouvé, cependant, une augmentation de PARP clivé et P- NF- κ Bp105 en fonction de la concentration de XFC a été détectée. Nos résultats nous ont amené à considérer que la mort cellulaire induite par l'extrait XFC dans les cellules plus résistantes pourrait être due soit à l'apoptose, soit à la nécrose. De ce fait, un mécanisme alternatif de catastrophe mitotique pourrait être impliqué dans notre modèle cellulaire.

Conséquences de la perturbation de la mitose sur la prolifération cellulaire

Les microtubules sont les principaux composants structuraux dynamiques de la formation du cytosquelette au cours du développement cellulaire, du maintien de la forme cellulaire, de la division cellulaire, du transport intracellulaire et du mouvement cellulaire (Cassimeris & Spittle, 2001; Nogales, 2000). Les médicaments de liaison aux microtubules sont utilisés comme agents anticancéreux pour le traitement de divers cancers. Parmi les inhibiteurs de la dynamique de microtubules, on retrouve des inhibiteurs de la polymérisation, par exemple le nocodazole et la vinblastine, et des inhibiteurs de la dépolymérisation comme le taxol, le docétaxel et le paclitaxel, et ceux-ci ont démontré une activité anticancéreuse puissante contre divers types de cancers humains (Jordan & Wilson, 2004; Mukhtar *et al.*, 2014). Ces médicaments se lient à des sites distincts sur les microtubules ou aux dimères de tubuline et affectent la dynamique des microtubules en bloquant la phase G2/M, prolongeant ainsi le temps de transition de pro/métaphase à anaphase et induisant la mort cellulaire (Abal *et al.*, 2003; Botta *et al.*, 2008).

La détection par immunofluorescence de la tubuline a montré que *X. strumarium* affecte la dynamique des microtubules dans les deux modèles cellulaires. Les résultats obtenus dans la quantification de la fluorescence de la tubuline montrent que l'extrait tend apparemment à favoriser la polymérisation de la tubuline, présentant un effet plus important sur la lignée cellulaire SKOV-3 la plus résistante. Plusieurs autres anomalies ont été observées dans la

structure de l'appareil mitotique. Les caractéristiques les plus remarquables étaient la formation de fuseaux mitotiques multipolaires due à l'agrégation d'autres pôles ressemblant à des asters, ainsi que des fuseaux monopolaires dus à la non-séparation des centrioles, les défauts d'assemblage des microtubules qui ont conduit à des structures désorganisées, des chromosomes désalignés et des fuseaux complètement fragmentés. Les cellules résultant de telles mitoses forment des cellules contenant des micronoyaux en interphase. Ces micronoyaux sont visibles dès la cytokinèse, où l'ADN se décondense et la membrane nucléaire se reforme. Ces résultats valident le fuseau mitotique comme une cible moléculaire de l'espèce *X. strumarium* et corroborent l'interférence avec la dynamique des microtubules qui a causé une mauvaise ségrégation des chromosomes qui pourrait suggérer l'activation de point de contrôle de l'assemblage du fuseau ou « *spindle assembly checkpoint* » (SAC) avec un arrêt prolongé du cycle cellulaire en mitose, spécifiquement en métaphase et de cette façon, augmente la susceptibilité des cellules à souffrir d'apoptose.

En mitose le déclenchement de l'anaphase est un événement très synchronisé qui doit être finement régulé pour éviter les erreurs de ségrégation. La séparation des chromosomes est déclenchée par l'activation de l'APC/C « *Anaphase Promoting Complex / Cyclosome* » dont nous avons vu le rôle pour adresser des protéines spécifiques au protéasome (Smits & Medema, 2001). Le point de contrôle du fuseau va jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'APC/C pour coordonner le déclenchement de l'anaphase avec l'attachement et l'alignement de tous les chromosomes (Wassmann, 2013). Il est primordial d'éviter une activation précoce de l'APC/C tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés en métaphase, car sinon ceux-ci peuvent ségréger du même côté et créer des aneuploïdies. C'est le point de contrôle du fuseau ou SAC qui permet de contrôler que l'anaphase ne démarre pas tant que tous les chromosomes ne sont pas tous correctement attachés au fuseau. Pour cela, le SAC maintient l'APC inactif afin d'empêcher la dégradation de la cycline B (Gary S. Stein & Pardee, 2004). Néanmoins, ce point de contrôle n'est pas absolu. Lorsque le fuseau mitotique est perturbé par des inhibiteurs des microtubules, le point de contrôle est activé et les cellules s'arrêtent en métaphase. Après un certain temps passé en métaphase, les cellules peuvent échapper au point de contrôle et sortir de la mitose sans pour autant avoir séparé leur ADN ni s'être clivées en deux cellules filles (Andreassen & Margolis, 1994; Brito

& Rieder, 2006). Les cellules tétraploïdes résultantes sont alors incapables de poursuivre un cycle cellulaire normal et restent arrêtées en pseudo-phase G1 (Rieder & Maiato, 2004). Ce phénomène a reçu le nom de « *mitotic slippage* » et l'arrêt résultant celui de « *post-mitotic checkpoint* » (Brito & Rieder, 2006).

D'autre part, les médicaments perturbateurs des microtubules peuvent également déclencher la mort cellulaire via la voie de la catastrophe mitotique (Nabha *et al.*, 2002). La réponse aux dommages à l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire des cellules cancéreuses les rendent plus vulnérables à la catastrophe mitotique (Burns *et al.*, 2003). La catastrophe mitotique a été décrite comme une forme aberrante de mitose associée à diverses altérations de l'ADN ou du fuseau mitotique (notamment des microtubules), couplée au dysfonctionnement des systèmes de contrôle (*checkpoints*) du cycle cellulaire (Castedo *et al.*, 2004a). Les *DNA structure checkpoints* permettent d'arrêter le cycle cellulaire en G2/M en réponse à un défaut de réplication ou à une altération de l'ADN, alors que SAC prévient l'anaphase pour assurer l'attachement des chromatides d'un même chromosome aux pôles opposés du fuseau mitotique. Étant donné que les cellules cancéreuses présentent fréquemment des déficiences des *checkpoints* du cycle cellulaire, elles sont particulièrement sensibles à l'induction de la catastrophe mitotique par de tels agents (Castedo *et al.*, 2004a). En plus, la catastrophe mitotique peut être également provoquée par fusion entre des cellules en mitose et des cellules en phase S ou G2, conduisant à l'induction d'une mitose prématurée des noyaux interphasiques (Castedo & Kroemer, 2004; Castedo *et al.*, 2004b), tel que nous avons observé dans notre étude.

Nos résultats confirment les résultats publiés précédemment par Sanchez-Lamar *et al.*, qui ont montré aussi que le traitement avec le l'extrait total de *X. strumarium* inhibe l'assemblage de fuseau mitotique affectant ainsi fortement la mitose (Sanchez-Lamar *et al.*, 2016). En plus, ces résultats sont cohérents avec les données rapportées par Piloto Ferrer *et al.*, montrant une action anti-tubuline et antiproliférative de l'extrait complet de *X. strumarium* ciblant spécifiquement la progression mitotique chez cellules de mammifères (Piloto Ferrer *et al.*, 2011).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En somme, nous avons démontré et caractérisé les propriétés anticancéreuses de l'extrait de *Xanthium strumarium* envers deux lignées cancéreuses ovariennes humaines qui se caractérisent pour être soit sensibles (ES-2), soit résistantes (SKOV-3) à la chimiothérapie. Cette étude nous a permis de démontrer pour la première fois la capacité de l'extrait *X. strumarium* à inhiber la prolifération chez des cellules de cancer de l'ovaire très résistantes à plusieurs médicaments anticancéreux. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le mode d'action de l'extrait s'exerce sur le fuseau mitotique et constituait sa principale cible d'action en interférant avec sa dynamique en affectant la transition métaphase-anaphase menant à une apoptose par la catastrophe mitotique.

La chimioprévention par des composés phytochimiques comestibles est maintenant considérée comme une approche peu coûteuse, facilement applicable, acceptable et accessible pour la lutte contre le cancer et sa gestion. Les composés naturels qui ciblent les microtubules et perturbent le fonctionnement normal du fuseau mitotique, tels que les taxanes, les vinca-alcaloïdes et les épothilones, se sont révélés être l'une des meilleures classes de médicaments chimiothérapeutiques contre le cancer disponibles à ce jour dans les cliniques. Des recherches approfondies menées depuis un demi-siècle ont permis d'identifier différentes cibles moléculaires qui peuvent potentiellement être utilisées non seulement pour le traitement du cancer, mais aussi pour la prévention, et notre recherche s'inscrit dans cette optique de prévention et traitement.

Cependant, nous avons étudié seulement deux lignées cellulaires, ce qui représente une proportion limitée des cancers ovariens et constitue donc un frein important de notre recherche. Pour remédier à cela, l'utilisation d'autres lignées cellulaires de cancer ovarien est à envisager afin d'obtenir un échantillon plus représentatif de tous les cancers ovariens au sein de la population et avoir une plus grande diversité cellulaire. De plus, plusieurs expériences complémentaires pourraient être réalisées par exemple, étudier les niveaux d'expression de plusieurs autres biomarqueurs protéiques impliqués dans le cycle cellulaire, le point de contrôle du fuseau et de l'apoptose. Effectuer des études de modélisation pour

identifier le site de liaison avec la tubuline et spécifier ainsi le mécanisme en tant qu'agent stabilisant suggéré dans cette recherche. Il serait également intéressant d'étendre l'étude à d'autres cancers, par exemple ceux du sein et de l'utérus, pour vérifier l'application de nos résultats. Éventuellement, une fois que ce potentiel a été établi *in vitro*, il serait plus que pertinent de vérifier cet aspect *in vivo*, chez des souris, afin de conclure si les résultats obtenus peuvent être reproduits dans un modèle vivant.

BIBLIOGRAPHIE

- Abal, M., Andreu, J., & Barasoain, I. (2003). *Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action*. *Current cancer drug targets* 3, 193-203.
- Aboonabi, A., & Singh, I. (2015). *Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2-ARE as an indicator and modulator of redox*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 72, 30-36.
- Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2013). *Human cancer chemoprevention: hurdles and challenges*. *Topics in current chemistry* 329, 203-220.
- Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2003). *Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy*. *Nature Reviews Cancer* 3, 502.
- Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S. K., Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2005). *Curcumin (diferuloylmethane) downregulates expression of cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and AKT activation*. *Molecular pharmacology*.
- Aghajanian, C., Blank, S. V., Goff, B. A., Judson, P. L., Teneriello, M. G., Husain, A., Sovak, M. A., Yi, J., & Nycum, L. R. (2012). *OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer*. *Journal of clinical oncology* 30, 2039.
- Álvarez, S. P., Vargas, L. E. C., Montero, D. C., Nikolayevna, S. T., Yurevich, K. V., Burkitbayevna, K. N., Konstantinovna, C. N., Osman, Y. A. H., & Ahmed, A. I. S. (2014). *Medicinal herbs, great potential and endangered problems in Asia (Kazakhstan), Africa (Egypt) and America (Cuba)*. *Cultivos Tropicales* 35, 5-16.
- Anderson Jr, D. C. (2005). *Pharmacologic prevention or delay of type 2 diabetes mellitus*. *Annals of Pharmacotherapy* 39, 102-109.
- Andreassen, P. R., & Margolis, R. L. (1994). *Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells*. *The Journal of Cell Biology* 127, 789-802.
- Anglesio, M. S., Carey, M. S., Köbel, M., MacKay, H., & Huntsman, D. G. (2011). *Clear cell carcinoma of the ovary: a report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, 2010*. *Gynecologic oncology* 121, 407-415.

- Argento, M., Hoffman, P., & Gauchez, A.-S. (2008). *Ovarian cancer detection and treatment: current situation and future prospects*. *Anticancer research* 28, 3135-3138.
- Audeh, M. W., Carmichael, J., Penson, R. T., Friedlander, M., Powell, B., Bell-McGuinn, K. M., Scott, C., Weitzel, J. N., Oaknin, A., & Loman, N. (2010). *Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial*. *The Lancet* 376, 245-251.
- Bai, D., Ueno, L., & Vogt, P. K. (2009). *Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt*. *International journal of cancer* 125, 2863-2870.
- Bai, J., Li, Y., & Zhang, G. (2017). *Cell cycle regulation and anticancer drug discovery*. *Cancer Biol Med* 14, 348-362.
- Bai, L., & Wang, S. (2014). *Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics*. *Annual review of medicine* 65, 139-155.
- Baichwal, V. R., & Baeuerle, P. A. (1997). *Apoptosis: activate NF-κB or die?* *Current Biology* 7, R94-R96.
- Bailey, H. H., Kim, K., Verma, A. K., Sielaff, K., Larson, P. O., Snow, S., Lenaghan, T., Viner, J. L., Douglas, J., & Dreckschmidt, N. E. (2010). *A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 skin cancer prevention study of α-difluoromethylornithine in subjects with previous history of skin cancer*. *Cancer prevention research* 3, 35-47.
- Baron, J. A., Sandler, R. S., Bresalier, R. S., Quan, H., Riddell, R., Lanas, A., Bolognese, J. A., Oxenius, B., Horgan, K., & Loftus, S. (2006). *A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas*. *Gastroenterology* 131, 1674-1682.
- Bartholomeusz, C., Itamochi, H., Yuan, L. X., Esteva, F. J., Wood, C. G., Terakawa, N., Hung, M.-C., & Ueno, N. T. (2005). *Bcl-2 antisense oligonucleotide overcomes resistance to E1A gene therapy in a low HER2-expressing ovarian cancer xenograft model*. *Cancer research* 65, 8406-8413.
- Bell, J., Brady, M. F., Young, R. C., Lage, J., Walker, J. L., Look, K. Y., Rose, G. S., & Spirto, N. M. (2006). *Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecologic oncology* 102, 432-439.

- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways*. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 135.
- Berghe, T. V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C., Brunk, U., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2010). *Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features*. *Cell death and differentiation* 17, 922.
- Bertagnolli, M. M., Eagle, C. J., Zauber, A. G., Redston, M., Solomon, S. D., Kim, K., Tang, J., Rosenstein, R. B., Wittes, J., & Corle, D. (2006). *Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas*. *New England Journal of Medicine* 355, 873-884.
- Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J. W., Jaquith, J. B., Morris, S. J., & Barker, P. A. (2008). *cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination*. *Molecular cell* 30, 689-700.
- Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., & Corti, A. (2006). *Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study*. *Cancer research* 66, 1234-1240.
- Bhattacharyya, A., Ear, U. S., Koller, B. H., Weichselbaum, R. R., & Bishop, D. K. (2000). *The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23899-23903.
- Bonadona, V., Bonaïti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y.-J., & Caron, O. (2011). *Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome*. *Jama* 305, 2304-2310.
- Borley, J., & Brown, R. (2015). *Epigenetic mechanisms and therapeutic targets of chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer*. *Annals of medicine* 47, 359-369.
- Botta, M., Forli, S., Magnani, M., & Manetti, F. (2008). *Molecular modeling approaches to study the binding mode on tubulin of microtubule destabilizing and stabilizing agents*. In *Tubulin-Binding Agents*, (Springer), pp. 279-328.

- Brausi, M., Rizzi, F., & Bettuzzi, S. (2008). *Chemoprevention of human prostate cancer by green tea catechins: two years later. A follow-up update*. *European urology* 54, 472-473.
- Brito, D. A., & Rieder, C. L. (2006). *Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint*. *Current Biology* 16, 1194-1200.
- Bui, V.-B., Liu, S.-T., Zhu, J.-J., Xiong, J., Zhao, Y., Yang, G.-X., Xia, G., & Hu, J.-F. (2012). *Sesquiterpene lactones from the aerial parts of Xanthium sibiricum and their cytotoxic effects on human cancer cell lines*. *Phytochemistry Letters* 5, 685-689.
- Burger, R. A., Brady, M. F., Bookman, M. A., Fleming, G. F., Monk, B. J., Huang, H., Mannel, R. S., Homesley, H. D., Fowler, J., & Greer, B. E. (2011). *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. *New England Journal of Medicine* 365, 2473-2483.
- Burger, R. A., Sill, M. W., Monk, B. J., Greer, B. E., & Sorosky, J. I. (2007). *Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study*. *Journal of clinical oncology* 25, 5165-5171.
- Burgess, D. J. (2013). *Apoptosis: Refined and lethal*. *Nature Reviews Cancer* 13, 79.
- Burns, T. F., Fei, P., Scata, K. A., Dicker, D. T., & El-Deiry, W. S. (2003). *Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells*. *Molecular and cellular biology* 23, 5556-5571.
- Butler, M. S., Robertson, A. A., & Cooper, M. A. (2014). *Natural product and natural product derived drugs in clinical trials*. *Natural product reports* 31, 1612-1661.
- Cassimeris, L., & Spittle, C. (2001). *Regulation of microtubule-associated proteins*. In *International review of cytology*, (Elsevier), pp. 163-226.
- Castedo, M., & Kroemer, G. (2004). *Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis*. *Journal de la Societe de biologie* 198, 97-103.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004a). *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. *Oncogene* 23, 2825.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Yakushijin, K., Horne, D., Medema, R., & Kroemer, G. (2004b). *The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe*. *Oncogene* 23, 4353.
- Chang, F., Lee, J., Navolanic, P., Steelman, L., Shelton, J., Blalock, W., Franklin, R., & McCubrey, J. (2003). *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy*. *Leukemia* 17, 590.

- Chang, S.-J., Hodeib, M., Chang, J., & Bristow, R. E. (2013). *Survival impact of complete cytoreduction to no gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: a meta-analysis*. *Gynecologic oncology* 130, 493-498.
- Chene, G., Ouellet, V., Rahimi, K., Barres, V., Provencher, D., & Mes-Masson, A. M. (2015). *The ARID1A pathway in ovarian clear cell and endometrioid carcinoma, contiguous endometriosis, and benign endometriosis*. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 130, 27-30.
- Chi, K. N., Gleave, M. E., Klasa, R., Murray, N., Bryce, C., de Menezes, D. E. L., D'Aloisio, S., & Tolcher, A. W. (2001). *A phase I dose-finding study of combined treatment with an antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer*. *Clinical Cancer Research* 7, 3920-3927.
- Christian, F., Smith, E. L., & Carmody, R. J. (2016). *The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation*. *Cells* 5.
- Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). *Necroptosis as an alternative form of programmed cell death*. *Current opinion in cell biology* 22, 263-268.
- Clarke, R. B. (2003). *p27 KIP1 phosphorylation by PKB/Akt leads to poor breast cancer prognosis*. *Breast cancer research* 5, 162.
- Coleman, R. L., Monk, B. J., Sood, A. K., & Herzog, T. J. (2013). *Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer*. *Nature reviews Clinical oncology* 10, nrclinonc. 2013.2015.
- Coleman, R. L., Sill, M. W., Bell-McGuinn, K., Aghajanian, C., Gray, H. J., Tewari, K. S., Rubin, S. C., Rutherford, T. J., Chan, J. K., Chen, A., & Swisher, E. M. (2015). *A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation - An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecol Oncol* 137, 386-391.
- Colombo, N., Peiretti, M., Garbi, A., Carinelli, S., Marini, C., Sessa, C., & Group, E. G. W. (2012). *Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Annals of oncology* 23, vii20-vii26.
- Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2012). *The genetic/metabolic transformation concept of carcinogenesis*. *Cancer metastasis reviews* 31, 123-130.

- Coukos, G., Berchuck, A., & Ozols, R. (2008). *Ovarian cancer: state of the art and future directions in translational research*, Vol 622, : Springer Science & Business Media).
- Coukos, G. B., Andrew; Ozols, Robert (2008). *Advances in Experimental Medicine and Biology: Ovarian Cancer* Vol 622, :).
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., & Newman, D. J. (2009). *Impact of natural products on developing new anti-cancer agents*. Chemical reviews 109, 3012-3043.
- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). *Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents*. Medical Principles and Practice 25, 41-59.
- Cumanda, J., Marinoni, G., De Bernardi, M., Vidari, G., & Finzi, P. V. (1991). *New sesquiterpenes from Xanthium catharticum*. Journal of natural products 54, 460-465.
- Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., Forbes, J., Edwards, R., Ashley, S., & Boyle, P. (2003). *Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials*. The Lancet 361, 296-300.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). *Cell death: critical control points*. Cell 116, 205-219.
- Dasgupta, A., Nomura, M., Shuck, R., & Yustein, J. (2016). *Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue*. International journal of molecular sciences 18.
- Davis, A., Tinker, A. V., & Friedlander, M. (2014). *"Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit?* Gynecol Oncol 133, 624-631.
- Deeraksa, A., Pan, J., Sha, Y., Liu, X.-D., Eissa, N. T., Lin, S.-H., & Yu-Lee, L. (2013). *Plk1 is upregulated in androgen-insensitive prostate cancer cells and its inhibition leads to necroptosis*. Oncogene 32, 2973.
- DeLair, D., Oliva, E., Köbel, M., Macias, A., Gilks, C. B., & Soslow, R. A. (2011). *Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases*. The American journal of surgical pathology 35, 36-44.
- Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. Paper presented at: Seminars in cell & developmental biology (Elsevier).
- Dubrez, L., Berthelet, J., & Glorian, V. (2013). *LAP proteins as targets for drug development in oncology*. OncoTargets and therapy 6, 1285.
- Duesberg, P., & Rasnick, D. (2000). *Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own*. Cell motility and the cytoskeleton 47, 81-107.

- Dunai, Z. A., Imre, G., Barna, G., Korcsmaros, T., Petak, I., Bauer, P. I., & Mihalik, R. (2012). *Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells*. PloS one 7, e41945.
- Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., Boyd, J., Reis-Filho, J. S., & Ashworth, A. (2008). *Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2*. Nature 451, 1111.
- Emi, M., Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., & Toge, T. (2005). *Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells*. Breast cancer research 7, R940.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature 411, 342.
- Faurobert, E., Bouin, A.-P., & Albiges-Rizo, C. (2015). *Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer*. Current opinion in oncology 27, 64-70.
- Favier, L. S., María, A. O., Wendel, G. H., Borkowski, E. J., Giordano, O. S., Pelzer, L., & Tonn, C. E. (2005). *Anti-ulcerogenic activity of xanthanolide sesquiterpenes from Xanthium cavanillesii in rats*. Journal of ethnopharmacology 100, 260-267.
- Ferrer, J., Zampini, I. C., Cuello, A. S., Francisco, M., Romero, A., Valdivia, D., Gonzalez, M., Carlos, S., Lamar, A., & Isla, M. I. (2016). *Cytotoxic Compounds from Aerial Organs of Xanthium strumarium*. Natural product communications 11, 371-374.
- Fiallo, V. R. F. (2008). *Las especies medicinales amenazadas en Cuba*. Revista Del Jardín Botánico Nacional 29, 77-81.
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., & Atkins, J. (1998). *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 90, 1371-1388.
- Fotopoulou, C., Savvatis, K., Kosian, P., Braicu, I., Papanikolaou, G., Pietzner, K., Schmidt, S., & Sehouli, J. (2013). *Quaternary cytoreductive surgery in ovarian cancer: does surgical effort still matter?* British journal of cancer 108, 32.
- Fujiwara, K., Nagao, S., Aotani, E., & Hasegawa, K. (2013). *Principle and evolving role of intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer*. Expert opinion on pharmacotherapy 14, 1797-1806.

- Fulda, S., & Vucic, D. (2012). *Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer*. Nature reviews Drug discovery 11, 109.
- Gary S. Stein, & Pardee, A. B. (2004). *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer (2nd Edition)*, 2 edn : Wiley-Liss).
- Gates, M. A., Rosner, B. A., Hecht, J. L., & Tworoger, S. S. (2009). *Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype*. American journal of epidemiology 171, 45-53.
- Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J.-M., & Hunt, T. (2001). *Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint*. The Journal of cell biology 153, 137-148.
- Gemignani, M. L., Schlaerth, A. C., Bogomolny, F., Barakat, R. R., Lin, O., Soslow, R., Venkatraman, E., & Boyd, J. (2003). *Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma*. Gynecologic oncology 90, 378-381.
- Gloss, B. S., & Samimi, G. (2014). *Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer*. Cancer letters 342, 257-263.
- Goff, B. A., Mandel, L., Muntz, H. G., & Melancon, C. H. (2000). *Ovarian carcinoma diagnosis*. Cancer 89, 2068-2075.
- Gonzalez, M. J. E., Robin Green, M., & Muggia, F. M. (2011). *Intraperitoneal drug delivery for ovarian cancer: why, how, who, what, and when?* Oncology 25, 156.
- Han, T., Li, H. L., Zhang, Q. Y., Han, P., Zheng, H. C., Rahman, K., & Qin, L. P. (2007). *Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of Xanthium strumarium L.* Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology 14, 825-829.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell 100, 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell 144, 646-674.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). *Cell cycle control across the eukaryotic kingdom*. Trends in cell biology 23, 345-356.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, & Darnell, J. (2008). *Molecular Cell Biology*, Fifth Edition edn : W. H. Freeman).

- Hayden, M., Pignone, M., Phillips, C., & Mulrow, C. (2002). *Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force*. *Annals of internal medicine* 136, 161-172.
- Hennessy, B. T., Timms, K. M., Carey, M. S., Gutin, A., Meyer, L. A., & Flake, D. D. (2010). *Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer*. *Journal of Clinical Oncology* 28, 3570.
- Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006). *Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module*. *Oncogene* 25, 6706.
- Homma, S., Ishii, Y., Morishima, Y., Yamadori, T., Matsuno, Y., Haraguchi, N., Kikuchi, N., Satoh, H., Sakamoto, T., Hizawa, N., *et al.* (2009). *Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 3423-3432.
- Horner, M., Ries, L., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlander, N., Altekruse, S., Feuer, E., Huang, L., & Mariotto, A. (2009). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. In,
- Hsu, F.-L., Chen, Y.-C., & Cheng, J.-T. (2000). *Caffeic acid as active principle from the fruit of xanthiumstrumarium to lower plasma glucose in diabetic rats*. *Planta medica* 66, 228-230.
- Huang, C., Li, J., Song, L., Zhang, D., Tong, Q., Ding, M., Bowman, L., Aziz, R., & Stoner, G. D. (2006). *Black raspberry extracts inhibit benzo (a) pyrene diol-epoxide-induced activator protein 1 activation and VEGF transcription by targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. *Cancer research* 66, 581-587.
- Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J. C., & Perucho, M. (2000). *Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10872-10877.
- Jiang, T., Chen, N., Zhao, F., Wang, X.-J., Kong, B., Zheng, W., & Zhang, D. D. (2010). *High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer*. *Cancer research*, 0008-5472. CAN-0010-0713.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). *Microtubules as a target for anticancer drugs*. *Nature Reviews Cancer* 4, 253.

- Jubb, A. M., & Harris, A. L. (2010). *Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer*. *The lancet oncology* 11, 1172-1183.
- Kamboj, A., & Saluja, A. K. (2010). *Phytopharmacological review of Xanthium strumarium L.(Cocklebur)*. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)* 4.
- Kang, M. H., & Reynolds, C. P. (2009). *Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy*. *Clinical cancer research* 15, 1126-1132.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). *NF- κ B at the crossroads of life and death*. *Nature immunology* 3, 221.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. *British journal of cancer* 26, 239.
- Khan, K. H., Blanco-Codecido, M., & Molife, L. R. (2014). *Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway*. *Critical reviews in oncology/hematology* 90, 200-219.
- Khan, N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). *Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise*. *Antioxidants & redox signaling* 10, 475-510.
- Kikuno, N., Shiina, H., Urakami, S., Kawamoto, K., Hirata, H., Tanaka, Y., Majid, S., Igawa, M., & Dahiya, R. (2008). *Retracted: Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells*. *International journal of cancer* 123, 552-560.
- Kim, S. O., Chun, K. S., Kundu, J. K., & Surh, Y. J. (2004). *Inhibitory effects of [6]-gingerol on PMA-induced COX-2 expression and activation of NF- κ B and p38 MAPK in mouse skin*. *Biofactors* 21, 27-31.
- Köbel, M., Kalloger, S. E., Huntsman, D. G., Santos, J. L., Swenerton, K. D., Seidman, J. D., & Gilks, C. B. (2010). *Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas*. *International Journal of Gynecological Pathology* 29, 203-211.
- Kochupurakkal, B. S., Wang, Z. C., Hua, T., Culhane, A. C., Rodig, S. J., Rajkovic-Molek, K., Lazaro, J. B., Richardson, A. L., Biswas, D. K., & Iglehart, J. D. (2015). *RelA-Induced Interferon Response Negatively Regulates Proliferation*. *PLoS One* 10, e0140243.
- Kovács, A., Vasas, A., Forgo, P., Réthy, B., Zupkó, I., & Hohmann, J. (2009). *Xanthanolides with antitumour activity from Xanthium italicum*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 64, 343-349.
- Kurman, R. J., Carcangiu, M.L., Herrington, C.S., Young, R.H. (2014). *WHO Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs*, Vol 4edn : World Health Organization).

- Lau, D. H., Lewis, A. D., Ehsan, M. N., & Sikic, B. I. (1991). *Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin*. *Cancer research* 51, 5181-5187.
- Le Tran, Q., Tezuka, Y., Ueda, J.-y., Nguyen, N. T., Maruyama, Y., Begum, K., Kim, H.-S., Wataya, Y., Tran, Q. K., & Kadota, S. (2003). *In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine*. *Journal of Ethnopharmacology* 86, 249-252.
- Ledermann, J. A., Marth, C., Carey, M. S., Birrer, M., Bowtell, D. D., Kaye, S., McNeish, I., Oza, A., Scambia, G., & Rustin, G. (2011). *Role of molecular agents and targeted therapy in clinical trials for women with ovarian cancer*. *International Journal of Gynecological Cancer* 21, 763-770.
- Lee, Y. J., Lee, D. M., & Lee, S. H. (2015). *Nrf2 Expression and Apoptosis in Quercetin-treated Malignant Mesothelioma Cells*. *Molecules and cells* 38, 416-425.
- Leonetti, C., Biroccio, A., D'angelo, C., Semple, S. C., Scarsella, M., & Zupi, G. (2007). *Therapeutic integration of c-myc and bcl-2 antisense molecules with docetaxel in a preclinical model of hormone-refractory prostate cancer*. *The Prostate* 67, 1475-1485.
- Li, W. D., Wu, Y., Zhang, L., Yan, L. G., Yin, F. Z., Ruan, J. S., Chen, Z. P., Yang, G. M., Yan, C. P., & Zhao, D. (2013). *Characterization of xanthatin: Anticancer properties and mechanisms of inhibited murine melanoma in vitro and in vivo*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 20, 865-873.
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. *Development* 140, 3079-3093.
- Lin, B., Zhao, Y., Han, P., Yue, W., Ma, X.-Q., Rahman, K., Zheng, C.-J., Qin, L.-P., & Han, T. (2014). *Anti-arthritic activity of Xanthium strumarium L. extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats*. *Journal of ethnopharmacology* 155, 248-255.
- Lippman, S. M., & Brown, P. H. (1999). *Tamoxifen prevention of breast cancer: an instance of the fingerpost*. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 1809-1819.
- Liu, J. F., Konstantinopoulos, P. A., & Matulonis, U. A. (2014a). *PARP inhibitors in ovarian cancer: current status and future promise*. *Gynecol Oncol* 133, 362-369.
- Liu, J. F., & Matulonis, U. A. (2016). *What is the place of PARP inhibitors in ovarian cancer treatment?* *Current oncology reports* 18, 29.

- Liu, X., Gao, Y., Lu, Y., Zhang, J., Li, L., & Yin, F. (2014b). *Oncogenes associated with drug resistance in ovarian cancer*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 141, 381-395.
- Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2007). *Cell death in health and disease*. *Journal of cellular and molecular medicine* 11, 1214-1224.
- Lynch, H. T., Casey, M. J., Snyder, C. L., Bewtra, C., Lynch, J. F., Butts, M., & Godwin, A. K. (2009). *Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management*. *Molecular oncology* 3, 97-137.
- Mackay, H. J., Brady, M. F., Oza, A. M., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Swart, A. M., Siddiqui, N., Colombo, N., Bookman, M. A., & Pfisterer, J. (2010). *Prognostic relevance of uncommon ovarian histology in women with stage III/IV epithelial ovarian cancer*. *International journal of gynecological cancer* 20, 945-952.
- Malpica, A., Deavers, M. T., Lu, K., Bodurka, D. C., Atkinson, E. N., Gershenson, D. M., & Silva, E. G. (2004). *Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system*. *The American journal of surgical pathology* 28, 496-504.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nature reviews Cancer* 9, 153-166.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L.-H., & Wolgemuth, D. J. (2009). *Cyclin-dependent kinases: a family portrait*. *Nature cell biology* 11, 1275.
- Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., & Aggarwal, B. B. (2000). *Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation*. *The Journal of Immunology* 164, 6509-6519.
- Markman, M. (2007). *The dilemma of carboplatin-associated hypersensitivity reactions in ovarian cancer management*. In, (Academic Press),
- McCluggage, W. G. (2011). *Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis*. *Pathology-Journal of the RCPA* 43, 420-432.
- McNulty, S. E., Tohidian, N. B., & Meyskens Jr, F. L. (2001). *RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B*. *Pigment cell research* 14, 456-465.

- Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., Hauptmann, S., & Sehouli, J. (2016). *The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications*. Archives of gynecology and obstetrics 293, 695-700.
- Meyskens Jr, F. L., McNulty, S. E., Buckmeier, J. A., Tohidian, N. B., Spillane, T. J., Kahlon, R. S., & Gonzalez, R. I. (2001). *Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes*. Free Radical Biology and Medicine 31, 799-808.
- Morgan, R. J., Armstrong, D. K., Alvarez, R. D., Bakkum-Gamez, J. N., Behbakht, K., Chen, L.-m., Copeland, L., Crispens, M. A., DeRosa, M., & Dorigo, O. (2016). *Ovarian cancer, version 1.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network 14, 1134-1163.
- Morris, M. J., Tong, W. P., Cordon-Cardo, C., Drobnjak, M., Kelly, W. K., Slovin, S. F., Terry, K. L., Siedlecki, K., Swanson, P., & Rafi, M. (2002). *Phase I trial of BCL-2 antisense oligonucleotide (G3139) administered by continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer*. Clinical Cancer Research 8, 679-683.
- Mukhtar, E., Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2014). *Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy*. Molecular cancer therapeutics.
- Nabha, S. M., Mohammad, R. M., Dandashi, M. H., Coupaye-Gerard, B., Aboukameel, A., Pettit, G. R., & Al-Katib, A. M. (2002). *Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage*. Clinical cancer research 8, 2735-2741.
- Nakanishi, C., & Toi, M. (2005). *Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs*. Nature Reviews Cancer 5, 297.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. Journal of natural products 70, 461-477.
- Nibret, E., Youns, M., Krauth-Siegel, R. L., & Wink, M. (2011). *Biological activities of xanthatin from Xanthium strumarium leaves*. Phytotherapy Research 25, 1883-1890.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). *Natural compounds for cancer treatment and prevention*. Pharmacological research 59, 365-378.
- Nogales, E. (2000). *Structural insights into microtubule function*. Annual review of biochemistry 69, 277-302.

- Norquist, B., Wurz, K. A., Pennil, C. C., Garcia, R., Gross, J., Sakai, W., Karlan, B. Y., Taniguchi, T., & Swisher, E. M. (2011). *Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas*. *Journal of clinical oncology* 29, 3008.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., & Pagano, M. (1995). *Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition*. *Molecular and cellular biology* 15, 2612-2624.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., & Hajduk, P. J. (2005). *An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours*. *Nature* 435, 677.
- Organisation Mondiale De La Santé (2013) *WHO traditional medicine strategy 2014–2023*. Consulté le May 25, 2018 sur http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090_eng.pdf;jsessionid=2076425F94BB7D20810B1E009F1CD751?sequence=1
- Organisation Mondiale De La Santé (2018) *Cancer*. Consulté le May 20, 2018 sur <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). *NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine–threonine kinase*. *Nature* 401, 82.
- Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., Mannel, R. S., DeGeest, K., Hartenbach, E. M., & Baergen, R. (2003). *Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study*. *Journal of Clinical Oncology* 21, 3194-3200.
- Pandey, D., & Rather, M. (2012). *Isolation and Identification of Phytochemicals from Xanthium strumarium*. *Int J ChemTech Res* 4, 266-271.
- Pavletich, N. P. (1999). *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors 1, 2*. *Journal of molecular biology* 287, 821-828.
- Pedrazzoli, P., Ledermann, J., Lotz, J., Leyvraz, S., Aglietta, M., Rosti, G., Champion, K., Secondino, S., Selle, F., & Ketterer, N. (2006). *High dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell support for solid tumors other than breast cancer in adults*. *Annals of oncology* 17, 1479-1488.

- Pérez Machín, M., Sueiro, M. L., de la Cruz, A., Boffill, M. A., Morón, F., Méndez, O. R., & Cárdenas, J. (2011). *Uso tradicional de plantas medicinales con acción diurética en el Municipio de Quemado de Güines, Cuba*. *Revista de Biología Tropical* 59, 1859-1867.
- Perren, T. J., Swart, A. M., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M. S., Beale, P., Cervantes, A., & Kurzeder, C. (2011). *A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer*. *New England Journal of Medicine* 365, 2484-2496.
- Piloto Ferrer, J., Stoiber, T., Vizoso Parra, A., Vega Hurtado, Y., Rodriguez Ferrada, C., Gonzalez Sanabria, M. L., & Sánchez-Lamar, A. (2011). *Search of new antimitotics compounds from the Cuban flora*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10.
- Prat, J., & FIGO (2014). *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 124, 1-5.
- Pujade-Lauraine, E. (2012). AURELIA : A randomized phase III trial evaluating bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) for platinum (PT)-resistant recurrent ovarian cancer (OC). Paper presented at: 2012 ASCO Annual Meeting Abstract No: LBA5002.
- Qu, L., Gao, P., Wang, H., Wang, X., & Tang, X. (2010). *Nrf2 down-regulated cell line H460-N5 with Keap1 over-expression increased sensitivity to anti-cancer drugs*. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban= Journal of Zhejiang University Medical sciences* 39, 6-10.
- Ramirez-Erosa, I., Huang, Y., Hickie, R. A., Sutherland, R. G., & Barl, B. (2007). *Xanthatin and xanthinosin from the burs of Xanthium strumarium L. as potential anticancer agents*. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 85, 1160-1172.
- Reid, B. M., Permuth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). *Epidemiology of ovarian cancer: a review*. *Cancer biology & medicine* 14, 9.
- Ren, F., Zhang, S., Mitchell, S. H., Butler, R., & Young, C. Y. (2000). *Tea polyphenols down-regulate the expression of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells*. *Oncogene* 19, 1924.
- Rieder, C. L., & Maiato, H. (2004). *Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint*. *Developmental cell* 7, 637-651.
- Romero, I., & Bast, R. C., Jr. (2012). *Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy*. *Endocrinology* 153, 1593-1602.

- Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y., & Dovrat, S. (2008). *Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines*. *Biochemical pharmacology* 75, 369-382.
- Sanchez-Lamar, A., Piloto-Ferrer, J., Fiore, M., Stano, P., Cozzi, R., Tofani, D., Cundari, E., Francisco, M., Romero, A., Gonzalez, M. L., & Degrassi, F. (2016). *Xanthium strumarium extract inhibits mammalian cell proliferation through mitotic spindle disruption mediated by xanthatin*. *J Ethnopharmacol* 194, 781-788.
- Sánchez, I., & Dynlacht, B. D. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. Paper presented at: Seminars in cell & developmental biology (Elsevier).
- Sandercock, J., Parmar, M., Torri, V., & Qian, W. (2002). *First-line treatment for advanced ovarian cancer: paclitaxel, platinum and the evidence*. *British journal of cancer* 87, 815.
- Sato, Y., Oketani, H., Yamada, T., Singyouchi, K. I., Ohtsubo, T., Kihara, M., Shibata, H., & Higuti, T. (1997). *A Xanthanolate with Potent Antibacterial Activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of pharmacy and pharmacology* 49, 1042-1044.
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). *Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. *Oncogene* 28, 2925.
- Schmidt, S. V., Seibert, S., Walch-Rückheim, B., Vicinus, B., Kamionka, E.-M., Pahne-Zeppenfeld, J., Solomayer, E.-F., Kim, Y.-J., Bohle, R. M., & Smola, S. (2015). *RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC-induced necroptosis, IL-1 α release, and efficient paracrine dendritic cell activation*. *Oncotarget* 6, 8635.
- Sedlakova, I., Laco, J., Caltova, K., Cervinka, M., Tosner, J., Rezac, A., & Spacek, J. (2015). *Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer*. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 25, 236-243.
- Shangary, S., Qin, D., McEachern, D., Liu, M., Miller, R. S., Qiu, S., Nikolovska-Coleska, Z., Ding, K., Wang, G., & Chen, J. (2008). *Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3933-3938.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. *Genes & development* 13, 1501-1512.

- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (2004). *Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases*. *Genes & development* 18, 2699-2711.
- Shishodia, S., & Aggarwal, B. (2006). *Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I κ B kinase activation and NF- κ B-regulated gene expression*. *Oncogene* 25, 1463.
- Shultz, J. C., Goehle, R. W., Wijesinghe, D. S., Murudkar, C., Hawkins, A. J., Shay, J. W., Minna, J. D., & Chalfant, C. E. (2010). *Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a*. *Cancer research*, 0008-5472. CAN-0010-1545.
- Smith, L. H., Morris, C. R., Yasmeen, S., Parikh-Patel, A., Cress, R. D., & Romano, P. S. (2005). *Ovarian cancer: can we make the clinical diagnosis earlier?* *Cancer* 104, 1398-1407.
- Smits, V. A., & Medema, R. H. (2001). *Checking out the G2/M transition*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1519, 1-12.
- Société canadienne du cancer (2018) *Statistiques canadiennes sur le cancer 2017*. Consulté le May 17, 2018, sur <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics-publication/?region=qc>
- Sporn, M. B., & Suh, N. (2000). *Chemoprevention of cancer*. *Carcinogenesis* 21, 525-530.
- Stuart, G. C., Kitchener, H., Bacon, M., Friedlander, M., Ledermann, J., Marth, C., Thigpen, T., & Trimble, E. (2011). *Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference*. *International Journal of Gynecological Cancer* 21, 750-755.
- Su, Z., Yang, Z., Xie, L., DeWitt, J., & Chen, Y. (2016). *Cancer therapy in the necroptosis era*. *Cell death and differentiation* 23, 748.
- Surh, Y.-J. (2003). *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. *Nature Reviews Cancer* 3, 768.
- Surh, Y.-J., Han, S. S., Keum, Y.-S., Seo, H.-J., & Lee, S. S. (2000). *Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF- κ B and AP-1*. *Biofactors* 12, 107-112.
- Surh, Y.-J., Kundu, J. K., & Na, H.-K. (2008). *Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals*. *Planta medica* 74, 1526-1539.

- Takada, Y., & Aggarwal, B. B. (2003). *Flavopiridol inhibits NF- κ B activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: Abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9*. Journal of Biological Chemistry.
- Takeda, S., Nishimura, H., Koyachi, K., Matsumoto, K., Yoshida, K., Okamoto, Y., Amamoto, T., Shindo, M., & Aramaki, H. (2013). *(-)-Xanthatin induces the prolonged expression of c-Fos through an N-acetyl-L-cysteine (NAC)-sensitive mechanism in human breast cancer MDA-MB-231 cells*. The Journal of toxicological sciences 38, 547-557.
- Takemura, R., Takaki, H., Okada, S., Shime, H., Akazawa, T., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Teshima, T., & Seya, T. (2015). *PolyI: C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumor Elimination In Vivo*. Cancer immunology research 3, 902-914.
- Tang, F. Y., Nguyen, N., & Meydani, M. (2003). *Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule*. International Journal of Cancer 106, 871-878.
- Tanigawa, S., Fujii, M., & Hou, D.-X. (2007). *Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin*. Free Radical Biology and Medicine 42, 1690-1703.
- Thibault, B., Castells, M., Delord, J. P., & Couderc, B. (2014). *Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition*. Cancer metastasis reviews 33, 17-39.
- Tovar, C., Rosinski, J., Filipovic, Z., Higgins, B., Kolinsky, K., Hilton, H., Zhao, X., Vu, B. T., Qing, W., & Packman, K. (2006). *Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 1888-1893.
- Vandenabeele, P., Berghe, T. V., & Festjens, N. (2006). *Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways*. Sci STKE 2006, pe44-pe44.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V., & Kroemer, G. (2010). *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nature reviews Molecular cell biology 11, 700.
- Vang, R., Shih, I.-M., & Kurman, R. J. (2009). *Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems*. Advances in anatomic pathology 16, 267.

- Vasas, A., & Hohmann, J. (2011). *Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity*. Natural product reports 28, 824-842.
- Verbrugge, I., Johnstone, R. W., & Smyth, M. J. (2010). *SnapShot: extrinsic apoptosis pathways*. Cell 143, 1192-1192. e1192.
- Vergote, I., Tropé, C. G., Amant, F., Kristensen, G. B., Ehlen, T., Johnson, N., Verheijen, R. H., van der Burg, M. E., Lacave, A. J., & Panici, P. B. (2010). *Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer*. New England Journal of Medicine 363, 943-953.
- Viallard, J., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J., & Reiffers, J. (2001). *Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie*. Cancer/Radiothérapie 5, 109-129.
- Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., & Wondrak, G. T. (2008). *Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2*. Carcinogenesis 29, 1235-1243.
- Wassmann, K. (2013). *Sister chromatid segregation in meiosis II: deprotection through phosphorylation*. Cell Cycle 12, 1352-1359.
- Weiderpass, E., & Tyczynski, J. E. (2015). *Epidemiology of patients with ovarian cancer with and without a BRCA1/2 mutation*. Molecular diagnosis & therapy 19, 351-364.
- Wong, R. S. (2011). *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 30, 87.
- Xuan, Y., & Hu, X. (2009). *Naturally-occurring shikonin analogues—a class of necroptotic inducers that circumvent cancer drug resistance*. Cancer letters 274, 233-242.
- Yan, X.-D., Li, M., Yuan, Y., Mao, N., & Pan, L.-Y. (2007). *Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different administrations*. Oncology reports 17, 1163-1169.
- Yin, F., Liu, X., Li, D., Wang, Q., Zhang, W., & Li, L. (2013). *Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer*. Oncology reports 30, 3-10.
- Yin, M. H., Kang, D. G., Choi, D. H., Kwon, T. O., & Lee, H. S. (2005). *Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in Oriental medicines*. Journal of Ethnopharmacology 99, 113-117.

- Yu, D., Wolf, J. K., Scanlon, M., Price, J. E., & Hung, M.-C. (1993). *Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A*. *Cancer research* 53, 891-898.
- Zhang, D.-W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.-J., Lin, S.-C., Dong, M.-Q., & Han, J. (2009). *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. *Science* 325, 332-336.
- Zhang, D. D. (2006). *Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway*. *Drug metabolism reviews* 38, 769-789.
- Zhang, L., Ruan, J., Yan, L., Li, W., Wu, Y., Tao, L., Zhang, F., Zheng, S., Wang, A., & Lu, Y. (2012a). *Xanthatin induces cell cycle arrest at G2/M checkpoint and apoptosis via disrupting NF- κ B pathway in A549 non-small-cell lung cancer cells*. *Molecules* 17, 3736-3750.
- Zhang, L., Tao, L., Ruan, J., Li, W., Wu, Y., Yan, L., Zhang, F., Fan, F., Zheng, S., & Wang, A. (2012b). *Xanthatin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma MKN-45 cells*. *Planta medica* 78, 890-895.
- Zhong, Y., Zhang, F., Sun, Z., Zhou, W., Li, Z. Y., You, Q. D., Guo, Q. L., & Hu, R. (2013). *Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7/DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response*. *Molecular carcinogenesis* 52, 824-834.