

UNIVERSITE DE STRASBOURG
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

présentée et soutenue publiquement par

Mademoiselle

Virginie LAMY

Le 29 octobre 2009

Titre :

**ETUDE DES PROPRIÉTÉS ANTI-CANCÉREUSES DES LUPULONES,
MICRO CONSTITUANTS SPECIFIQUES DU HOUBLON : ASPECTS
CELLULAIRES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES**

Directeur de Thèse : Dr. F. RAUL

Membres du jury :

Dr. Michèle KEDINGER

Pr. Jean-Louis GUÉANT

Pr. Norbert LATRUFFE

Dr. Jocelyn CERALINE

Dr. Francis RAUL

Examineur

Rapporteur Externe

Rapporteur Externe

Rapporteur Interne

Directeur de Thèse

SUMMARY

Colorectal cancer is the third most predominant cause of cancer-related death. It has been demonstrated that the consumption of fruits and vegetables contributes to a reduced risk of developing colon cancer. This has been attributed to the presence of bioactive molecules showing high chemopreventive properties. The bitter acids of hops are divided into two main categories, humulone or alpha-acid and lupulone or beta-acid. To date various potent biological properties have been reported for humulones while no information were available on the biological properties of lupulone. The objectives of this thesis were to compare death signalling pathways triggered by lupulone in the human colon adenocarcinoma SW480 cells and in their derived-metastatic SW620 cells as well as to assess their chemopreventive effects in a preclinical model of colon carcinogenesis in rats. Our data showed that lupulone induced apoptosis by activating different death pathways in SW480 cells and in SW620 cells. In the TRAIL-sensitive SW480 cells, lupulone activated TRAIL death receptors DR4 and DR5, initiating extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. In response to lupulone, SW480 cells activate the MAPK ERK and mutated-p53 pathways, inducing the activation of cancer cell survival mechanisms. In TRAIL-resistant metastatic SW620 cells, lupulone restored the sensibility of these cells to TRAIL ligand and activated mainly the MAPK p38 pathway, inducing the activation of TRAIL death receptors DR4 and DR5 and the extrinsic apoptotic pathway. In these cells the MAPK p38 pathway activated mutated-p53, which played a pro-apoptotic role. In response to lupulone, SW620 cells showed an activation of the NF- κ B factor, which might up regulate the Mcl-1 protein expression favouring mitochondrial stabilization. In the preclinical model of colon carcinogenesis in rats, lupulone (0,4 or 8 mg/kg body weight) administered in the drinking water was able to cause a drastic diminution in the number of preneoplastic lesions (aberrant crypt foci) and in the number of primary tumors. In conclusion, lupulone appears to be a promising chemopreventive/therapeutic agent with potent anti-tumoral properties on colorectal cancer. Our present data support the use of lupulone in colon cancer chemoprevention trials.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Professeur Jacques Marescaux pour son accueil au sein de l'Institut de Recherche contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD) et la mise à disposition des moyens nécessaires à la bonne réussite de ce projet de thèse des Sciences de la Vie.

Je remercie les membres du Jury, le Docteur Michèle Kedingler, le professeur Jean-Louis Guéant, le professeur Norbert Latruffe et le docteur Jocelyn Céraline pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et de contribuer ainsi à l'obtention de mon diplôme.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le docteur Francis Raul. Je vous serai toujours reconnaissante de m'avoir accordé autant de confiance pour mener ce projet à bien. Merci pour tous vos précieux conseils, pour votre disponibilité et vos magnifiques qualités humaines. Un grand merci pour avoir su me guider lors des moments de doutes ou de dispersion ainsi que pour vos précieuses corrections de manuscrits, les rendant d'un coup beaucoup plus compréhensibles. Ces trois années passées dans ce laboratoire ont été riches en expériences professionnelles et humaines et resteront inoubliables.

Un grand merci pour la personne centrale du laboratoire, Madame Francine Gossé. Je tiens à vous remercier pour votre dévouement permettant à cette équipe d'avancer toujours sereinement dans une si bonne ambiance. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, votre gentillesse et pour tout le temps passé de la formation à la culture cellulaire jusqu'à la correction de ma thèse.

Je remercie également Mlle Souad Boussarouel, pour avoir accordé de son temps afin de développer les expériences en RT-PCR ainsi que pour tous ses conseils et ses explications durant l'avancement du projet.

J'adresse également tous mes remerciements à l'équipe de pharmacognosie du Dr Annelise Lobstein sans qui la purification des extraits de lupulones n'aurait pas été possible. Merci pour votre accueil, votre générosité et votre sympathie pendant mes brefs passages dans votre laboratoire.

Je remercie chaleureusement les brasseries Carlsberg et plus particulièrement le Dr Behnam Taidi, pour la mise à disposition de la matière première enrichie en lupulones et sa

collaboration au projet, ainsi que la Région Alsace pour avoir soutenu financièrement mon projet.

Des remerciements tous particuliers pour ma chère collègue, Madame Maria-Elena Maldonado-Celis. Que dire si ce n'est que cette rencontre est une des plus jolies de ma vie. Nous avons partagé les mêmes doutes, les mêmes difficultés, les mêmes stress et les mêmes joies durant ces trois années de doctorat. Un grand merci pour tous tes conseils et pour tes sacrifices afin de m'accompagner pendant les pauses café... Merci également pour avoir apporté un peu d'exotisme et pour m'avoir initiée à quelques coutumes de la Colombie. J'espère qu'on gardera contact et que je pourrai venir découvrir ce pays que tu aimes tant.

Bien évidemment je me dois de remercier celle qui m'a tout appris pendant ma première année et qui m'a permis de trouver très rapidement mes marques dans le laboratoire, Mlle Stamatiki Roussi dite Matina. Je pense que tu dois être une des seules personnes avec qui j'ai développé une complicité aussi forte si vite. Merci pour m'avoir appris à dompter le cytomètre en flux. Merci pour ton dynamisme, pour avoir partagé tes compétences, pour nos nombreux délires, et tout simplement pour être comme tu es.

Je ne peux pas finir sans remercier de tout mon cœur, tous mes amis proches, ma famille et surtout mes parents. Merci à tous les deux d'avoir cru en moi et de m'avoir permis d'être arrivée jusque là. Merci pour votre soutien, si important à mes yeux, durant toutes ces années d'études même lors des périodes difficiles de doutes. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis, je vous aime.

Je souhaite également remercier tout particulièrement mon chéri, Thomas. Merci de m'avoir toujours encouragée pendant la thèse, de m'avoir soutenue et rassurée lors de moments de faiblesse et de stress. Merci d'être toujours là, de m'épauler et de me pousser vers le haut. Je ne serai jamais arrivée aussi facilement jusque là sans toi, merci de tout mon cœur, je t'aime.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet, tout le personnel de l'IRCAD et tous ceux que j'ai pu oublié dans ces quelques lignes.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INDEX DES FIGURES | 5 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 7 |
| OBJECTIFS..... | 9 |
| INTRODUCTION..... | 11 |
| I. LE CANCER COLORECTAL | 11 |
| 1. Epidémiologie du cancer colorectal | 11 |
| 2. La cancérogenèse colique..... | 13 |
| 3. Traitements du cancer colorectal..... | 15 |
| 3.1. Dépistage et diagnostic..... | 15 |
| 3.2. Traitements | 16 |
| II. LA MORT CELLULAIRE | 18 |
| 1. Généralités | 18 |
| 2. L'apoptose..... | 23 |
| 2.1. Généralités | 23 |
| 2.2 Les caspases | 24 |
| 2.2.1 Description | 24 |
| 2.2.2 Régulation des caspases | 25 |
| 2.3 La famille des protéines Bcl-2 | 26 |
| 2.3.1. La protéine pro-apoptotique Bid | 27 |
| 2.3.2 La protéine pro apoptotique Bax | 28 |
| 2.3.3 Les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Mcl-1 | 28 |
| 2.4. La voie intrinsèque ou mitochondriale..... | 29 |
| 2.4.1 La perméabilisation mitochondriale..... | 30 |
| 2.4.2 Formation de l'apoptosome..... | 32 |
| 2.5. La voie extrinsèque de mort cellulaire | 33 |
| 2.6. Le stress oxydatif..... | 35 |
| 2.7. La fragmentation de l'ADN..... | 36 |
| 2.8. La régulation de l'apoptose | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 2.8.1 Les voies MAP kinases (Figure 13) | 37 |
| 2.8.2 La protéine p53 (Figure 13) | 38 |
| 2.8.3 Le facteur NF- κ B (Figure 13) | 39 |
| III. LA CHIMIOPREVENTION | 41 |
| 1. Définition de la chimioprévention..... | 41 |
| 2. Identification et propriétés anti-cancérogènes des agents chimiopréventifs | 43 |
| IV. LES CONSTITUANTS DU HOUBLON : COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES..... | 46 |
| 1. La plante du houblon | 46 |
| 2. La composition chimique des cônes de houblon..... | 47 |
| 2.1. Composition chimique des résines dures de la lupuline | 47 |
| 2.1.1. Les flavonoïdes | 47 |
| 2.2 Composition chimique des résines molles de la lupuline..... | 49 |
| 2.2.1 Les acides amers du houblon | 49 |
| 2.3. Les huiles essentielles | 49 |
| 3.1. Prévention de l'initiation de la cancérogenèse..... | 51 |
| 3.1.1. Inhibition de l'activation métabolique des procarcinogènes..... | 51 |
| 3.1.2. Induction d'enzymes de détoxification | 51 |
| 3.1.3. Capture des espèces réactives à l'oxygène..... | 52 |
| 3.2. Prévention de la promotion du cancer | 52 |
| 3.2.1. Effets anti-inflammatoires des constituants du houblon | 53 |
| 3.2.2. Inhibition de l'angiogenèse | 53 |
| 3.3. Prévention de la progression du cancer | 54 |
| 3.3.1. Effets anti-prolifératifs des composés du houblon..... | 54 |
| 3.3.2. Apoptose induite par les composés du houblon | 55 |
| METHODOLOGIES | 60 |
| I. ETUDES DE BIOLOGIE CELLULAIRE..... | 60 |
| 1. Les lignées cellulaires SW480 et SW620 | 60 |
| 2. Molécules testées..... | 60 |
| 2.1 Extraction et purification des lupulones | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2 Autres molécules testées..... | 61 |
| 3. La cytométrie en flux | 62 |
| 3.1 Principe général de la technique | 62 |
| 3.2 Analyse de la mort cellulaire : apparition des corps hypodiploïdes | 64 |
| 3.3 Mesure de la production du stress oxydatif..... | 65 |
| 3.4 Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial | 66 |
| 3.5 Analyse de la fragmentation de l'ADN..... | 66 |
| 4. Analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR en temps réel..... | 67 |
| 5. Principe des tests colorimétriques et des tests ELISA | 69 |
| 5.1 Tests colorimétriques | 69 |
| 5.2 Le test ELISA | 70 |
| | |
| II. MODELE PRECLINIQUE DE CANCEROGENESE EXPERIMENTALE | 71 |
| 1. Modèle animal et traitements..... | 71 |
| 2. Mesure et détermination des cryptes aberrantes et des tumeurs coliques..... | 72 |
| | |
| RESULTATS EXPERIMENTAUX | 74 |
| | |
| CHAPITRE 1 : Etudes des effets chemopréventif des lupulones sur les cellules cancéreuses coliques humaines métastatiques SW620, ainsi que sur un modèle de cancérogenèse colorectale chez le rat | 74 |
| 1. Résumé | 75 |
| 2. Introduction | 76 |
| 3. Résultats : PUBLICATION n°1..... | 77 |
| 4. Conclusion..... | 78 |
| | |
| CHAPITRE 2 : Les lupulones activent différentes voies de mort cellulaire, impliquant les récepteurs apoptotiques de la voie TRAIL..... | 79 |
| 1. Résumé | 80 |
| 2. Introduction | 81 |
| 3. Résultats : PUBLICATION n° 2..... | 82 |
| 4. Résultats complémentaires | 83 |
| 4.1 Effets des lupulones sur l'expression des ARNm de DR4 et DR5..... | 83 |
| 4.2. Détermination de l'expression des protéines Bcl2, Mcl-1 et Bax | 85 |

| | |
|--|------------|
| 4.3. Analyse de la fragmentation d'ADN induite par les lupulones..... | 87 |
| 4.4 Etude d'un membre de la famille des inhibiteurs naturels de l'apoptose IAP : XIAP | 88 |
| 5. Conclusion..... | 90 |
| CHAPITRE 3 : Rôles de la protéine p53 mutée et du facteur de transcription NF-κB dans l'induction de la mort cellulaire par les lupulones. | 91 |
| 1. Résumé | 92 |
| 2. Introduction | 93 |
| 3. Résultats : PUBLICATION n° 3..... | 95 |
| 4.1. Détermination du rôle du facteur de transcription NF- κ B | 122 |
| 5. Conclusion..... | 125 |
| CHAPITRE 4 : Implication des voies de signalisation MAP kinases dans l'induction de l'apoptose par les lupulones. | 127 |
| 1. Résumé | 128 |
| 2. Introduction | 129 |
| 3. Résultats : PUBLICATION n°4..... | 131 |
| 4. Résultats complémentaires sur la lignée SW480 | 153 |
| 4.1. Analyse de la mort cellulaire après inhibition des voies MAPK..... | 153 |
| 4.2 Expression de la protéine p53 après inhibition de la voie ERK..... | 154 |
| 5. Conclusion..... | 156 |
| DISCUSSION GENERALE | 158 |
| I. Activation par les lupulones, des voies de signalisation des récepteurs apoptotiques de TRAIL | 158 |
| II. Régulation de l'apoptose induite par les lupulones..... | 161 |
| III. Effets des lupulones sur un modèle pré-clinique de cancérogenèse expérimentale..... | 167 |
| IV. Conclusion générale..... | 168 |
| REFERENCES BLIOGRAPHIQUES | 171 |
| PARTICIPATIONS | 189 |

INDEX DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Mortalité par cancer en France | 12 |
| Figure 2: Estimation de nouveaux cas de cancer en 2002 et mortalité. | 12 |
| Figure 3: Les différents stades du cancer colorectal | 14 |
| Figure 4: Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose. | 20 |
| Figure 5: Le processus de l'autophagie..... | 21 |
| Figure 6: Mécanismes de la catastrophe mitotique et de la sénescence | 22 |
| Figure 7: Schéma de l'activation des caspases | 25 |
| Figure 8: Les protéines de la famille Bcl-2 | 27 |
| Figure 9: Schéma de la voie intrinsèque | 30 |
| Figure 10: Chaîne respiratoire et perméabilisation mitochondriale | 31 |
| Figure 11: Assemblage de l'apoptosome | 33 |
| Figure 12: Lien entre les deux voies principales de l'apoptose | 34 |
| Figure 13: Les voies majeures de la régulation de l'apoptose | 40 |
| Figure 14: Différents agents alimentaires chimiopréventifs | 42 |
| Figure 15: Action des composés chimiopréventifs sur la cancérogenèse | 44 |
| Figure 16: La plante femelle <i>Humulus Lupulus</i> | 46 |
| Figure 17: Formation des flavonones prénylées et du xanthohumol..... | 48 |
| Figure 18: Structures chimiques des acides amers du houblon..... | 50 |
| Figure 19: Mécanismes d'action de l'induction de l'apoptose par les acides amers | 57 |
| Figure 20: Les cibles potentielles du xanthohumol lors de l'induction de l'apoptose..... | 58 |
| Figure 21: Principe de la cytométrie en flux | 63 |
| Figure 22: Analyse du cycle cellulaire des cellules SW480 et SW620..... | 64 |
| Figure 23: Mécanisme d'action du 2', 74-dichlorohydrofluorescéine (HDCF-DA)..... | 65 |
| Figure 24: Principe de la méthode TUNEL..... | 67 |
| Figure 25: Principe de la chimie Taqman en PCR en temps réel..... | 68 |
| Figure 26: Profil d'une courbe de PCR en temps réel | 69 |
| Figure 27: Principe simplifié de la méthode "ELISA" | 70 |
| Figure 28: Analyse de l'expression relative des ARNm de DR4 et DR5 | 84 |
| Figure 29: Expression des protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bax après traitement aux lupulones..... | 86 |
| Figure 30: Induction de la fragmentation d'ADN par les lupulones | 87 |
| Figure 31: Détection de la protéine XIAP en présence de lupulones..... | 89 |

| | |
|---|-----|
| Figure 32: Activation du facteur NF- κ B induite par les lupulones | 123 |
| Figure 33: Analyse de la mort cellulaire après une inhibition du facteur NF- κ B | 125 |
| Figure 34: Analyse de la mort cellulaire induite par les lupulones après une inhibition des voies MAPKs | 154 |
| Figure 35: Expression de la p53 après une inhibition de la voie ERK..... | 155 |
| Figure 36: Les mécanismes cellulaires induits par les lupulones pour les cellules SW620.. | 165 |
| Figure 37: Les mécanismes cellulaires induits par les lupulones pour les cellules SW480.. | 166 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ACF: Aberrant Crypt Foci
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
AIF: Apoptosis Inducing Factor
AOM: AsOxyMéthane
Apaf-1: Apoptotic protease-activating factor-1
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ARN: Acide RiboNucléique
ATM: *Ataxia Telangiectasia* Mutated
Bax: Bcl2-Associated X protein
Bcl-2: B-cell Lymphoma 2
Bid: BH3 Interacting Death domain agonist
BIR: *Baculovirus* IAP domain
CAM: ChorioAllantoic Membrane
CARD: CAspase Recruitment Domain
DED: Death Effector Domain
DISC: Death Inducing Signaling Complex
DMSO: DiMéthylSulfOxyde
DO: Densité Optique
EGF: Epidermal Growth Factor
Endo G: ENDOnucléase G
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
FCA: Foyers de Cryptes Aberrantes
FADD: Fas Associated Death Domain
c-FLIP: cellular FLICE Inhibitory Protein
HUVEC: HUman Vein Endothelial Cell
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IAP: Inhibitor of Apoptosis
INCA: Institut National du Cancer
INVS: Institut National de la Veille Sanitaire
IP : Iodure de Propidium
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

JNK : Jun N-terminal Kinase

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Mcl-1 : Myeloïd Cell Leucemia sequence 1

MIMP : Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization

MMP : Mitochondrial Membrane Permeabilization

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

NF- κ B : Nuclear Factor kappa B

NO: Nitric Oxid

NSAID: Non Steroïdal Anti-Inflammatory Drug

PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerase

PET-Scan ou TEP-Scan: Tomographie d'Emission par Positron couple au Scanner

PFT- α : PiFiThrin-alpha

pNA: p-nitroAniline

QNZ: QuiNaZoline

ROS: Reactive Oxygen Species

RT-PCR: Reverse Transcriptase- Polymerisation Chain Reaction

Smac/DIABLO: Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/ Direct-Inhibitor of
Apoptosis-Binding protein Low Pi

TNM: Tumor Node Metastasis

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

XIAP: X-chromosome linked IAP

OBJECTIFS

Les cancers représentent une cause majeure de mortalité dans le monde avec un taux de mortalité de 13%. Ces dernières années on constate une augmentation de l'incidence des cancers, due majoritairement au vieillissement de la population, et une diminution du taux de mortalité grâce aux efforts de la recherche, dans la prévention et la thérapie anti-cancéreuse. Le cancer colorectal se place en troisième place des cancers diagnostiqués et en deuxième place en terme de mortalité après celui du poumon. En effet, ce cancer possède un fort taux de récurrence et un haut potentiel métastatique au niveau hépatique.

Il est admis que la consommation de fruits et légumes peut contribuer à la diminution du risque de développer ce type de cancer. Ces molécules naturelles présentes dans notre alimentation ou de manière plus générale dans les plantes, ont un haut potentiel chimiopréventif car elles possèdent la capacité d'arrêter ou d'inverser la cancérogenèse dans ses étapes les plus précoces. Aujourd'hui, un grand nombre de molécules chimiopréventives ont été isolées et font l'objet de nombreuses études. Les glandes de lupulines, organes externes de la plante de houblon, contiennent de nombreux composés chimiques responsables des défenses de la plante. Parmi elles, les acides amers du houblon, les humulones et les lupulones. Ces deux familles de molécules ont des propriétés anti-bactériennes. Les humulones présentent également des propriétés anti-prolifératives et anti-angiogéniques alors que les propriétés biologiques des lupulones sont encore peu ou mal connues.

Des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont démontré que les lupulones sont capables d'empêcher la croissance cellulaire des lignées humaines cancéreuses coliques primaires SW480 et des lignées métastatiques dérivées SW620. Les objectifs de ce projet de thèse ont été dans un premier temps d'identifier et de caractériser les mécanismes cellulaires de mort induits par les lupulones dans un modèle *in vitro* de la progression du cancer colorectal représenté par la lignée cellulaire colique humaine primaire SW480 et par la lignée cellulaire dérivée métastatique SW620. Dans un deuxième temps nous avons voulu étudier les effets anti-cancéreux des lupulones dans un modèle pré-clinique de cancérogenèse expérimentale. L'ensemble des résultats devrait ainsi permettre d'identifier le potentiel chimiopréventif des lupulones et de démontrer leur importance dans les traitements du cancer colorectal

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. LE CANCER COLORECTAL

1. Epidémiologie du cancer colorectal

Le cancer est une cause de mortalité majeure dans le monde, à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004 soit 13% du taux de mortalité mondiale. En Europe, les cancers du poumon, du colon et du sein sont les trois cancers les plus fréquents, responsables de l'augmentation (2/5^{ème}) des cancers. En France, le cancer est devenu, pour la première fois en 2004, la première cause de décès, bien que le risque de décéder d'un cancer diminue depuis une dizaine d'années, témoignant des progrès réalisés en matière de prévention, de diagnostic précoce, de traitements et de prise en charge. Toutefois d'importantes inégalités sociales et spatiales de mortalité subsistent (Figure 1.) (Atlas de la mortalité par cancer en France INSERM/INC). Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent après celui de la prostate et celui du sein en France. En 2005, on estimait le nombre de nouveaux cas à 37 413 et le nombre de décès à 16 865. Bien que l'incidence de ce cancer tend à se stabiliser et la mortalité à décroître chez l'homme comme chez la femme (Parkin et coll., 2005) (Figure 2.), il reste le deuxième cancer en termes de mortalité derrière le cancer du poumon, devançant le cancer du sein et celui de la prostate (chiffres INVS et INCA). La survie dépend étroitement du stade de la maladie au moment du diagnostic. La survie relative à cinq ans pour une personne diagnostiquée au stade I, le stade le plus précoce, est de 94% tandis que la survie moyenne relative à cinq ans tous stades confondus est de 56%, montrant ainsi l'intérêt de dépister et de pouvoir prendre en charge une anomalie le plus tôt possible (INCA). Entre 1980 et 2005, le nombre de cancers colorectaux diagnostiqué a augmenté de 50% tandis que l'incidence a elle aussi augmenté, mais plus modérément de 16%. Ces variations peuvent être expliquées de plusieurs manières : le vieillissement de la population (l'âge moyen de diagnostic est d'environ 70 ans), le mode de vie, le diagnostic et les progrès thérapeutiques (Faivre et coll., 2007 ; Gennari et coll., 2007).

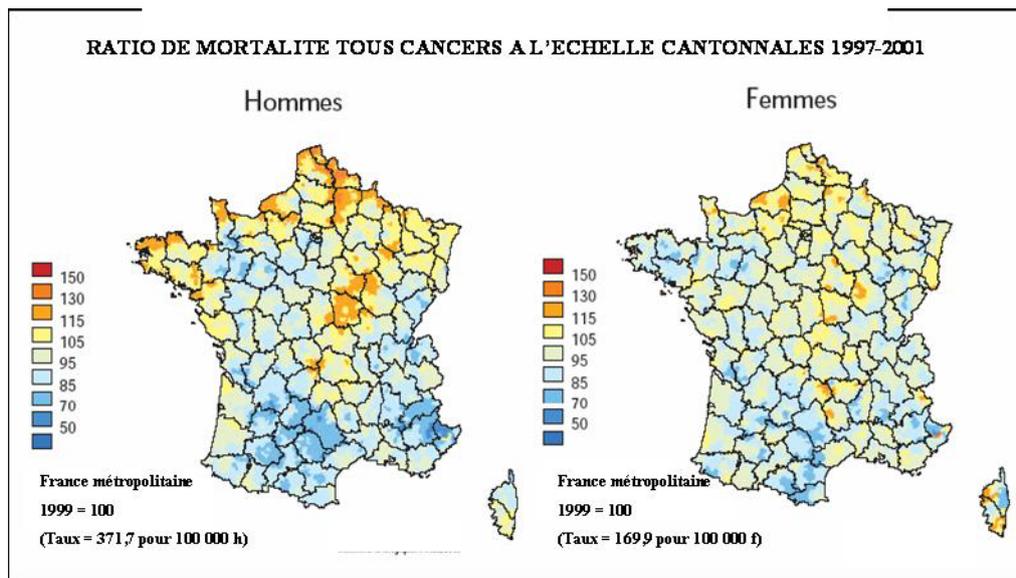


Figure 1: Mortalité par cancers en France

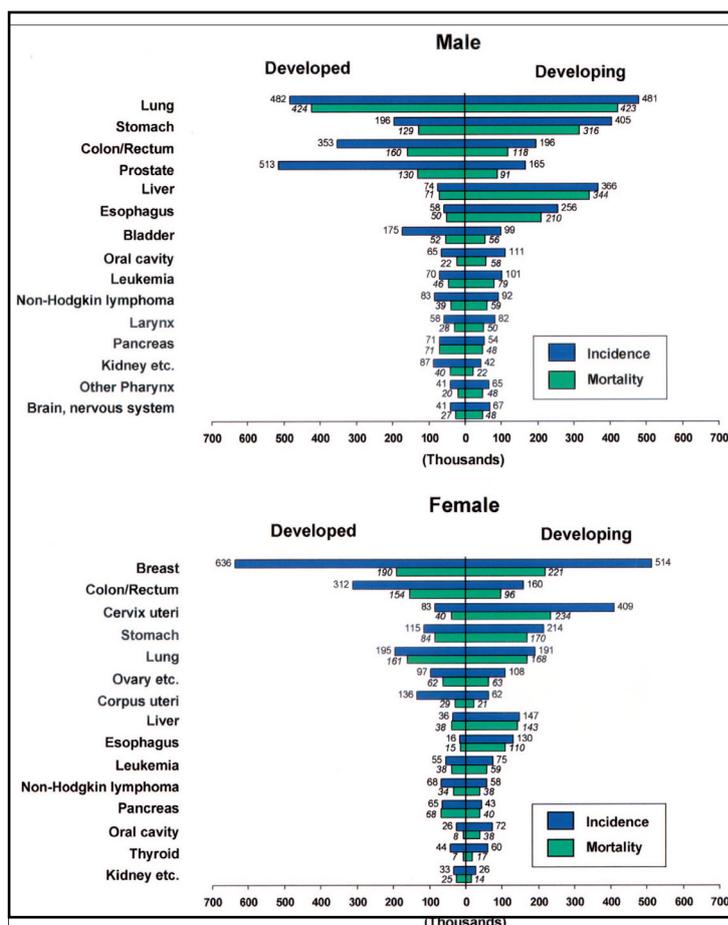


Figure 2: Estimation de nouveaux cas de cancer en 2002 et mortalité. d'après Parkin et coll., 2005.

2. La cancérogenèse colique

Le côlon se situe entre la valvule iléo-caecale et le rectum. Il est composé de quatre segments : le côlon ascendant ou droit, le côlon transverse, le côlon descendant ou gauche et enfin le côlon sigmoïde, qui est relié au rectum par la jonction recto-sigmoïdienne. Le côlon mesure environ 1,50 m et le rectum 15 cm.

La paroi colique est composée de quatre couches : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est constituée d'un épithélium monostratifié, qui pénètre à l'intérieur de cryptes, nombreuses et espacées. Lors de la cancérogenèse colique, au moment de la formation des polypes ou des adénomes, les entérocytes s'accumulent à la base des cryptes entraînant un défaut dans l'adhérence et/ou dans la migration des cellules. L'équilibre entre la division et la mort cellulaire est perturbé avec comme conséquence, une prolifération anarchique des cellules dans les cryptes. Un adénome bénin devient un adénocarcinome malin à la suite de deux grands types d'instabilité. L'instabilité chromosomique (85% des cancers colorectaux) résulte de l'altération des proto-oncogènes, qui activent la prolifération cellulaire (ras, mutation dominante dans 50% des cancers colorectaux) et des gènes suppresseurs de tumeurs (gène APC, p53). L'instabilité génomique résulte d'anomalies de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (15% des cancers colorectaux). Une faible proportion des cancers colorectaux (2 à 3%) est liée à une prédisposition génétique due à des mutations de gènes (*APC Adenomatous polyposis coli*).

La cancérogenèse est caractérisée par trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation est la phase d'acquisition de caractères néoplasiques suite à des lésions stables et irréversibles de l'ADN induites par un agent carcinogène. L'apparition des cellules initiées est nécessaire mais pas suffisante pour conduire au développement tumoral. Durant la phase de promotion, des facteurs vont intervenir pour permettre le passage des cellules initiées d'un état quiescent à un état prolifératif, entraînant alors la transformation des cellules cancéreuses en clones cancéreux. Cette étape est une étape réversible si l'exposition à l'agent n'est pas réitérée. Enfin, la progression correspond à la transformation irréversible des cellules initiées pré-cancéreuses vers l'apparition clinique de la tumeur. Cette phase est caractérisée par une grande instabilité génomique. Suite à ces trois phases, les cellules cancéreuses adoptent un caractère invasif et vont migrer vers d'autres tissus pour former des métastases à distance. Ce modèle ne dévoile pas toute la complexité de la formation d'une

tumeur maligne mais concilie les données issues de la cancérogenèse expérimentale et humaine (Figure 3).

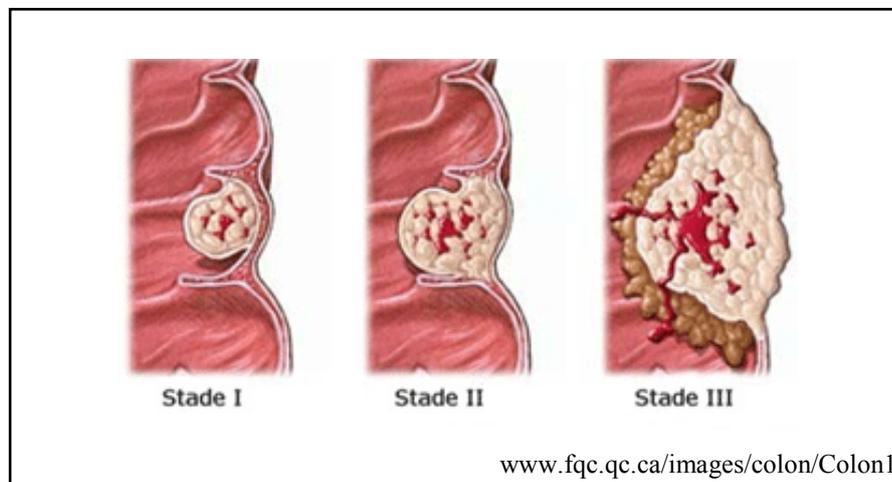


Figure 3: Les différents stades du cancer colorectal

Le degré d'extension des tumeurs colorectales est évalué par la classification de Dukes créée en 1932 et modifiée par Astler-Coller en 1954 ou par la classification internationale TNM (Tumor Node Metastasis) des cancers coliques, qui sert de base à des regroupements plus proches de la réalité clinique. La lettre « T » décrit la taille de la tumeur, « N » sa localisation dans les ganglions et « M » la formation de métastases (Tableau 1).

| Classification TNM | | | |
|--------------------|--|-----------|--|
| Tis | Le cancer ne touche que la première couche de la paroi interne du côlon ou du rectum. | N0 | Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints. |
| T1 | Le cancer a traversé les premières couches de la paroi du côlon ou du rectum. | N1 | Le cancer a touché entre un et trois ganglions lymphatiques. |
| T2 | Le cancer a atteint l'épaisse paroi musculaire du côlon ou du rectum. | N2 | Le cancer a touché quatre ganglions lymphatiques ou plus. |
| T3 | Le cancer a envahi toute la paroi du côlon ou du rectum. | M0 | Le cancer ne s'est pas propagé à un ou plusieurs organes éloignés. |
| T4 | Le cancer a franchi complètement la paroi du côlon ou du rectum et s'est propagé aux tissus ou organes environnants. | M1 | Le cancer s'est propagé à un ou plusieurs organes éloignés. |

Tableau 1 : Classification des cancers colorectaux « TNM »

3. Traitements du cancer colorectal

3.1. Dépistage et diagnostic

Bien que le cancer colorectal soit le deuxième cancer après celui des poumons en termes de mortalité, celle-ci tend à diminuer ces dernières années. Cette diminution est principalement due à une amélioration du diagnostic et aux progrès thérapeutiques. Mais dans la moitié des cas, le cancer colorectal est diagnostiqué à un stade avancé de son développement. Le dépistage organisé a été mis en place depuis 2002 et s'étend aujourd'hui à tout le territoire, afin de diminuer la mortalité de 15 à 20%. Il est proposé aux personnes de 50 à 74 ans et se fait par le test Hemocult® permettant la détection de sang dans les selles. Si le test est positif, une coloscopie est alors prescrite, afin de déterminer l'origine des saignements. Si le test est négatif, un renouvellement de celui-ci est proposé à la personne tous les deux ans. Ce test est d'autant plus important que la survie d'un patient atteint d'un cancer colorectal est de 94% d'ici à 5 ans pour un cancer diagnostiqué au stade I et seulement de 5% en stade IV. L'efficacité du dépistage par le test Hemocult® a été l'objet de plusieurs études scientifiques et il en résulte qu'il permet une réduction la mortalité par cancer colorectal de 30% (Hewitson et coll., 2007 ; Faivre et coll., 2004).

Une des causes principales d'une mortalité élevée du cancer colorectal réside dans un diagnostic tardif de la maladie. En effet, dans la moitié des cas il est diagnostiqué à un stade avancé lorsque des symptômes comme des troubles du transit, des saignements et des douleurs abdominales se font ressentir. Les diagnostics sont réalisés par coloscopie et l'envahissement métastatique des structures voisines, hépatiques ou ganglionnaires, est évalué par scanner. L'imagerie par résonance médicale (IRM) peut être utilisée pour faire un bilan métastatique et pour suivre les récurrences après une opération chirurgicale ou exérèse ou suite à une radiothérapie. La tomographie d'émission par positron couplée au scanner ou PET-Scan peut également fournir des informations sur les éventuelles récurrences.

3.2. Traitements

La chirurgie représente le principal traitement du cancer colorectal. Après une localisation des cancers du colon, une exérèse élargie à la tumeur est pratiquée ainsi qu'un curage ganglionnaire des chaînes paracoliques et pédiculaires. Les foyers métastatiques sont retirés si possible en même temps que les tumeurs primaires. La chirurgie par coelioscopie donne des résultats similaires à la chirurgie classique. Elle consiste à introduire un système optique et les instruments par plusieurs petites incisions. Le chirurgien guide ses gestes en regardant l'image qui apparaît sur un écran. Elle présente l'avantage de réduire la durée d'hospitalisation, de limiter les douleurs post-opératoires, de permettre une reprise plus rapide des activités et de rendre moins visibles les cicatrices.

La chirurgie est dans la plupart des cas suffisante pour les patients atteints d'un cancer de stade I, pour des stades plus avancés, une chimiothérapie adjuvante est appliquée afin de réduire les récurrences et d'augmenter les chances de survie. La chimiothérapie de référence actuelle associe le 5-Fluoro-uracile, l'acide folinique et l'oxaliplatine. L'association de ces trois molécules est appelée Folfex (Leichman, 2006 ; Sharif et coll., 2008) et permet une réduction de 20% de la récurrence chez les patients atteints de tumeurs de stade III. L'arrivée des thérapies ciblées a permis de nouvelles avancées dans la chimiothérapie surtout dans le traitement de tumeurs tardives avec présence de métastases. Ces thérapies font appel à des anticorps monoclonaux comme le bécacizumab (anti-VEGF) (Tol et coll., 2009), qui inhibe la formation de néo-vaisseaux destinés à fournir de l'énergie pour la croissance de la tumeur ou encore le cétuximab (anti-récepteur du facteur de croissance EGF) (Davies et coll., 2008). La destruction des métastases peut également s'effectuer par radiofréquence. Cette technique consiste à introduire une électrode dans la métastase et, grâce à des ondes de radiofréquence, à la porter à une température de plus de 60°C. Elle est ainsi détruite par la chaleur. Cette technique s'applique notamment aux métastases situées dans le foie ou le poumon.

La forte mortalité du cancer colorectal est un problème majeur de santé publique et est partiellement expliquée par un fort taux de récurrence de celui-ci. En effet, l'ablation chirurgicale pratiquée sur la plupart des patients, n'empêchera pas 30 à 50% d'entre eux de faire une récurrence parfois fatale. L'incidence des métastases hépatiques synchrones (détectées entre 1 et 6 mois après le diagnostic initial de cancer) est de 13,5% à 3 ans (Leporrier et coll., 2006). Malgré la mise en place des chirurgies adjuvantes, le pronostic dans le cas des apparitions de métastases synchrones ou métachrones (détectées durant les 5 ans après le diagnostic initial de cancer) reste actuellement mauvais puisque la survie à 5 ans est seulement de 5% (Manfredi et coll, 2006).

II. LA MORT CELLULAIRE

1. Généralités

La mort cellulaire désigne l'arrêt des métabolismes et des fonctions vitales de la cellule pour aboutir à sa destruction. Elle se produit soit de manière spontanée, soit en présence d'agents cytotoxiques. Il existe deux types majeurs de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose ou mort programmée. La nécrose est une mort dégénérative, causée par des enzymes du lysosome. Les cellules, qui meurent par nécrose, sont caractérisées par l'augmentation du volume de leur cytoplasme, le gonflement de différents organites et la distorsion de la chromatine (Figure 4). La membrane cellulaire se désintègre et tout le contenu intracellulaire est libéré. La nécrose est souvent accompagnée d'une réponse inflammatoire et peut entraîner des dommages au niveau des tissus (Proskuryakov et coll., 2003). L'apoptose peut être issue des mêmes origines que la nécrose mais cette fois-ci il s'agit d'une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire et est contrôlée par un ensemble de mécanismes cellulaires spécifiques (Elmore, 2007). De nombreuses études ont également mis en évidence de nouveaux types de mort cellulaire, dépendants ou non de l'apoptose. Il s'agit de la mort cellulaire par autophagie, par sénescence répllicative accélérée ou chimio-induite, ou encore par catastrophe mitotique.

L'autophagie est une voie majeure du catabolisme lysosomique permettant la dégradation de macromolécules et d'organites cellulaires. Les vésicules, appelées autophagosomes vont fusionner avec les lysosomes pour former des autolysosomes, dont le contenu sera dégradé par des hydrolases lysosomales (Figure 5). L'autophagie joue un rôle important dans le contrôle de la longévité mais aussi dans les processus pathologiques comme le cancer ou les maladies neurodégénératives (Todde et coll., 2009). En effet, elle intervient lorsque les cellules sont soumises à un stress nutritif et permet leur adaptation à la survie ou à la mort cellulaire. Son implication dans le cancer commence à être sérieusement étudiée même si son rôle précis reste encore à définir (Galluzzi et coll., 2008).

La mort par sénescence répllicative accélérée est similaire à la sénescence, qui désigne le processus physiologique entraînant des modifications progressives non pathologiques au cours du temps. Les cellules ne se divisent plus suite à l'endommagement de l'ADN ou au raccourcissement des télomères (Passos et coll., 2007). La cellule va activer la voie de signalisation ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/ AT Rad3 Related) (Lansdorp, 2000 ; Crescenzi et coll., 2008). Cette voie va stabiliser la protéine p53, induisant

une surexpression de la protéine p21 (cip1/waf1) bloquant la prolifération cellulaire. La sénescence répllicative accélérée est dépendante des protéines p53 et p21, puisque leur inactivation inhibe fortement ce mécanisme et va privilégier l'apoptose. Une large proportion de molécules anticancéreuses est capable d'induire ce phénomène et des données cliniques commencent à être de plus en plus décrites (Xue et coll., 2007).

Enfin, la catastrophe mitotique est un cas encore peu connu. Suite à un stress chimique ou physique, la cellule va entrer précocement et de manière inappropriée en mitose. Il s'agit donc d'une forme aberrante de mitose avec des changements morphologiques spécifiques mais biochimiquement variables (Vakifahmetoglu et coll., 2008). Les cellules cancéreuses présentant des anomalies de régulation de l'apoptose et/ou des points de contrôle du cycle cellulaire peuvent enclencher la catastrophe mitotique. Son origine peut aussi bien être des problèmes de réparation de l'ADN, qu'une dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire, une déficience de la protéine p53 ou une perte de la survivine (Vakifahmetoglu et coll., 2008). Les voies de la sénescence et de la catastrophe mitotique peuvent être interconnectées (Roninson et coll., 2001). Selon le type cellulaire et le contexte génétique, les cellules ayant enclenché la catastrophe mitotique peuvent mourir par apoptose dépendante des caspases ou nécroser indépendamment des caspases (Figure 6).

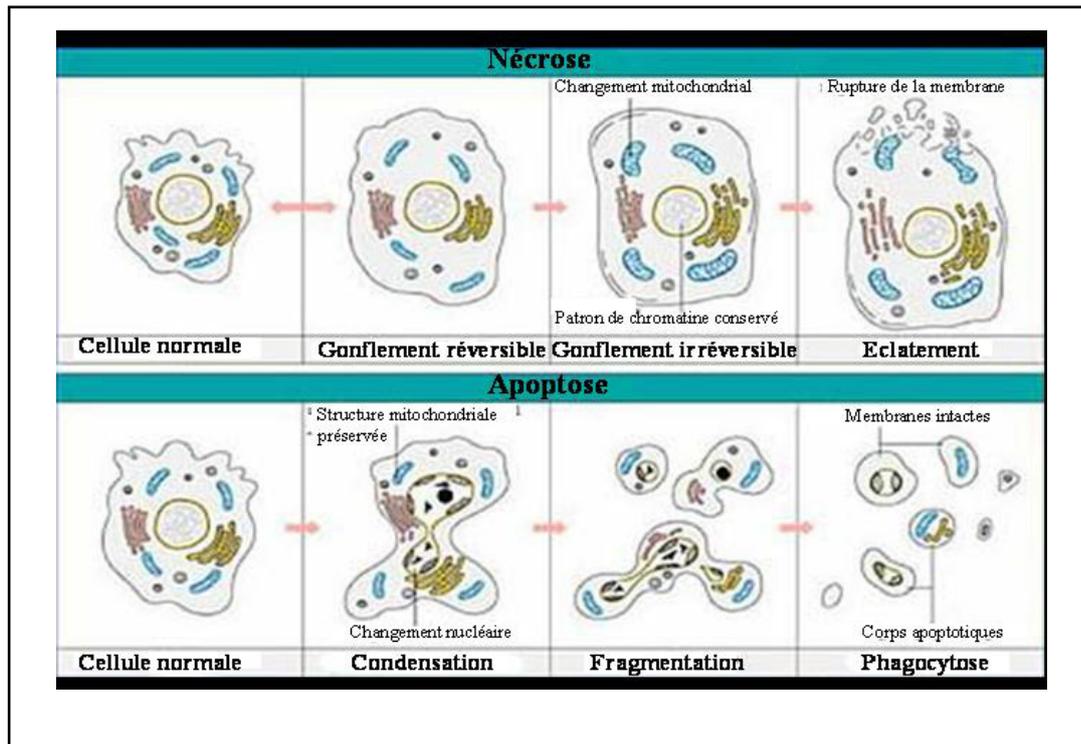


Figure 4: Caractéristiques morphologiques de la nécrose et de l'apoptose.

La nécrose se caractérise par le gonflement de la cellule jusqu'à son éclatement alors que l'apoptose se définit par une condensation de la cellule, une fragmentation du noyau et la formation de corps apoptotique. Adaptée d'une figure de la compagnie Roche.

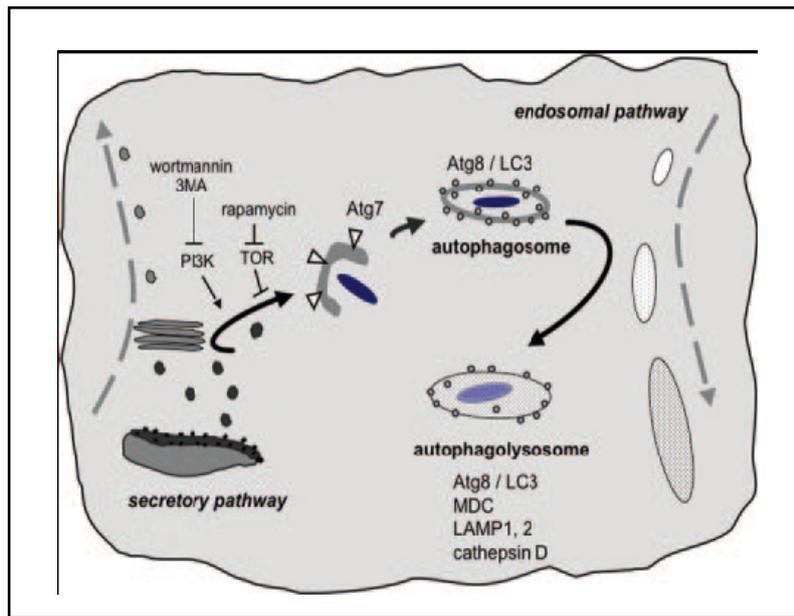


Figure 5: Le processus de l'autophagie. Des cellules soumises à un stress nutritif ou hypoxique peuvent induire l'autophagie. Des fragments de membranes s'isolent et recrutent une protéine associée aux microtubules Atg8/LC3. Après formation de l'autophagosome, contenant les produits à dégrader il y a fusion avec les lysosomes pour former un autophagolysosome, relargage de la protéine Atg8/LC3 et hydrolyse du contenu de l'autophagolysosome. D'après Swanson, 2006.

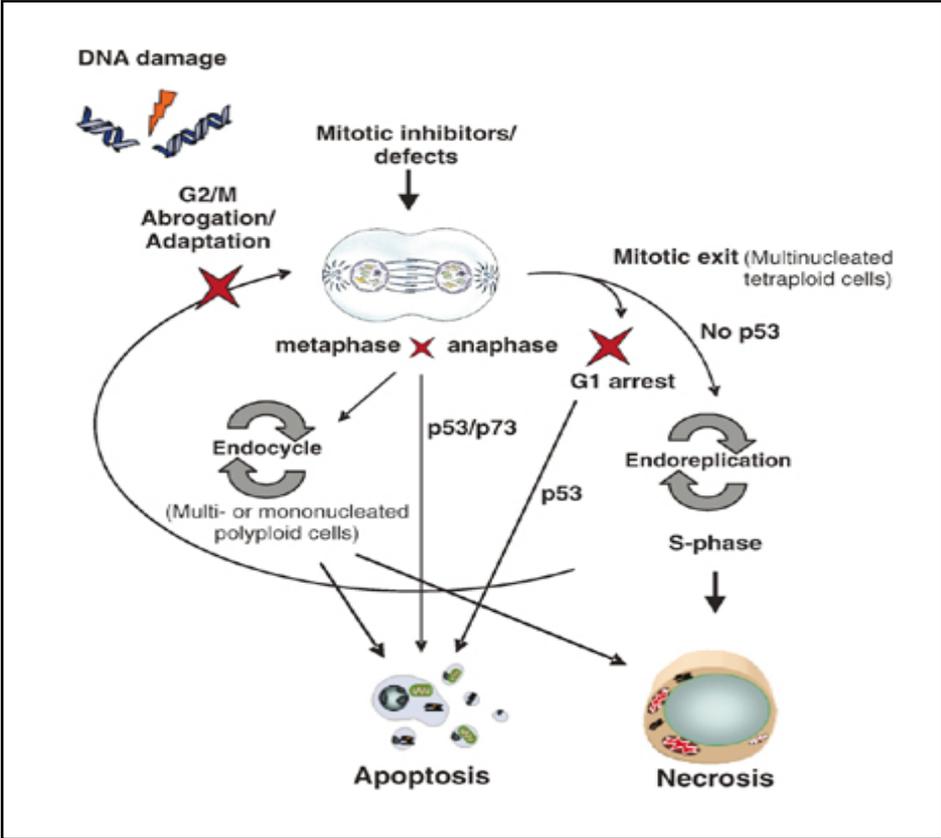


Figure 6: Mécanismes de la catastrophe mitotique et de la sénescence
D'après Vakifahmetoglu et coll., 2008

2. L'apoptose

2.1. Généralités

L'apoptose est une mort cellulaire, utilisée par les organismes pluricellulaires, qui a lieu naturellement et qui est considérée comme une partie du développement, du maintien et du renouvellement normal d'un tissu. Elle est définie comme une mort cellulaire programmée, impliquant le « suicide » des cellules en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. L'apoptose engage un grand nombre de voies de signalisation et de régulation cellulaire, impliquant un grand besoin d'énergie. Les composants de ces voies sont codés par le génome, exprimés et activés après induction de la mort cellulaire par un stimulus (Kaufmann et Hengartner, 2001).

L'apoptose est nécessaire et vitale à l'organisme aussi bien au cours de l'embryogenèse que lors de l'activation du système immunitaire. En effet, durant le développement de l'organisme, les cellules seront produites en grandes quantités et selon des critères particuliers requis, certaines d'entre elles vont mourir par apoptose. De même au niveau du système immunitaire, l'apoptose est responsable de la déletion des cellules T auto-réactives (permettant la tolérance du soi), ainsi que de la sélection des lymphocytes B responsables de la réponse immunitaire (Reed et coll., 2004). Son inhibition ou une apoptose défectueuse entraîne le développement de cancers, de pathologies virales alors qu'une apoptose excessive peut entraîner des désordres neurodégénératifs (Thatte et Dahanukar, 1997).

Cette mort cellulaire affecte des cellules isolées aboutissant à un processus de condensation et de fragmentation, sans dommages pour les cellules environnantes. Les cellules apoptotiques présentent des changements morphologiques spécifiques : une exposition des phosphatidyl-sérines à l'extérieur de la membrane plasmique, une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire, une condensation du cytoplasme, la dégradation de l'ADN et enfin la formation de corps apoptotiques, qui seront éliminés par phagocytose sans réaction inflammatoire (Vermeulen et coll., 2005) (Figure 4).

Le processus apoptotique est contrôlé par deux voies principales de signalisation cellulaire : la voie extrinsèque ou celle des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou mitochondriale. L'apoptose induit l'activation de deux grandes familles d'enzymes : les caspases et les protéines de la famille Bcl-2. Les caspases ont un rôle important dans les

processus de dégradation des organites tandis que les protéines de la famille Bcl-2 vont participer au maintien et à la régulation du signal (Mohamad et coll., 2005).

2.2 Les caspases

2.2.1 Description

Une grande famille de protéines enzymatiques, typique de l'apoptose est connue sous le nom des caspases (Cysteiny-Aspartate-Specific proteASES). Il existe au moins 14 caspases codées par le génome humain, dont sept sont responsables de l'apoptose et sont divisées en deux groupes :

- les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10), qui possèdent une partie N-terminale longue
- les caspases effectrices (3, 6 et 7), qui possèdent une partie N-terminale courte.

Les autres caspases interviennent essentiellement dans l'inflammation et l'activation des cytokines.

L'expression intrinsèque des caspases se fait sous forme de proenzymes, ayant une faible activité enzymatique. Leur activation nécessite un clivage protéolytique ou une interaction avec un activateur allostérique. Les caspases à l'état inactif ou pro-caspases, sont constituées d'une unité protéique d'environ 20 kDa et d'une sous unité d'environ 10 kDa. Le domaine N-terminal contient le site d'interaction protéine-protéine et se différencie en domaine DED « Death Effector Domain », par exemple pour les caspases-8 et -10 ou en domaine CARD « CAspase Recruitment Domain », par exemple pour les caspases-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12, -13 et -14 (Figure 7) (Lavrik et coll., 2005). Le domaine DED permet l'interaction avec d'autres molécules contenant également le site DED et le domaine CARD permet aux caspases de s'associer entre elles ou à des molécules adaptatrices. La large sous-unité de 20 kDa contient le site catalytique, qui sera activé, après un clivage, par une association avec la petite sous-unité (Figure 7). L'activation de la cascade de caspases intervient après une stimulation des voies extrinsèque et/ou intrinsèque. Une caspase initiatrice est alors recrutée, activée, puis va elle-même activer une caspase effectrice ou effectrice par clivage protéolytique. Les caspases effectrices actives vont perturber le noyau pour entraîner la fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose (Nuñez G et coll. 1998 ; Khosravi-Far et coll., 2004).

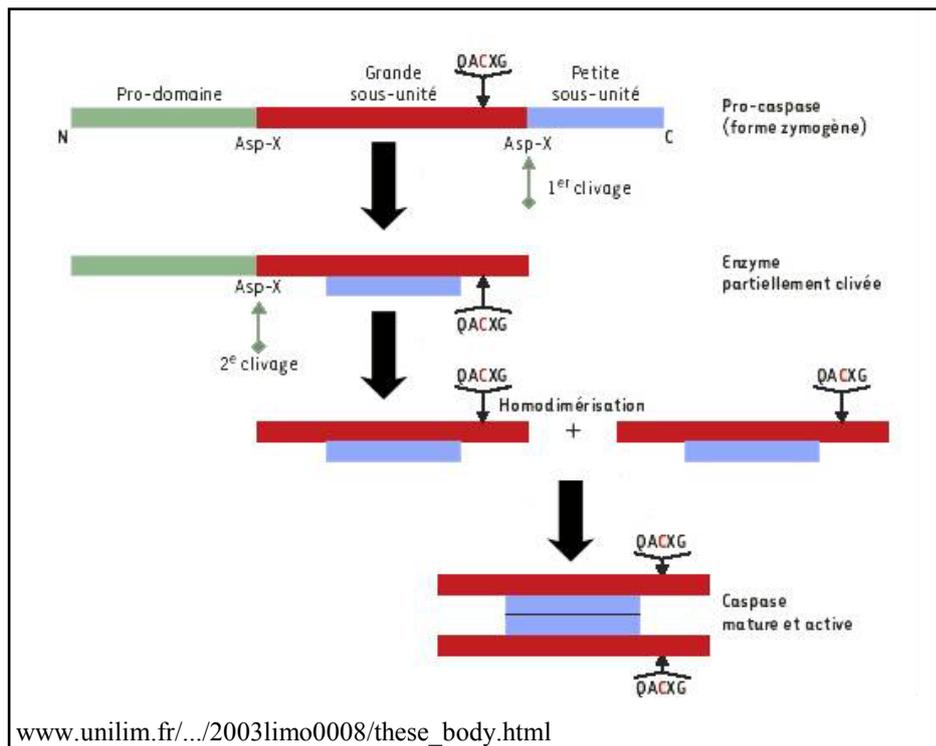


Figure 7: Schéma de l'activation des caspases

2.2.2 Régulation des caspases

L'activité des caspases peut être régulée par plusieurs voies de contrôle comme les phosphorylations, l'oxyde nitrique, des protéines inhibitrices à domaines CARD ou DED, les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis). Ainsi la régulation de la caspase-9 fait intervenir le processus de phosphorylation. Les protéines PKB-Akt (Protein Kinase B) et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 2) sont impliquées dans la phosphorylation de la caspase-9 entraînant l'inhibition du processus protéolytique de la pro-caspase-9 et donc l'inhibition de son activation (Johnson et Jarvis, 2004).

Le taux d'oxyde nitrique (NO) intracellulaire, le type cellulaire ainsi que l'état d'oxydoréduction peuvent également réguler les caspases. En effet la cystéine du site catalytique de la caspase-3 peut interagir avec le NO conduisant à une S-nitrosylation et inhibant ainsi l'activité de la caspase-3 (Kim et coll., 2002).

Les protéines inhibitrices à domaine DED ou CARD sont des protéines qui vont mimer les caspases par le site DED ou CARD mais sans activité catalytique. Elles inhibent l'apoptose en empêchant le recrutement et l'oligomérisation des caspases. Une des protéines inhibitrices souvent étudiée est la protéine cellular FLICE Inhibitory Protein (c-FLIP). Elle

possède un domaine DED, empêche ainsi le recrutement de la pro-caspase-8 et bloque l'induction de l'apoptose par la voie extrinsèque (Kataoka, 2005).

Enfin la famille des protéines IAP participe à la régulation des deux voies apoptotiques mais aussi à la régulation du cycle et de la signalisation cellulaire. Elles possèdent une séquence peptidique hautement conservée et les principales protéines identifiées chez l'homme sont : X-chromosome linked IAP (XIAP), cellular IAP 1 et 2 (cIAP1 et 2), Neuronal IAP (NIAP), la livine et la survivine. Les protéines XIAP, cIAP1 et 2 contiennent trois copies d'un motif de 70 acides aminés appelé Baculovirus IAP domain (BIR) et un doigt de zinc. Les protéines cIAP1 et 2 contiennent en plus un site CARD. Il a été montré que l'activité des IAP dépend du domaine BIR. Le domaine BIR1 n'a pas de potentiel inhibiteur, BIR2 fixe et inhibe l'activité des caspases-3 et -7 et BIR3 inhibe l'activité de la caspase-9 (Dubrez-Daloz et coll., 2008). La survivine ne contient qu'un seul domaine BIR strictement similaire au BIR3 de XIAP. Il est donc admis que la survivine fixe et inhibe la caspase-9. L'activité de la survivine est également étroitement liée avec la régulation du cycle cellulaire et elle bloque d'autres facteurs impliqués dans la fragmentation d'ADN (Zangemeister-Wittke et Simon, 2004).

2.3 La famille des protéines Bcl-2

Les protéines de la famille B-cell *lymphoma* 2 (Bcl-2) sont d'importants régulateurs du processus apoptotique dont la fonction principale est le contrôle de la perméabilité mitochondriale et de la libération d'agents apoptotiques par la mitochondrie. Cette famille est composée de plus d'une vingtaine de protéines, qui présentent de fortes homologues entre des régions précises, appelées domaines BH (Daniel et coll., 2003 ; Kirkin et coll., 2004).

La famille des protéines Bcl-2 est divisée en trois groupes : les protéines anti-apoptotiques, les protéines proapoptotiques à domaines multiples (« multidomains ») et les protéines proapoptotiques à domaine unique BH3 (« BH3-only ») (Figure 8). Ces protéines peuvent former des homo- ou hétérodimères essentiellement par des interactions entre domaines BH3 (Kirkin et coll., 2004). Le domaine BH4 des protéines anti-apoptotiques est impliqué dans leur fonction de survie (Reed et coll., 1996).

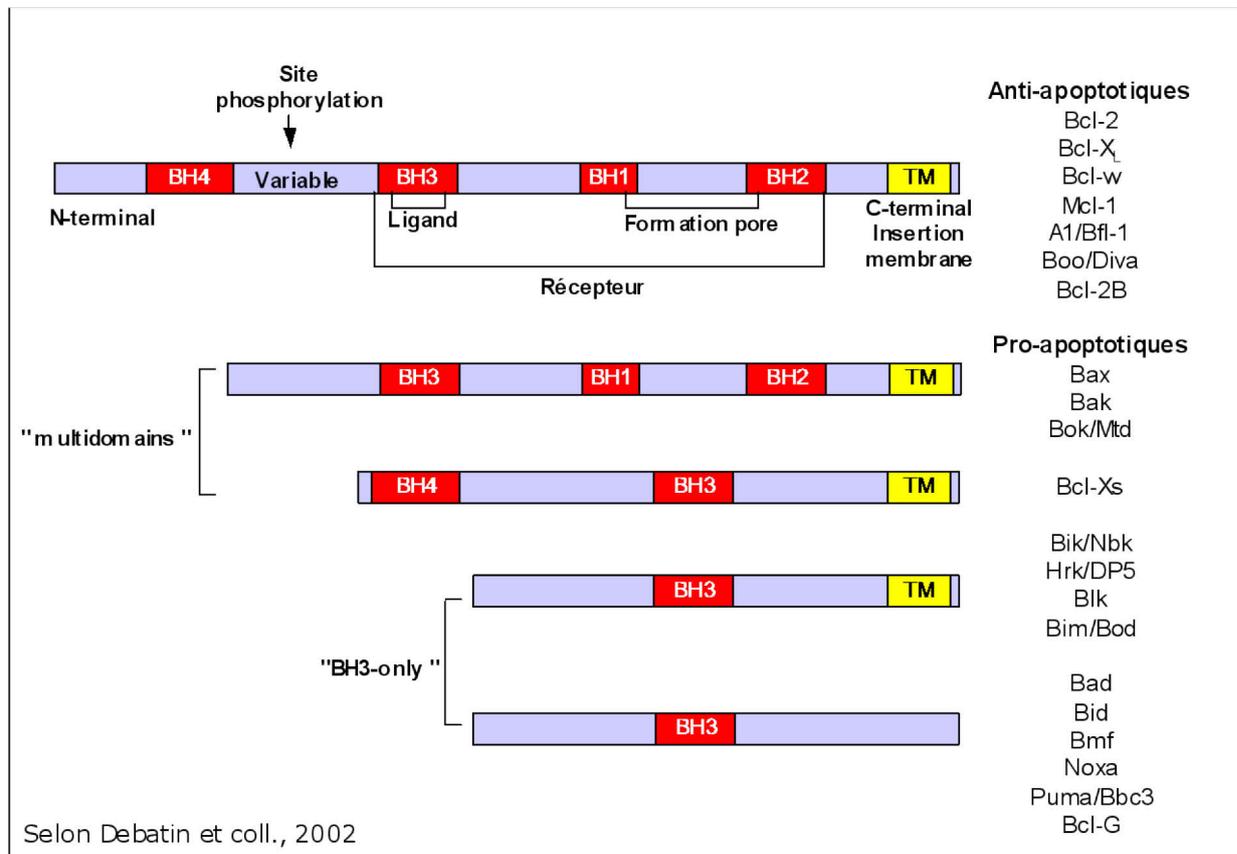


Figure 8: Les protéines de la famille Bcl-2. D'après Debatin et coll., 2002

2.3.1. La protéine proapoptotique Bid

La protéine BH3 interacting death domain agonist (Bid) a été identifiée pour la première fois en 1996 par l'équipe de Wang (Wang et coll., 1996). Cette protéine est exprimée dans la plupart des tissus et se trouve essentiellement dans le cytosol cellulaire. Elle peut interagir avec des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et inactiver leur fonction. Lors de l'activation des récepteurs de mort comme FasR ou les récepteurs de TRAIL (DR4/DR5), la caspase-8 est activée et peut cliver la protéine Bid. La protéine clivée, tBid va alors perturber la membrane mitochondriale et interagir directement avec des protéines proapoptotiques comme la protéine Bcl2-associated X protein (Bax) (Ruffolo et coll., 2000). Il a également été montré que tBid entraîne une redistribution des lipides et cardiolipines au sein de la membrane mitochondriale externe induisant une perturbation de la membrane, une translocation de Bax vers la membrane mitochondriale externe, conduisant à

la libération du cytochrome c ou de la protéine Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor Apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi (Smac/DIABLO) dans le cytosol (Sandra et coll., 2005 ; Liu et coll., 2004). Le cytochrome c va alors activer l'apoptosome et par conséquent l'apoptose.

2.3.2 La protéine proapoptotique Bax

La protéine Bax réside principalement dans le cytosol et reste sous sa forme inactive (21 kDa) en association avec d'autres facteurs. Lors de différents *stimuli* apoptotiques, des changements conformationnels de la protéine ont lieu induisant la formation d'un complexe de 6 à 8 homo-oligomères de Bax (96 à 260 kDa), qui va s'insérer dans la membrane mitochondriale externe pour former un pore ou canal indépendamment du canal Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) (Er et coll., 2006). Cette translocation est la première étape de l'activation de la protéine Bax. La protéine Bax peut coopérer avec le canal VDAC pour former des pores de plus grande taille et de conductivité plus importante (Banerjee et Ghosh, 2004) afin de libérer des molécules comme le cytochrome c dans le cytosol.

La régulation de l'activité de la protéine Bax peut être contrôlée par phosphorylation. Des études ont démontré que des voies de signalisation comme la voie Jun-N terminal Kinase (JNK), la voie p38 kinase ou la voie Akt-1 peuvent réguler l'activité de Bax dans divers systèmes cellulaires (Lei et coll., 2002 ; Harnois et coll., 2004). La protéine Bax peut être activée ou inactivée suivant la nature du *stimulus* et le site de phosphorylation (Ser-163 ou Ser-184). Elle est donc un facteur clé dans l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque et donc dans l'établissement de nouvelles thérapies cancéreuses.

2.3.3 Les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Mcl-1

La protéine Bcl-2 tout comme ses homologues anti-apoptotiques Mcl1, Bcl-X_L, Bcl-W, A1 contient quatre domaines « BH » et réside au niveau de la membrane externe de la mitochondrie permettant ainsi une stabilisation du fonctionnement et de la perméabilisation de la mitochondrie. Il a pu être démontré que lors du processus apoptotique, la protéine Bcl-2 change de conformation et se lie à la partie N-terminale de la protéine Bax empêchant ainsi son oligomérisation et donc la libération de facteurs proapoptotiques ainsi que la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Dlugosz et coll., 2006). Des kinases

comme les MAP kinases, p38 ou Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) semblent également être capable d'induire un changement de conformation de Bcl-2 ou Bax par phosphorylation démontrant une activation indépendante de l'une ou l'autre de ces protéines (Chang et coll., 2003).

La protéine anti-apoptotique Myeloid Cell Leucemia sequence 1 (Mcl-1) est un membre de la famille Bcl-2 avec une demi-vie très courte. Sa surexpression au niveau de souris transgéniques va promouvoir la réponse de survie cellulaire et va induire une immortalisation des cellules myéloïdes (Zhou et coll., 1998). La protéine Mcl-1 est rapidement dégradée en réponse à un signal de mort cellulaire, mais sera immédiatement réexprimée par un *stimulus* de survie cellulaire (Yang-Yen, 2006). Un niveau élevé de cette protéine est observé au niveau des cancers de la prostate et de différents types de leucémies (Royuela et coll., 2001 ; Kitada et coll., 1998). La protéine Mcl-1 joue un rôle déterminant dans la régulation de la survie cellulaire en réponse aux signaux de mort cellulaire (Yang-Yen, 2006).

2.4. La voie intrinsèque ou mitochondriale

La voie intrinsèque est activée uniquement lors de la perturbation de la mitochondrie, dont le rôle dans l'induction de l'apoptose est largement étudié (Hamacher et coll., 2008 ; Hail, 2005). Des *stimuli* tels que l'hypoxie, les radiations gamma ou UV, les molécules cytotoxiques etc, peuvent entraîner la perméabilisation membranaire mitochondriale externe (MOMP) conduisant à la fragmentation d'ADN par l'intermédiaire des caspases ou non (Ash et coll., 2003) (Figure 9).

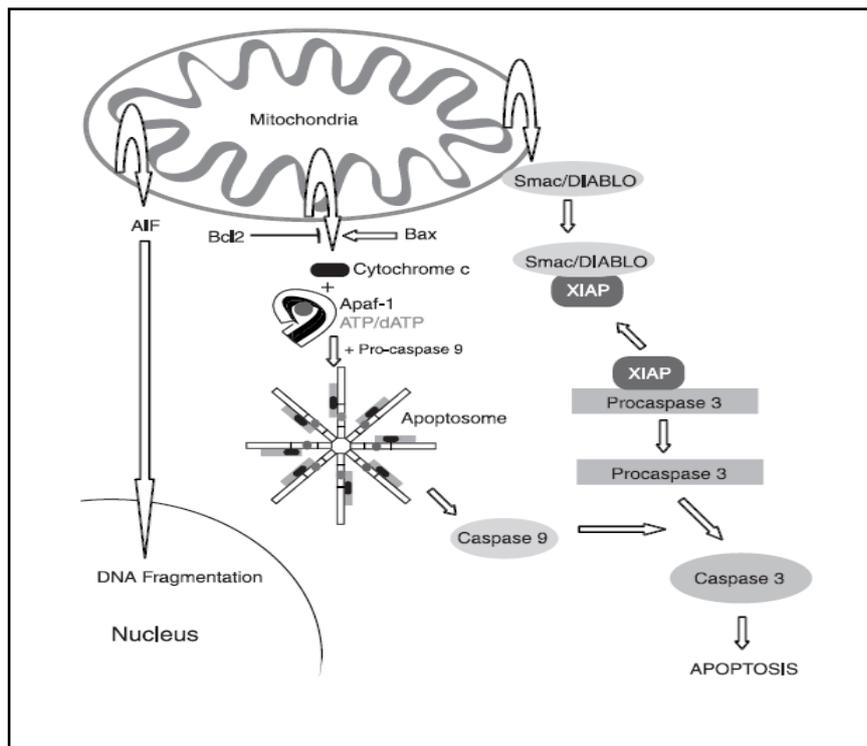


Figure 9: Schéma de la voie intrinsèque selon Ashe et coll., 2003

2.4.1 La perméabilisation mitochondriale

La membrane interne de la mitochondrie fonctionne avec un gradient électrochimique ($\Delta\psi_m$). Ce gradient est créé suite à l'efflux d'ions H^+ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ces protons sont expulsés grâce à l'énergie produite par le transfert d'électrons entre les quatre complexes enzymatiques de la membrane interne, lors du processus de phosphorylation oxydative : NADH déshydrogénase (I), succinate déshydrogénase (II), cytochrome c réductase (III) et cytochrome c oxydase (IV) (Dudkina et coll., 2008). La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) se produit lors de l'apoptose et est responsable de la libération de facteurs, qui résident initialement dans l'espace intermembranaire comme le cytochrome c, la protéine Smac/DIABLO, le facteur Apoptosis Inducing Factor (AIF) ou encore l'endonucléase G (EndoG), deux facteurs indépendants des caspases (Green et Kroemer, 2004 ; Armstrong, 2006) (Figure 10). Une dissipation du $\Delta\psi_m$ se produit avant, pendant et après la perméabilisation.

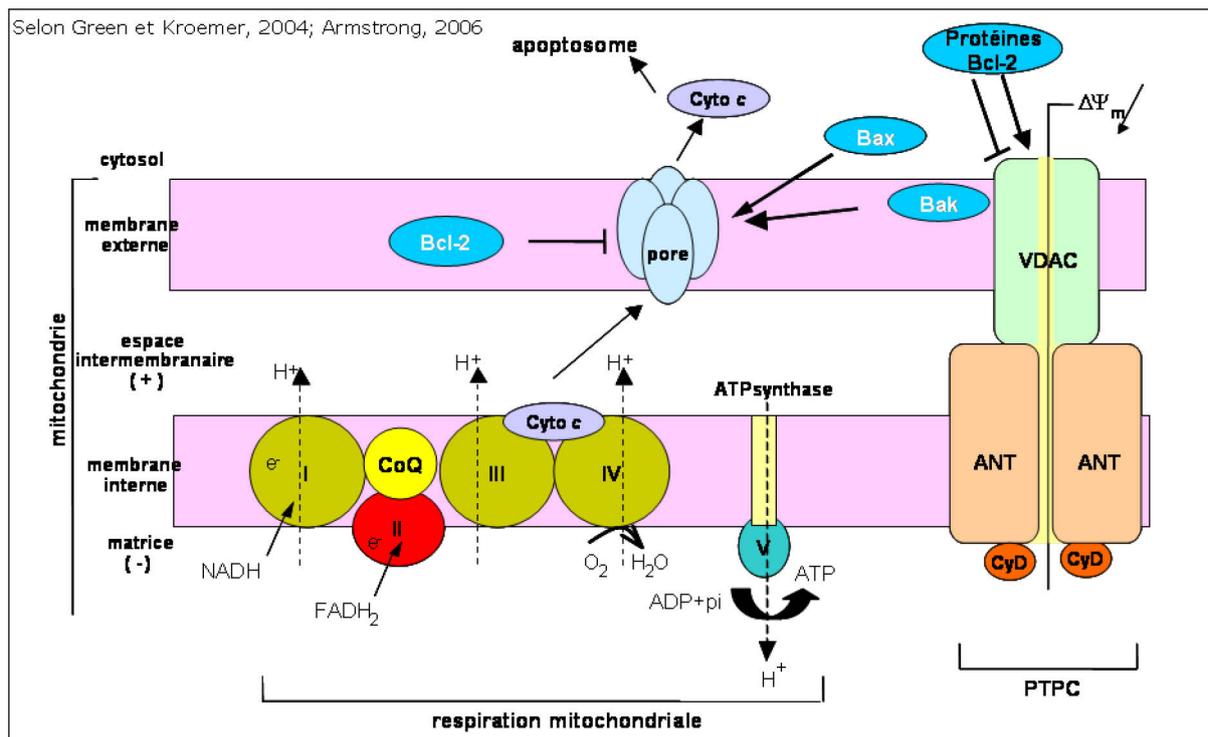


Figure 10: Chaîne respiratoire et perméabilisation mitochondriale.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ou MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) est régulée par les protéines de la famille Bcl-2, notamment Bax. En effet, la MOMP se caractérise par l'ouverture du canal VDAC et/ou par des pores formés par les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax. La perméabilisation de la membrane mitochondriale interne ou MIMP (Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization) est régulée par un ensemble de facteurs entraînant l'ouverture de pores formés par un complexe protéique contenant le translocateur nucléotidique ANT (Adenine Nucleotide Translocator) et la cyclophiline D (CyD) appelés Permeability Transition Pore (PTP). L'ouverture de ces pores interagit sur le transport d'électrons de la chaîne respiratoire et sur la production d'ATP (Kroemer et coll., 2007).

2.4.2 Formation de l'apoptosome

Après la perméabilisation mitochondriale, des facteurs apoptotiques sont donc libérés dans le cytosol (cytochrome c, Smac/DIABLO, AIF...). Le cytochrome c libéré va alors former un complexe protéique avec les protéines Apoptotic Protease-Activating Factor-1 (Apaf-1) et la pro-caspase-9. En présence d'ATP, le cytochrome c cytosolique se fixe sur Apaf-1 et initialise sa multimérisation. Après des changements de conformation, la partie N-terminale de la protéine Apaf-1, contenant un domaine CARD, est exposée et peut interagir avec d'autres protéines contenant le domaine CARD comme la pro-caspase-9. Un complexe heptamérique se forme alors et est appelé apoptosome. Il est constitué d'un corps principal formé de 7 molécules de la caspase-9 entouré par 7 complexes cytochrome c/Apaf-1 (Figure 11).

La formation de ce complexe va induire l'activation et des changements conformationnels de la caspase-9 pour activer la pro-caspase 3 et entraîner la fragmentation de l'ADN impliqué dans le processus apoptotique (Chinnaiyan, 1999 ; Riedl et Salvesen ; 2007).

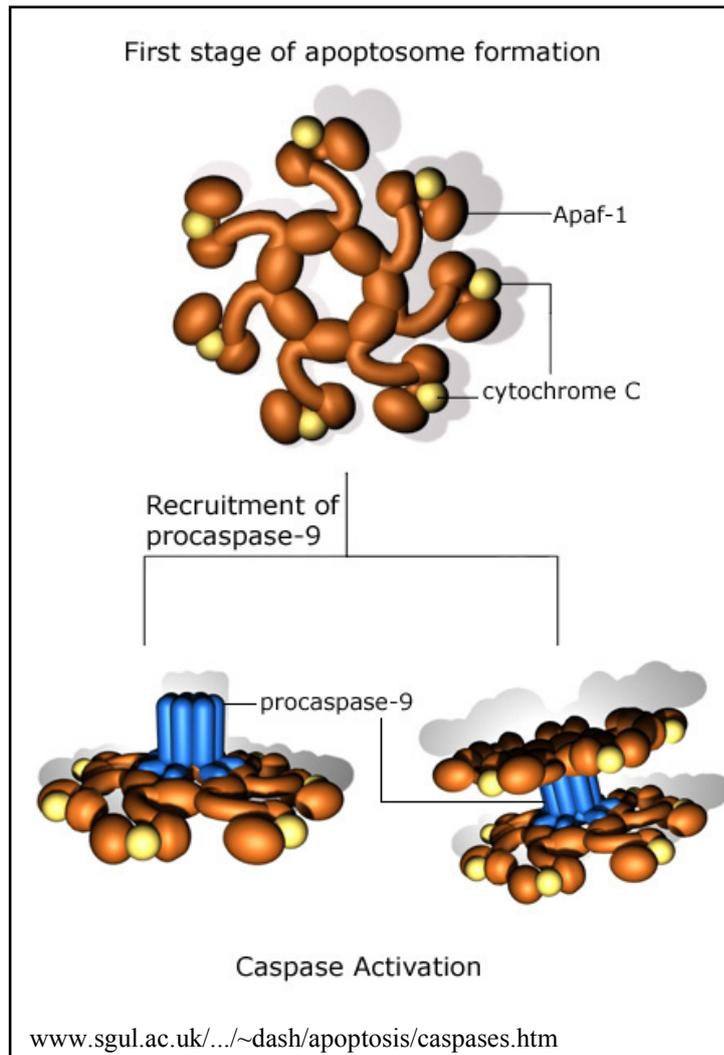


Figure 11: Assemblage de l'apoptosome

2.5. La voie extrinsèque de mort cellulaire

La voie extrinsèque implique l'activation des récepteurs extracellulaires de mort cellulaire appartenant à la superfamille $TNF-\alpha$, tels que Fas/CD95, les récepteurs de $TNF\alpha$ ou ceux de TRAIL (DR4/DR5) (Ozören et El-Deiry, 2003). La fixation du ligand spécifique à ces récepteurs entraîne l'oligomérisation d'un complexe ligand/récepteur et le recrutement de molécules adaptatrices au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Ainsi, des caspases initiatrices, les caspases-8 et -10 vont s'associer au complexe récepteur/ligand pour former le complexe Death-Inducing Signaling Complex (DISC). La caspase initiatrice mature, clivée par protéolyse, va alors activer des caspases effectrices comme la caspase-3, qui va induire la fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose (Debatin, 2004).

Les voies extrinsèque et intrinsèque peuvent être liées par la protéine apoptotique Bid. En effet, la caspase-8 ou -10 active peut cliver par protéolyse la protéine Bid. La forme clivée va alors migrer vers la mitochondrie et perturber la membrane en activant la protéine Bax, entraînant la libération du cytochrome c. Celui-ci va alors pouvoir activer la caspase-9 (Fulda et Debatin, 2006) (Figure 12).

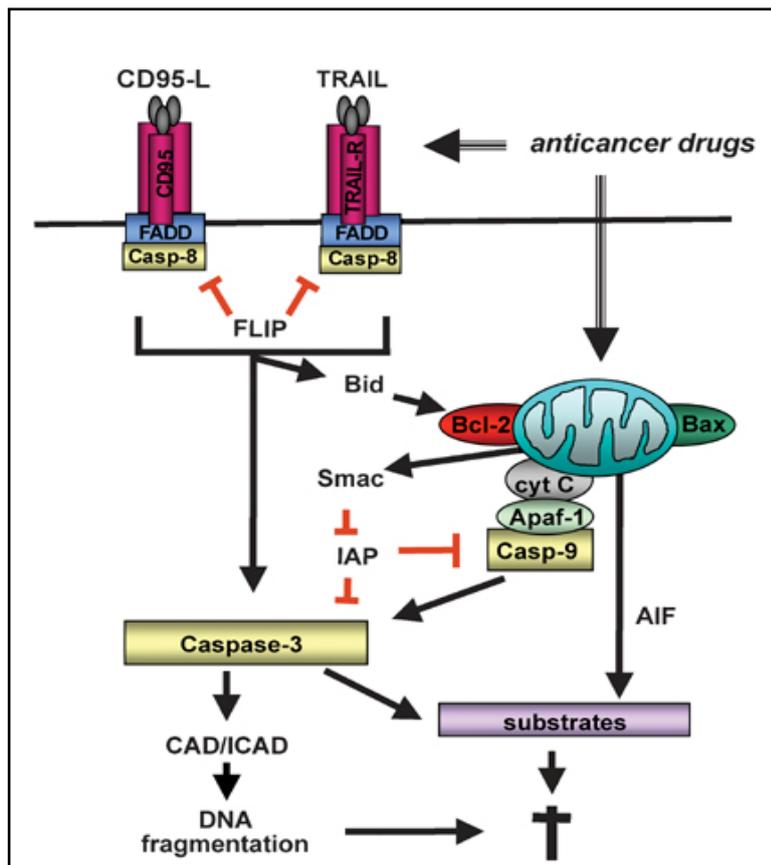


Figure 12: Lien entre les deux voies principales de l'apoptose, selon Fulda et Debatin, 2006

2.6. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif intracellulaire résulte souvent d'un déséquilibre de la balance entre la production des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) et l'inhibition des lésions oxydatives par la cellule grâce à ses capacités antioxydantes. Parmi les ROS on distingue : le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Comme les produits du stress oxydatif peuvent être toxiques pour la cellule, celle-ci a développé un système antioxydant composé d'enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), qui réduit O_2^- en H_2O_2 , la catalase et le glutathion qui réduisent H_2O_2 en H_2O . Des molécules antioxydantes non enzymatiques ont également été décrites comme les vitamines A, C et E, les caroténoïdes, les thiols ou encore la thiorédoxine (Valko et coll, 2006 ; Chong et coll., 2007).

Chez les mammifères, les sources de production des ROS sont principalement la NAD(P)H oxydase et le complexe enzymatique III de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Figure 10). D'autres sources peuvent être présentes dans le cytosol ou au niveau d'autres organites cellulaires et peuvent jouer un rôle dans la signalisation de mort ou de survie cellulaire. Une surproduction de ROS ou une dérégulation du système antioxydant de la cellule peut être à l'origine de nombreuses maladies comme l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, les cancers. Mais ce sont également des acteurs importants dans la régulation des métabolismes. Les cellules cancéreuses sont capables de produire de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène. L'excès de ROS produit par les cellules cancéreuses pourrait maintenir la prolifération anormale à des taux importants due aux mutations subies par l'ADN (Franco et coll., 2008).

Pourtant dans certains cas, les ROS peuvent contribuer à l'amplification des signaux de mort. En effet, ils peuvent faciliter la perturbation de la membrane mitochondriale et ainsi favoriser l'ouverture des canaux (Bayir et Kagan, 2008). La protéine anti-apoptotique Bcl-2 va alors renforcer la résistance des cellules aux ROS puisque son rôle est de maintenir les pores mitochondriaux fermés (Armstrong, 2006). De ce fait il peut arriver que l'utilisation des produits antioxydants pourrait être anti-apoptotique.

2.7. La fragmentation de l'ADN

L'apoptose est un processus caractérisé par la condensation du cytosol ainsi que de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques (Vermeulen et coll., 2005). L'ADN nucléaire va être clivé au niveau des sites riches en A/T et générant ainsi des fragments de l'ordre de 50 à 300 bp, qui peuvent encore être digérés au niveau des sites internucléosomiales (Allen et coll., 1997). La fragmentation de l'ADN est la dernière étape de l'apoptose et peut se produire suivant un processus dépendant des caspases ou indépendant de celles-ci.

- La fragmentation de l'ADN dépendante des caspases :

La fragmentation de l'ADN est initiée par la caspase-3, qui active une endonucléase nommée Caspase-Activated DNase (CAD). Les cellules normales présentent un complexe de la protéine CAD avec son inhibiteur ICAD (Inhibitor of CAD). Ce complexe s'appelle DNA Fragmentation Factor (DFF), qui au cours de l'apoptose va être clivé par les caspases -3 ou -7 libérant ainsi la protéine CARD. Cette protéine migre alors vers le noyau grâce à sa séquence de localisation nucléaire ou NLS et clive l'ADN chromosomique (Nagata, 2000). La caspase-3 va également activer le facteur Apoptotic chromatin Condensation Inducer in the nucleUS (ACINUS) qui agit sur la condensation de l'ADN. Enfin les caspases libèrent une hélicase cytosolique contenant un domaine CARD, HELICARD, qui va entraîner une accélération de la fragmentation de l'ADN (Kovacsovics et coll., 2002).

- La fragmentation de l'ADN indépendante des caspases :

Dans certains cas l'inhibition des caspases ne suffit pas à empêcher la fragmentation de l'ADN. La mitochondrie est capable de libérer des facteurs nucléiques agissant directement sur l'ADN. Le facteur AIF (67 kDa) est localisé au niveau de l'espace intermembranaire de la mitochondrie et après libération dans le cytosol suite à des *stimuli* apoptotiques, va migrer dans le noyau où il termine sa maturation. L'AIF semble fixer l'ADN, déplacer des protéines qui lui sont associées, recruter puis activer des endonucléases et enfin initier la fragmentation de l'ADN de large échelle (50 Kb) (Ye et coll., 2002).

L'Endo G (35 kDa) est également localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, et peut aussi être libérée dans le cytosol, migrer vers le noyau et induire la fragmentation de l'ADN. L'Endo G pourrait coopérer avec des exonucléases et la DNase I

afin de générer des fragments d'ADN internucléosomiaux (Widlak et coll., 2005). Une éventuelle interaction entre l'Endo G et le facteur AIF ainsi que leurs cibles exactes dans les cellules de mammifères n'ont pas encore été déterminées.

2.8. La régulation de l'apoptose

L'apoptose peut être régulée par plusieurs voies de signalisation cellulaire. Tout d'abord par la régulation des caspases décrites précédemment, qui est contrôlée par les phosphorylations, l'acide nitrique, des protéines inhibitrices à domaines CARD ou DED ou encore les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis) (Johnson et Jarvis, 2004). Mais il a été démontré que d'autres voies peuvent réguler l'apoptose, qu'elle soit dépendante des caspases ou non comme les voies Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), la protéine p53 ou encore le facteur Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) (Kuribayashi et El-Deiry, 2008 ; Thayaparasingham et coll., 2009).

2.8.1 Les voies MAP kinases (Figure 13)

Les voies MAP kinases ou MAPKs régulent et contrôlent des processus cellulaires fondamentaux comme la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration ou encore l'apoptose. Six groupes distincts sont actuellement bien décrits chez les cellules de mammifères : la voie Extracellular Related-signal Kinase (ERK) avec (ERK)1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, la voie Jun N-terminal Kinase (JNK) avec (JNK)1/2/3 et la voie p38 avec ses isoformes $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ (Dhillon et coll., 2007).

La voie de signalisation ERK est activée le plus souvent en réponse aux facteurs de croissances ou aux signaux mitogéniques et joue un rôle clé dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. L'activation de ERK va également induire l'amplification et la dérégulation de ses facteurs de transcription cibles comme *c-myc* ou AP-1 (Pintus et coll., 2002 ; Hipskind et Bilbe, 1998).

Les voies JNK et p38 sont décrites comme des voies activées en réponse au stress (stress-activated kinases), qui induisent l'inflammation et dans certains cas, la mort cellulaire programmée. La voie JNK est activée par des cytokines, des radiations UV ou agents de dommages à l'ADN tandis que la voie p38 est activée par un stress environnemental et des cytokines inflammatoires. En réponse à un *stimulus* de stress ces deux voies sont capables

d'activer et de réguler la protéine p53, nommée la gardienne du génome, d'initier son activité transcriptionnelle induisant une activation de gènes cibles dont des gènes apoptotiques. L'initiation de la voie p38 peut également induire la translocation de la protéine proapoptotique Bax du cytoplasme vers la mitochondrie et donc activer la voie apoptotique intrinsèque, tandis que JNK va phosphoryler la protéine anti-apoptotique Bcl-2, entraînant son inhibition et l'activation de l'apoptose (Fan et Chambers, 2001 ; So et coll., 2008).

Dans les cellules cancéreuses, les MAPKs sont dérégulées et peuvent influencer la réponse anti-apoptotique de la cellule face aux agents anti-cancéreux. Le rôle que jouent les MAPKs dans ces cellules est largement dépendant du type cellulaire, de la nature du *stimulus* et de la durée d'exposition de la cellule à ce stress pour induire l'apoptose ou la survie cellulaire. De ce fait même s'il est souvent décrit que ERK entraîne une réponse de survie et JNK ou p38 une réponse de mort, le rôle de chaque voie dans la réponse à des agents anti-cancéreux est complexe et chaque MAPK, ERK, JNK ou p38 ont des rôles soit destructeur soit protecteur dans différents systèmes cellulaires (Fan et Chambers, 2001).

2.8.2 La protéine p53 (Figure 13)

La protéine p53, appelée la gardienne du génome, est une protéine centrale dans la réponse de la cellule à de variables signaux de stress et dans la préservation de l'intégrité génomique. Une activation de p53 entraîne un arrêt du cycle cellulaire, l'induction de mort cellulaire comme la sénescence ou encore l'apoptose. Elle agit comme un facteur de transcription et active la transcription de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose. Les gènes cibles sont notamment ceux de protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2, Fas ou encore les gènes des récepteurs TRAIL, DR4 et DR5 (Amundson et coll., 1998). Il a également été démontré que la protéine p53 peut moduler la voie mitochondriale. En effet, elle semble être capable de se transloquer du noyau vers le cytoplasme et de former des complexes protéiques avec des membres de la famille des protéines Bcl-2 (Wolff et coll., 2008).

Beaucoup de cancers, notamment le cancer colorectal, montrent des mutations de p53, qui vont altérer ses fonctions et entraîner une prolifération anarchique des cellules. En dépit de ces mutations et selon la nature du signal de stress cellulaire, il a été démontré que p53 mutée peut garder sa capacité à se lier à l'ADN et à induire des mécanismes de

réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire ou encore d'activation de l'apoptose (Rochette et coll, 2005 ; Sugikawa et coll., 1999)

2.8.3 Le facteur NF- κ B (Figure 13)

L'activation de voies de prolifération comme celle du facteur NF- κ B peut interférer avec l'induction de l'apoptose et une activité trop importante peut être impliquée dans la cancérogenèse (Maeda et Omata ; 2008). Le facteur de transcription NF- κ B est un médiateur central dans la survie cellulaire et dans l'initiation de la réaction inflammatoire. Il peut induire l'expression de molécules anti-apoptotiques comme les IAPs ou encore des protéines de la famille Bcl-2, comme Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl-1. Lors du processus de cancérogenèse, l'activation de NF- κ B semble être responsable de l'induction des voies anti-apoptotiques, de survie cellulaire, d'angiogenèse et métastatiques (Sethi et coll., 2008).

La famille NF- κ B est composée de 5 membres ; p50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel. Tous ces membres contiennent un domaine homologue Rel (RHD), sur lequel se trouve le signal de localisation nucléaire (NLS). Ce même domaine est impliqué dans la fixation de NF- κ B à l'ADN et dans sa fixation à sa protéine inhibitrice I κ B dans les cellules normales. La famille I κ B est composée de 7 membres ; I κ B- α / β / γ / ε / ζ , I κ BNS et Bcl-3. Trois d'entre eux, I κ B- ζ , I κ BNS et Bcl-3 sont localisés dans le noyau et régulent la transcription en inhibant NF- κ B dans le noyau. Les autres sont cytosoliques et forment un complexe avec NF- κ B par interaction avec le domaine RHD masquant ainsi la séquence NLS, empêchant la translocation de NF- κ B dans le noyau (Inoue et coll., 2007). Un signal de stress peut entraîner la dissociation du complexe NF- κ B avec I κ B et induire l'activation et la translocation de NF- κ B dans le noyau et donc l'activation de voies de survie cellulaire mais également celle d'une réponse inflammatoire.

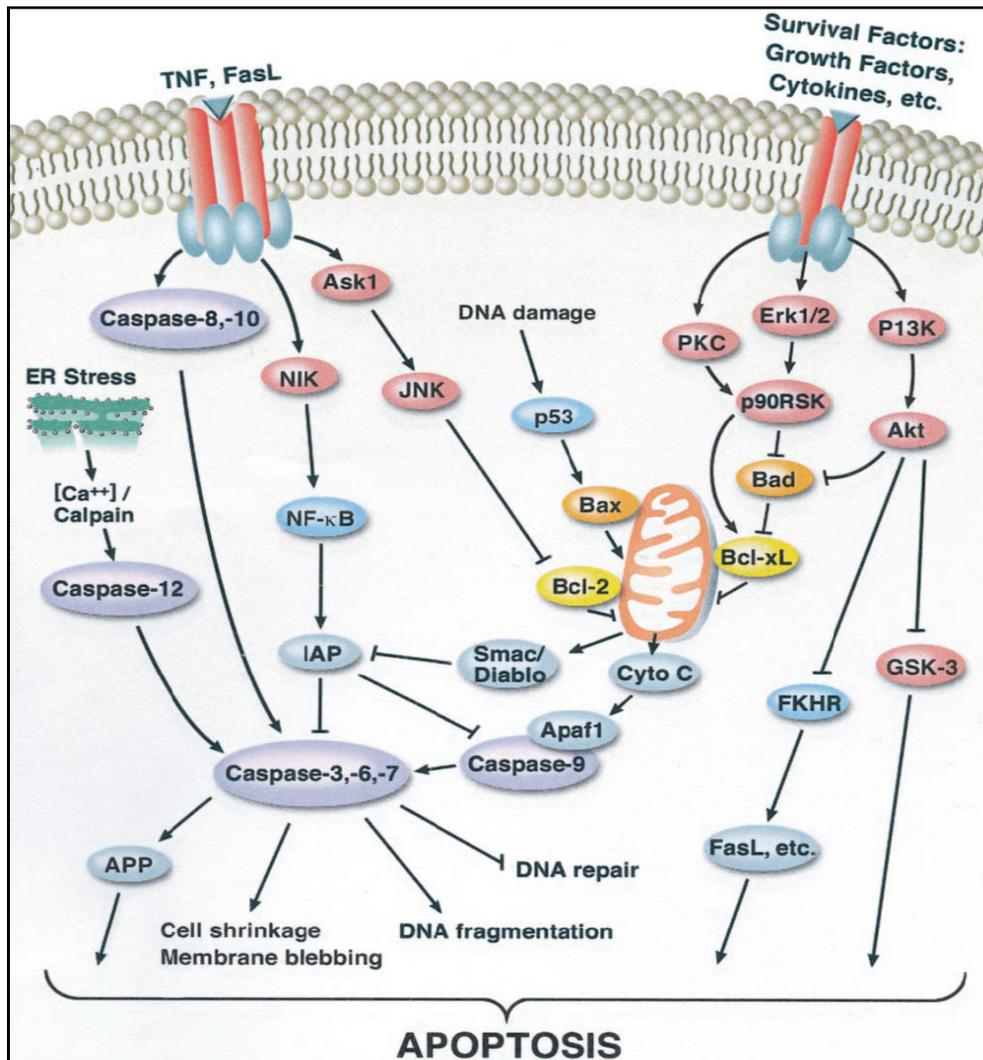


Figure 13: Les voies majeures de la régulation de l'apoptose : Voie NF-κB, voie TNF ou Fas, voies des MAPKs. Adapté de Yang et coll., 2003

III. LA CHIMIOPREVENTION

1. Définition de la chimioprévention

Malgré des progrès avancés dans le traitement de nombreux cancers et dans la compréhension des différentes étapes de la cancérogenèse, la mortalité reste encore trop élevée. En effet, la récurrence de certains cancers est encore trop fréquente et une nécessité de se tourner vers d'autres types de prise en charge de la maladie le plus précocement possible s'avère indispensable. Ainsi, des études ont pu démontrer que la consommation quotidienne de fruits et légumes diminue le risque de cancers de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, du colon ou encore du rectum. L'adoption d'un régime alimentaire recommandé et une activité physique adaptée peuvent dès lors réduire l'incidence du cancer de 30 à 40% (Manson, 2003). L'étude des variations de l'incidence du cancer entre différents pays et différentes générations de populations démontre que le cancer est largement déterminé par des facteurs environnementaux avec comme variable majeure le régime alimentaire.

La notion de chimioprévention a été utilisée pour la première fois par M.Sporn en 1976 dans une étude sur les effets préventifs de la forme naturelle de la vitamine A sur la cancérogenèse épithéliale (Sporn, 1976). Aujourd'hui, la chimioprévention est une technique de prophylaxie, qui utilise des agents naturels, synthétiques, ou biochimiques pour prévenir, supprimer ou inverser la cancérogenèse dans ses étapes les plus précoces. Un grand nombre de molécules possédant des propriétés chimiopréventives a été isolé ces dernières années et fait l'objet de beaucoup d'études (Figure 14)

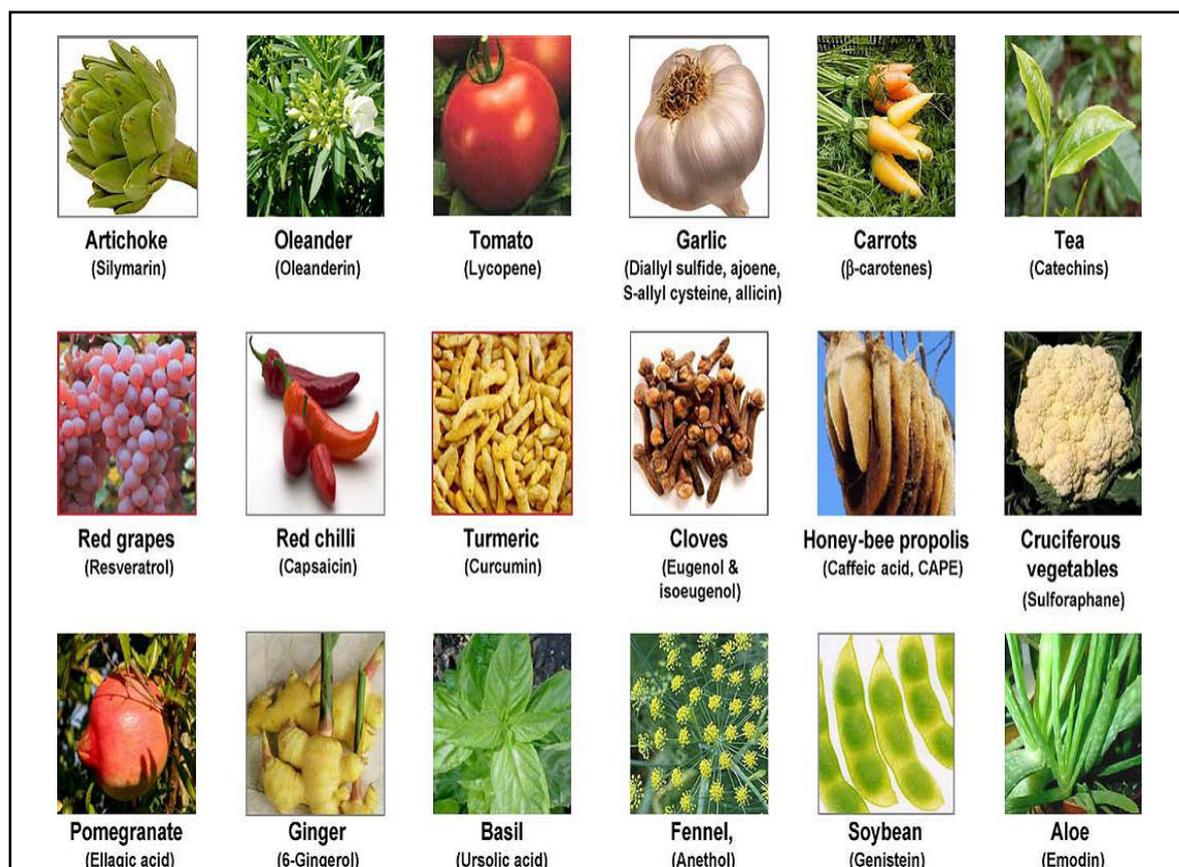


Figure 14: Différents agents alimentaires chimiopréventifs. D'après Aggarwal et Shishodia, 2006

Il existe trois stratégies pour la chimioprévention :

- La chimioprévention primaire qui consiste à aider les personnes en bonne santé à prévenir le développement de certain cancer. Ces personnes ont un haut risque génétique et/ou sont disposées au développement d'un cancer.
- La chimioprévention secondaire qui consiste à prévoir un traitement des lésions malignes (adénomes coliques) dans le but d'empêcher la progression du cancer.
- La chimioprévention tertiaire qui est mise en place pour aider les patients ayant été traités pour un cancer et d'empêcher une récurrence ou un développement d'un second cancer primaire (Bonovas et coll., 2008)

L'Institut National du Cancer (INC) a classé en 5 groupes les agents chimiopréventifs les plus importants, synthétisés chimiquement et qui ont montré des résultats significatifs lors des études en phase clinique ; les modulateurs sélectifs des récepteurs de l'œstrogène (SERMs), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs), les composés du

calcium, les glucocorticoïdes, les rétinoïdes (National Cancer of Health Statistics, 2005). De même des études ont pu recenser 40 molécules issues de plantes avec un potentiel chimiopréventif (Aggarwal et coll., 2006; Surh, 2003). La chimioprévention nutritionnelle est considérée comme une stratégie importante afin d'empêcher la formation de lésions préneoplasiques, de réduire la mortalité des cancers et de contrer la résistance de certains cancers à la chimiothérapie conventionnelle.

2. Identification et propriétés anti-cancérogènes des agents chimiopréventifs

Une molécule est dite chimiopréventive si elle est capable d'interférer avec les étapes précoces de la cancérogenèse, par exemple en prévenant l'apparition et le développement de foyers préneoplasiques chez des sujets à risque ou encore en limitant l'apparition de nouvelles néoplasies chez des patients déjà traités pour un cancer (Russo, 2007).

Le développement d'un cancer ou cancérogenèse, survient suite à une accumulation de mutations somatiques d'une cellule entraînant des changements phénotypiques graduels jusqu'à une néoplasie (Surh, 2003). Ce processus se fait en plusieurs étapes qui sont : l'initiation (quelques jours), la promotion (des années) et la progression (1 à 5 ans). Lors de l'initiation, la cellule est soumise à un agent dit carcinogène qui cible l'ADN et entraîne des dommages génotoxiques. La cellule va proliférer anormalement suite à des changements épigénétiques pour former des foyers préneoplasiques c'est l'étape de promotion. Enfin, durant la progression les lésions créées vont être plus prolifératives et conduire à des tumeurs invasives et métastatiques (Figure 15).

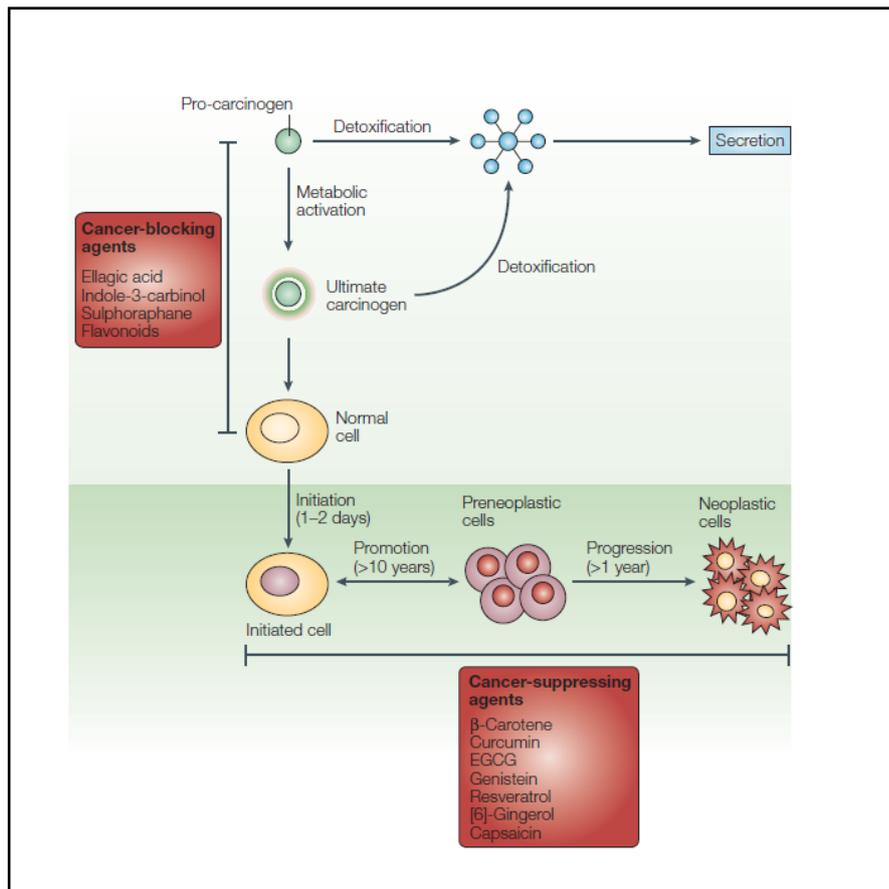


Figure 15: Action des composés chimiopréventifs sur la cancérogénèse. D'après Surh, 2003

Les données épidémiologiques ont permis de mettre en évidence l'impact de l'alimentation sur le développement de cancers et ont donc conduit la communauté scientifique à déterminer les fruits et légumes impliqués dans la prévention de la maladie. Les molécules chimiopréventives ont ainsi été identifiées, ce sont des composés non nutritifs, des micronutriments comme les caroténoïdes, des polyphénols, des alcaloïdes, des composés azotés ou encore des organosulfures (Figure 14) (Suhr, 2003). L'étude de ces molécules a permis d'établir un classement avec d'un côté les agents bloquants, capables d'empêcher l'étape d'initiation de la cancérogénèse et de l'autre côté les agents suppresseurs, capables de supprimer les capacités prolifératives des lésions préneoplasiques lors des étapes de promotion et de progression. Les agents bloquants peuvent empêcher les carcinogènes d'interagir avec leurs cibles par divers mécanismes : augmentation de leur détoxification de

leur métabolisme, grâce à leurs propriétés anti-oxydantes, ou encore une augmentation de la réparation de l'ADN. Les agents supprimeurs vont eux interférer avec la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la transduction de signaux et de la transcription (Figure 15).

Aujourd'hui un grand nombre de ces molécules d'intérêt sont bien décrites pour leurs effets *in vitro* sur plusieurs types de cancer, comme par exemple la quercétine, ou le curcumin, des flavonoïdes (López-Lázaro, 2008 ; Murakami et coll.,2008) ou encore le resvératrol, un polyphénol présentant des propriétés anti-cancéreuses et anti-inflammatoires (Udenigwe et coll., 2008) et une grande partie de ces molécules entrent ou sont en essais cliniques. Néanmoins, la biodisponibilité de la plupart de ces molécules est très faible et des efforts sont réalisés pour augmenter cette biodisponibilité en synthétisant des dérivés (Russo, 2007).

IV. LES CONSTITUANTS DU HOUBLON : COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES

1. La plante du houblon

Le houblon (genre *Humulus*) est une plante grimpante qui tout comme le chanvre (genre *Cannabis*) appartient à la famille des Cannabinacées. Les deux genres de cette famille ne se différencient que par le port des feuilles et les inflorescences. Le genre *Humulus* comporte trois espèces : *H. lupulus*, *H. japonicus* et *H. yunnanensis*. Seule, *Humulus lupulus* est utilisée en brasserie et en pharmacologie. Le nom *Humulus lupulus* fût attribué par Charles de Linne en 1737. Le houblon produit des pieds différents porteurs de fleurs mâles ou femelles. Les fleurs femelles secrètent un suc résineux de couleur jaune, répandant une odeur agréable et pénétrante, nommé la lupuline. Ce sont des glandes, dont le nombre est variable selon la plante, qui vont sécréter la lupuline. Les glandes de lupuline sont spécifiques aux fleurs femelles et la lupuline renferme des propriétés pharmacologiques connues de la plante du houblon (Zanoli et Zavatti, 2008), qui doivent satisfaire aux exigences de la Pharmacopée Européenne en vigueur (Figure 16).

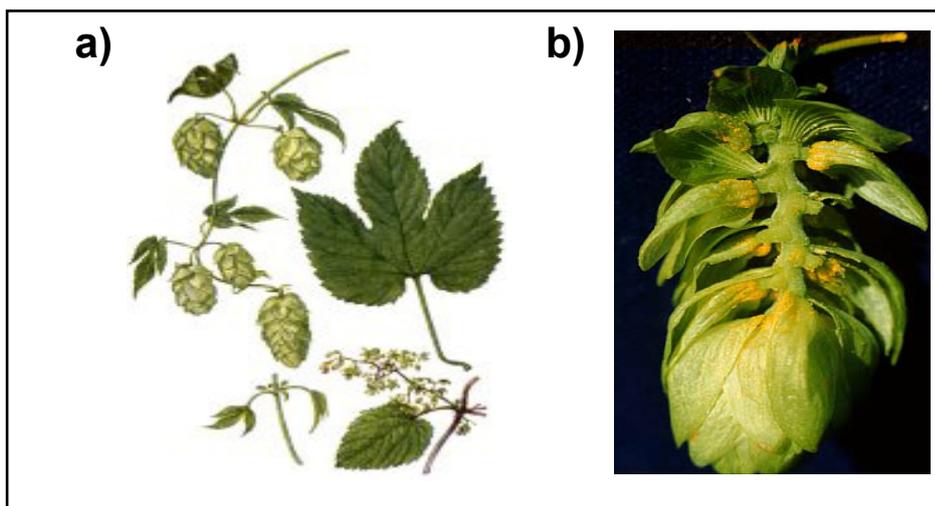


Figure 16: La plante femelle *Humulus Lupulus*

a) l'inflorescence de la plante avec les cônes femelles ; b) section de cône mature secrétant la lupuline jaune à la base des bractées

Le houblon est essentiellement reconnu pour ses propriétés calmantes et apaisantes. Bien que considérée comme une plante mineure dans l'arsenal phytothérapeutique des plantes calmantes, elle est utilisée contre des états d'hyper-émotivité, une digestion difficile, des troubles des règles ou de la ménopause, la nervosité, l'anxiété ou encore des troubles du sommeil. Les formes actuelles d'administration du houblon sont la poudre sèche en gélules, contenant soit le cône dans sa totalité soit l'extrait sec. L'identification de nouveaux composés de cette plante suscite de plus en plus d'intérêt notamment depuis la découverte des flavonoïdes prénylés bioactifs (Stevens et Page, 2004).

2. La composition chimique des cônes de houblon

Les cônes femelles secs de houblon sont essentiellement composés d'eau (5 à 10% de mat. sèche), d'une partie végétale contenant notamment des polyphénols (2 à 5% mat. Sèche) de lupuline composée de résines (12 à 25% mat. sèche) et d'huiles essentielles (0,2 à 0,4% mat. sèche). Les résines totales sont responsables du pouvoir amérisant spécifique du houblon. Elles sont divisées en deux sous groupes :

- les résines dures, qui sont insolubles dans les hydrocarbures à faible point d'ébullition et contiennent les flavonoïdes comme les flavonoïdes prénylés, les chalcones type xanthohumol.
- les résines molles, qui elles sont solubles dans les hydrocarbures à faible point d'ébullition et contiennent les acides amers du houblon, acides- α et acides- β et des résines non caractéristiques.

Les huiles essentielles sont composées en majorité d'humulène, de myrcène et de farnesène (Obelevicius et Venskutonis, 2004).

2.1. Composition chimique des résines dures de la lupuline

2.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur jaune de la lupuline. Le principal représentant de cette famille est le xanthohumol dont l'intérêt pharmacologique est de plus en plus important. Les flavonoïdes sont regroupés en différents sous-types :

- Les flavonols

- Les chalcones, dont le représentant le plus étudié est le xanthohumol, qui représente 80 à 90% des flavonoïdes du houblon. Il a été isolé pour la première fois en 1913. Le xanthohumol est une chalcone prénylée qui peut se dégrader lors du processus de la fabrication de la bière pour donner l'isoxanthohumol (Figure 17). Des études ont pu caractériser d'autres chalcones dont le précurseur du xanthohumol, le desméthylxanthohumol (Stevens et coll., 1999) (Figure 17).

- Les flavonones prénylées : deux molécules la 6-prénylnaringénine et la 8-prénylnaringénine (Figure 17) sont de plus en plus étudiées notamment pour leurs effets oestrogéniques (Overk et coll., 2005 ; Milligan et coll., 2000)

- Les flavonones géranylées : principalement la 6-géranylningénine et la 8-géranylningénine.

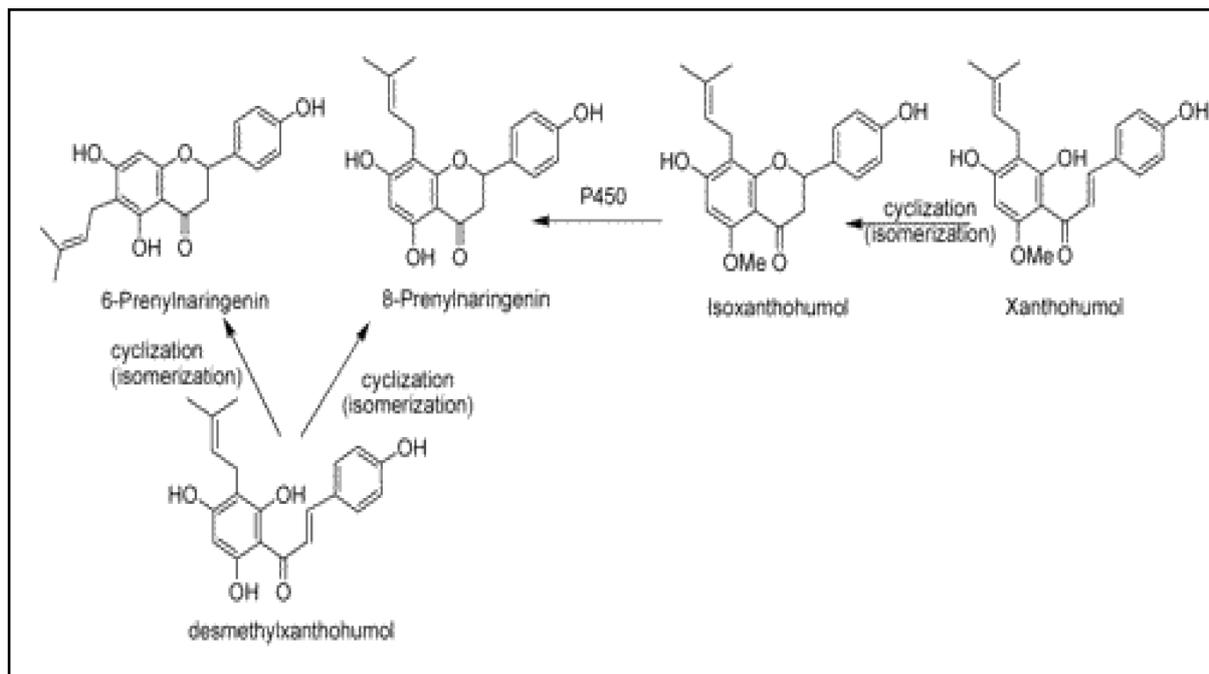


Figure 17: Formation des flavonones prénylées et du xanthohumol à partir du desméthylxanthohumol. D'après Overk et coll., 2005

2.2 Composition chimique des résines molles de la lupuline

2.2.1 Les acides amers du houblon

Les acides amers du houblon sont des dérivés prénylés d'un acyl-phloroglucinol et leur teneur est comprise entre 15-30% en poids de matière sèche dans les cônes et entre 50-80% dans les glandes de lupulines. Les acides amers sont divisés en deux groupes ; les acides- α ou humulones et les acides- β ou lupulones, présentant une chaîne isoprényle et dont le pouvoir amérisant est moins prononcé. Ces acides sont des acides phénoliques, qui existent sous cinq formes différentes : *co-*, *ad-*, *n-*, *pré-* et *post-* selon la longueur de la chaîne latérale (Figure 18).

La stabilité des acides amers est relativement fragile. La lumière ou une trop haute température peuvent entraîner leur dégradation, nécessitant une utilisation de ces produits dans l'obscurité et à basse température. Durant le processus de la fabrication de la bière, les lupulones sont majoritairement éliminés lors des premières étapes tandis que les humulones solubles dans l'eau vont subir une réaction d'isomérisation pour devenir des isohumulones (Gerhäuser C, 2005a). Les acides amers sont également des molécules très labiles, qui se dégradent facilement en solution. Toutefois plus le solvant est polaire et plus les acides sont stables. C'est pourquoi les acides amers sont principalement dissout dans le méthanol, l'éthanol ou le DMSO et conservés à -20°C dans l'obscurité.

2.3. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles du houblon sont majoritairement constituées de composés monoterpènes acycliques comme le myrcène, de sesquiterpènes monocycliques comme l'humulène ou encore de sesquiterpènes acycliques comme le farnesène (Obelevicius et Venskutonis, 2004). La teneur moyenne des huiles essentielles est de 0,3 à 1% dans les cônes et de 1 à 3% dans les glandes de lupulines. Les huiles essentielles vont conférer à la bière son arôme subtil et sa flaveur. Elles sont de couleur verte ou jaune selon le mode d'extraction à partir des cônes frais ou secs. Elles sont très odorantes, aromatiques avec des notes balsamiques et fraîches.

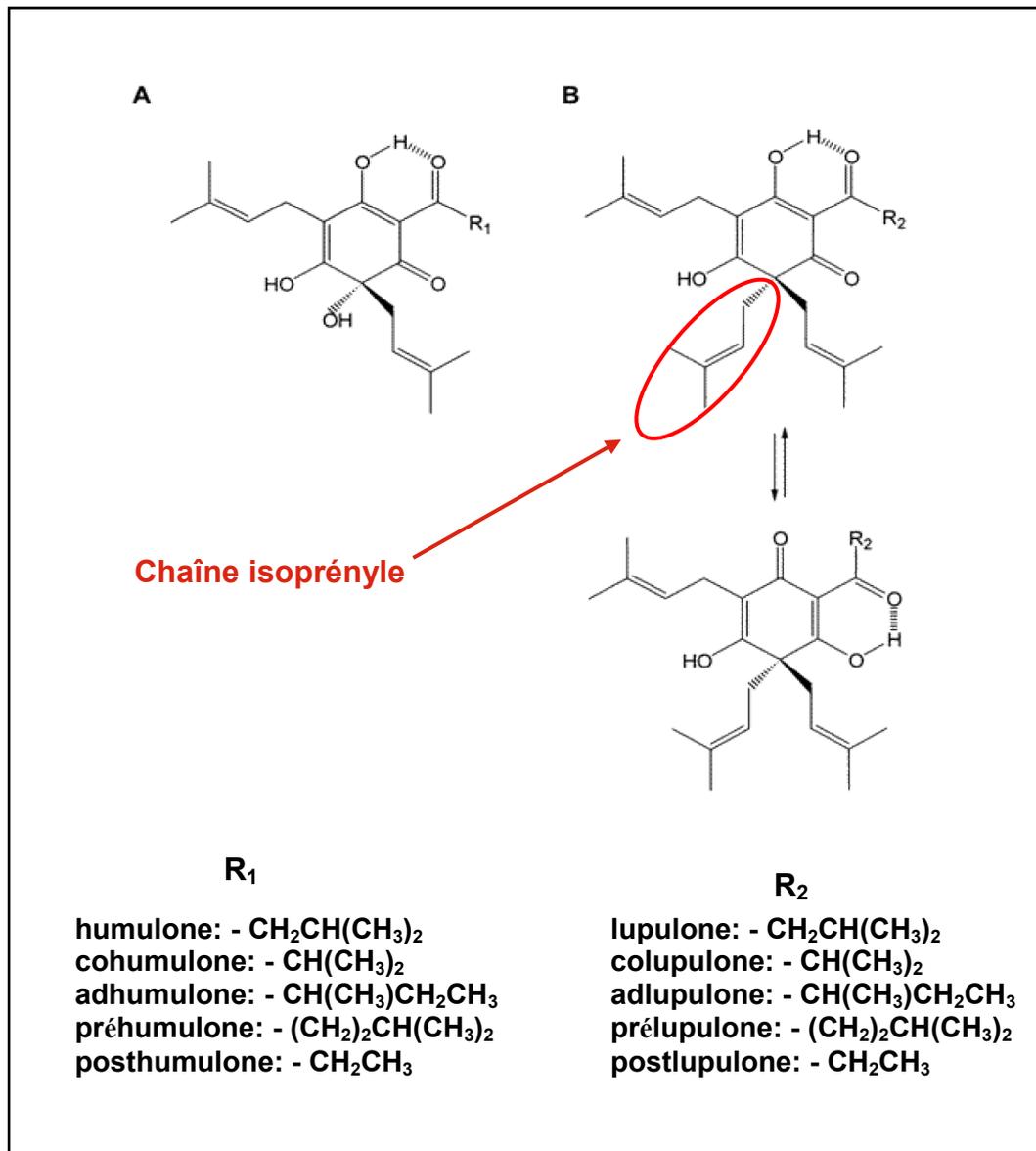


Figure 18: Structures chimiques des acides amers du houblon.

Les deux forment se différencient par la présence d'une chaîne isoprényle pour les lupulones ; il faut également noter que les humulones et les lupulones sont des substances tautomériques et forment un équilibre céto-énolique. D'après Chen et Lin, 2004

3. Utilisation du houblon dans la chimioprévention

Les constituants chimiques du houblon, en particulier les flavonoïdes prénylés et les acides amers semblent être de bons candidats pharmacologiques pour la prévention de cancers. Leur potentiel chimiopréventif fût étudié à différents stades de la cancérogenèse, lors de l'initiation, de la promotion et de la progression (Gerhäuser C et coll., 2002).

3.1. Prévention de l'initiation de la cancérogenèse

3.1.1. Inhibition de l'activation métabolique des procarcinogènes

Lors du processus de cuisson des aliments, des amines hétérocycliques se forment et peuvent devenir des agents mutagènes avec un potentiel cancérogène pour l'homme. Des études ont démontrées que les flavonoïdes prénylés du houblon sont capables d'inhiber l'activation métabolique d'une de ces amines, IQ (2-amino-3-méthylimidazo[4,5-F]quinoline) (Miranda et coll., 2000). Le xanthohumol, la 8-prénylnaringénine et l'isoxanthohumol inhibent l'activation mutagène de IQ, en bloquant un isomère du cytochrome P₄₅₀, CYP1A2. Pour une concentration plasmatique efficace, un individu de 70 kg doit consommer 10,6 mg de flavonoïdes totaux par jour, en supposant que seuls 10% seront absorbés.

L'activité inhibitrice des flavonoïdes prénylés sur les enzymes du cytochrome P₄₅₀ ; CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, CYP3A4 et CYP2E1 varie et montre une efficacité différente des molécules sur chaque enzyme. En effet, le xanthohumol est la molécule la plus efficace pour l'inhibition du CYP1B1 tandis que la 8-prénylnaringénine et l'isoxanthohumol sont plus efficaces sur le CYP1A2 (Henderson et coll., 2000).

3.1.2. Induction d'enzymes de détoxification

Une cible intéressante de la chimioprévention du cancer est la capacité de détoxification des carcinogènes par les enzymes de la phase du métabolisme hépatique. La NADPH quinone oxydoréductase (QR) est une enzyme de phase II impliquée dans la détoxification des quinones en hydroquinones. Elle protège la cellule contre la toxicité des xénobiotiques en transférant deux électrons sur une quinone donnant naissance à une hydroquinone qui pourra être glucuronée et excrétée.

Le xanthohumol et six autres chalcones prénylées induisent la quinone réductase notamment au niveau de cellules de souris Hepa 1c1c7. Le xanthohumol présente en fait un double effet, celui d'inhiber les enzymes de phase I qui sont principalement les enzymes du cytochrome P₄₅₀ et d'activer les enzymes de phase II renforçant son potentiel d'agent chimiopréventif par détoxification des carcinogènes (Gerhäuser et coll., 2002 ; Dietz et coll., 2005).

3.1.3. Capture des espèces réactives à l'oxygène

Une surproduction des espèces réactives à l'oxygène ou ROS peut entraîner des dommages à l'ADN et contribuer à l'initiation de la tumeur. Une surproduction de NO, espèce réactive de l'oxyde nitrique peut être responsable de l'initiation de dégâts cellulaires survenus lors d'une infection ou lors d'une inflammation chronique. Le xanthohumol et l'isoxanthohumol ont la capacité de capturer les ROS montrant donc une importante activité anti-oxydante. Le xanthohumol (1µM) montre une efficacité 8,9 et 2,9 fois plus grande à capturer les espèces OH⁻ et ROO[·] que le Trolox, un équivalent de la vitamine E. Le xanthohumol est également capable de prévenir la libération de NO après une stimulation des cellules macrophagiques par les lipopolysaccharides (LPS), ayant pour conséquence une diminution du développement cellulaire (Gerhäuser C, 2005b).

3.2. Prévention de la promotion du cancer

Lors de la promotion du cancer, la prolifération cellulaire peut être induite par des hormones, des facteurs de croissance, des mutations ou encore des manifestations inflammatoires. Le potentiel anti-promotion des constituants du houblon s'explique en partie par leurs effets anti-inflammatoires en particulier leur capacité à inhiber les enzymes cyclooxygénases COX1 et COX2 ainsi que leur potentiel anti-angiogénique (Gerhäuser C, 2002).

3.2.1. Effets anti-inflammatoires des constituants du houblon

La cancérogenèse est souvent associée à une production excessive de prostaglandines, les médiateurs de l'inflammation. La transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines est médiée par les enzymes COX1 et COX2. Une concentration trop élevée en prostaglandines stimule la prolifération cellulaire et peut initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins essentiels au développement de la tumeur, ce phénomène est appelé l'angiogenèse.

Le xanthohumol est capable de bloquer de manière dose dépendante les enzymes COX1 et COX2 entraînant une inhibition de la production des prostaglandines bien que l'effet direct du xanthohumol sur la production intracellulaire de prostaglandines n'a pas encore été étudié. De même, le xanthohumol est capable d'empêcher le développement cellulaire stimulé par un promoteur endogène de tumeur, le 17- β -oestradiol par une interaction avec les récepteurs à l'œstrogène. Ces effets anti-oestrogènes ont été confirmés en condition *in vivo* (Gerhäuser, 2005b).

Des études ont également été menées sur l'activité anti-inflammatoire des humulones, en particulier sur un modèle de cancer cutané de la souris, initié par l'application cutanée du 7,12-diméthylbenz[a]anthracène et dont la promotion sera induite ultérieurement par le 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). L'humulone appliquée 30 min avant le TPA entraîne une diminution significative de l'incidence de la tumeur (93%) et de sa multiplication (99%) (Yasukawa et coll., 1995 ; Gerhäuser, 2005b).

3.2.2. Inhibition de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus de néovascularisation importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques. Elle est impliquée dans la croissance tumorale et dans le développement des métastases. Les prostaglandines tiennent un rôle majeur dans l'initiation de l'angiogenèse.

L'activité anti-angiogénique des humulones fût testée sur des membranes chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (CAM). Les humulones (3-30 μ M) sont capables d'inhiber totalement la formation de vaisseaux par l'endothélium vasculaire. Elles sont également capables de réguler négativement la production du facteur de croissance de

l'endothélium vasculaire (VEGF) par les cellules endothéliales à une concentration de 100 μ M (Shimamura et coll., 2001).

Les lupulones ont également montré des propriétés anti-angiogéniques en conditions *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules (2,5-50 μ g/ml) sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire et la néovascularisation des cellules endothéliales isolées à partir de veines ombilicales humaines (HUVEC). De même chez les souris traitées avec les lupulones (20 mg/kg/jour) une réduction de 50% de la vascularisation des implants sous cutanés matrigel plugs (éponges de polymères) est observée (Siegel et coll., 2008).

La molécule 8-prénylnaringénine est capable d'inhiber l'invasion des cellules endothéliales et la formation de vaisseaux sanguins avec une IC50 de 10 μ M. Son activité *in vitro* est comparable à la génistéine, molécule connue pour ses effets anti-angiogéniques (Banerjee et coll., 2008). Son activité anti-angiogénique a également été démontrée en conditions *in vivo* sur les CAM (Pepper et coll., 2004).

L'effet anti-angiogénique du xanthohumol fût testé en 2005 sur un nouveau modèle *in vitro* de fragments de vaisseaux sanguins de placenta et sur la lignée de cellules endothéliales microvascularisées humaines HMEC-1 lésées. Le xanthohumol inhibe la formation de vaisseaux sanguins sur ces deux modèles mais également dans des conditions *in vivo* sur des xénogreffes de tumeurs de sein humaines (Gerhäuser, 2005b). De même le xanthohumol inhibe la production de NO, responsable de la production du facteur de croissance VEGF, qui lors d'une production trop importante peut induire l'angiogenèse, l'hyperméabilité vasculaire et accélère le développement tumoral (Zhao, 2003).

3.3. Prévention de la progression du cancer

3.3.1. Effets anti-prolifératifs des composés du houblon

Le xanthohumol et l'isoxanthohumol diminuent significativement la progression tumorale. Une inhibition de la croissance cellulaire fût observée chez les cellules cancéreuses du sein, MCF-7 après traitement avec ces deux molécules. Cette inhibition résulte du blocage de la synthèse de l'ADN et non de l'apoptose et aucune cytotoxicité hépatique fût observée, démontrant le potentiel d'agent anti-cancéreux du xanthohumol et de l'isoxanthohumol (Miranda et coll., 1999).

Les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à des conditions environnementales particulièrement difficiles et peuvent se développer en absence d'oxygène (hypoxie) (Vaupel, 2008). Par exemple la lignée invasive de fibrosarcome humain HT-1080 double sa synthèse de triglycérides et d'esters de cholestérol lorsqu'elles se développent en conditions d'hypoxie. Le xanthohumol est capable de réduire le taux de cholestérol et d'inhiber la formation de gouttelettes lipidiques induites par l'hypoxie. Le xanthohumol réduit la prolifération cellulaire et la mobilité des cellules HT-1080 en absence d'O₂ par rapport aux conditions normales, démontrant le potentiel chimiopréventif sélectif du xanthohumol pour les cellules cancéreuses en hypoxie (Goto et coll., 2005)

3.3.2. Apoptose induite par les composés du houblon

L'induction de l'apoptose par les acides amers du houblon fût étudiée pour la première fois par Chen et coll en 2004 sur les cellules cancéreuses HL-60. L'extrait, composé d'un mélange d'humulone et de lupulone, active les récepteurs de mort Fas et son ligand FasL entraînant l'activation de la caspase-8 suivie de celle de la caspase-3. La caspase-8 peut également perturber le potentiel de membrane de la mitochondrie entraînant une activation de la protéine proapoptotique Bax et une inactivation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L. Une libération du cytochrome c et une activation de la caspase-9 suivie de celle de la caspase-3 est alors observée. La caspase-3 activée va cliver la protéine poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), induisant la fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose (Figure 19) (Chen et Lin, 2004).

Le xanthohumol est également capable d'induire l'apoptose. Il entraîne l'activation des récepteurs de mort et de la voie mitochondriale, par l'intermédiaire des caspases -8, -9, -3 et -7,, la diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques de la mitochondrie comme Bcl-2 (Figure 20) (Pan et coll., 2005). Le xanthohumol induit également l'apoptose par une inhibition de la voie du facteur NF-κB pour les cellules cancéreuses de la prostate (Colgate et coll., 2007).

Les composants du houblon présents essentiellement dans la lupuline sécrétée par les glandes situées dans la fleur femelle présentent différentes propriétés chimiopréventives. Ainsi nous avons pu constater que les effets préventifs des flavonoïdes prénylés, du xanthohumol ou encore des humulones sont relativement bien décrits sur les modèles *in vitro* à différents stades de la cancérogenèse, à l'opposé des propriétés biologiques des lupulones. Toutefois des études sur des modèles *in vivo* concernant la biodisponibilité, la distribution et l'efficacité de ces composants dans l'organisme doivent être développées pour élaborer des traitements chimiopréventifs efficaces.

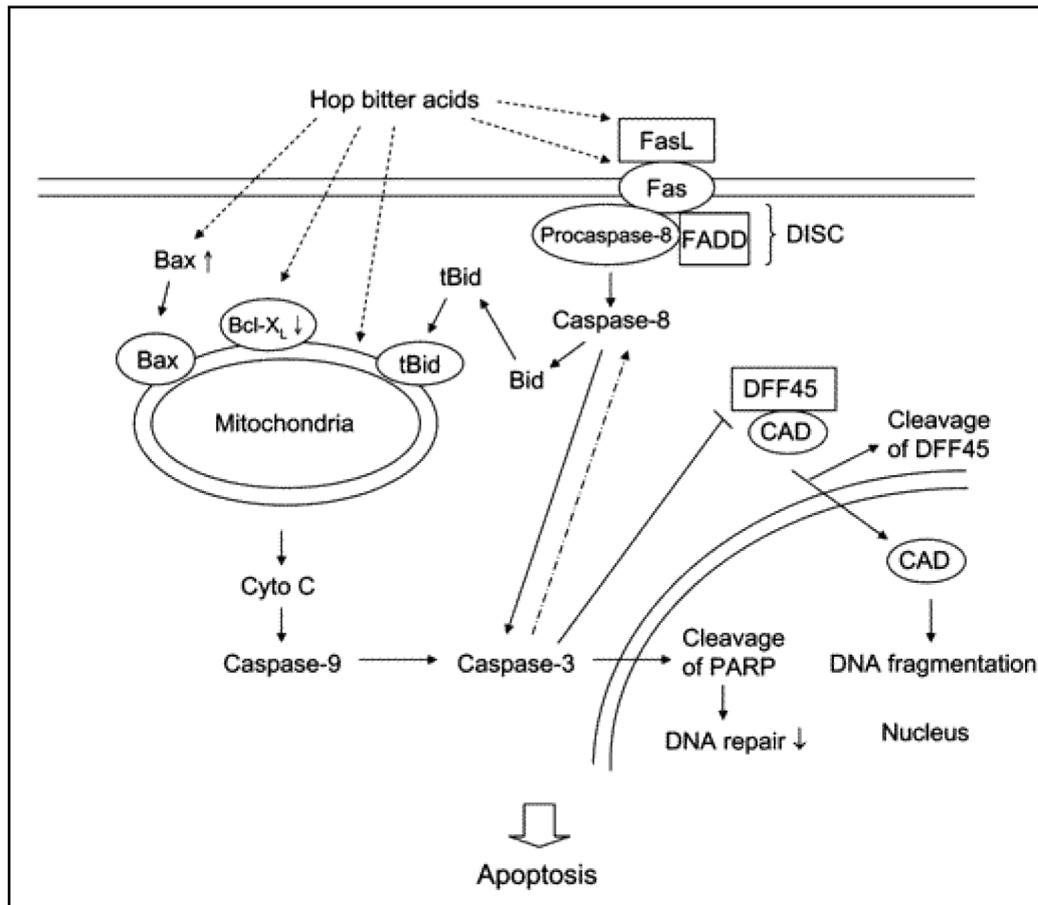


Figure 19: Mécanismes d'action de l'induction de l'apoptose par les acides amers sur les cellules HL-60. D'après Chen et Lin, 2004

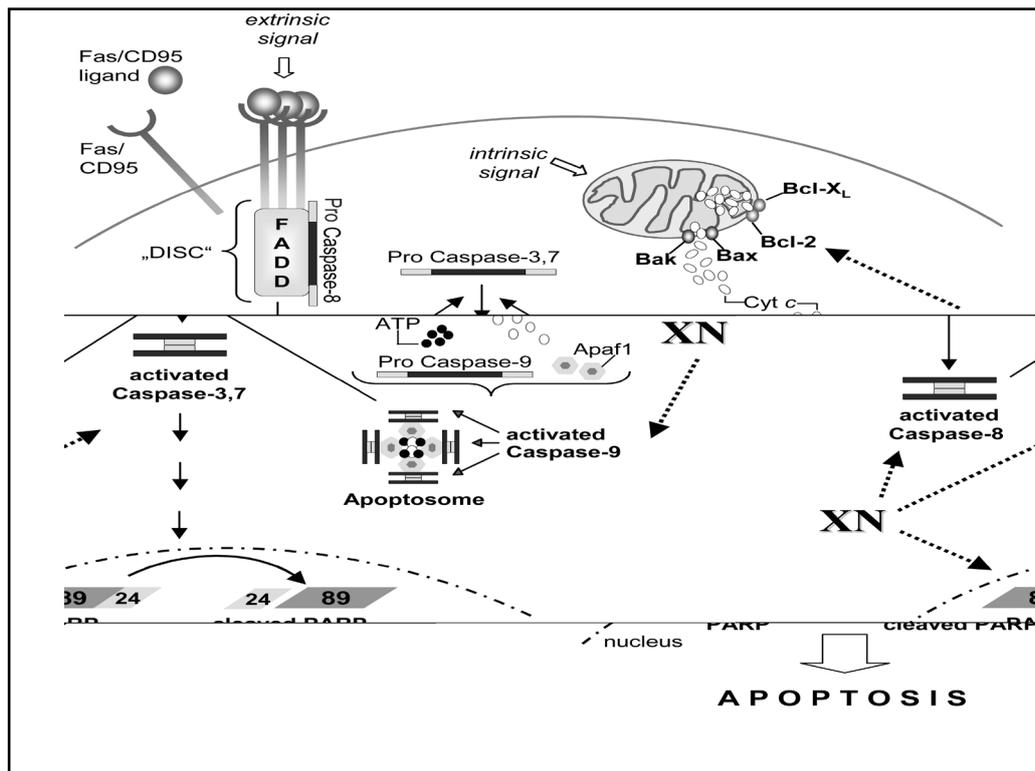


Figure 20: Les cibles potentielles du xanthohumol lors de l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses coliques humaines. D'après Pan et coll., 2005.

L'activation des récepteurs de mort se fait par le clivage de la capase-8 entraînant l'activation des caspases -3 et -7 et de PARP. Le xanthohumol affecte la mitochondrie par une régulation négative de Bcl-2, la libération du cytochrome c et une activation de l'apoptosome. L'activation de ces différentes voies induit l'apoptose.

METHODOLOGIES

METHODOLOGIES

I. ETUDES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

1. Les lignées cellulaires SW480 et SW620

Deux lignées cellulaires SW480 et SW620 ont été utilisées comme modèle *in vitro* de la tumeur primaire colique humaine et de ses cellules métastatiques. Ces deux lignées sont issues d'un adénocarcinome colique humain et ont été isolées d'une part de la tumeur colique primaire (SW480) et d'autre part d'un ganglion lymphatique présentant des métastases (SW620) au sein d'un même patient de type caucasien. Durant la phase de différenciation, les cellules SW480 vont acquérir les caractéristiques des entérocytes, avec une morphologie cylindrique, une polarisation cellulaire, ainsi qu'une apparition de microvillosités sur la surface apicale. Les cellules SW620 seront moins différenciées et vont présenter une morphologie plutôt sphérique. De plus, elles n'exprimeront plus de microvillosités à la surface des cellules, et leur cycle de division sera plus rapide que celui des SW480 montrant un caractère plus invasif (Leibovitz et coll., 1976).

Toutes les expériences sont réalisées au cours de la phase exponentielle de la croissance cellulaire, permettant à chaque lignée, une acquisition totale de ses différentes caractéristiques.

2. Molécules testées

2.1 Extraction et purification des lupulones

Les lupulones sont obtenus à partir d'un sous produit industriel des industries brassicoles (Kronenbourg, Brasseries Carlsberg SA, Strasbourg, France) appelé « Whirlpool ». Le « Whirlpool » est un concentré des déchets issus de la fabrication de la bière, enrichi en acides β du houblon c'est-à-dire en lupulones.

Un volume de « Whirlpool » est dilué dans deux volumes d'eau distillée contenant 0,1% de vitamine C et la solution est mélangée pendant 15 min. Une séparation de la phase aqueuse est ensuite réalisée par une série de centrifugation à 3000 t/min pendant 10min. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans de l'éthanol puis centrifugé à 3000 t/min pendant 10min. Le surnageant, de couleur brune, contenant les lupulones est récupéré et le culot sera à

nouveau repris dans de l'éthanol et centrifugé. Cette opération sera répétée jusqu'à ce que le surnageant présente une couleur blanche. La solution obtenue est alors filtrée sous vide et l'éthanol est évaporé à l'aide d'un Rotavap à 37°C. L'extrait obtenu est alors lavé avec de l'eau distillée et après centrifugation à 4000 tours/min pendant 15min, le culot est placé au lyophilisateur afin d'éliminer toutes traces d'eau. Pour éviter une oxydation des lupulones par la lumière, chaque étape est réalisée à l'abri de la lumière.

Afin de vérifier qu'aucune dégradation n'a eu lieu pendant l'extraction et de tester la pureté de l'extrait, celui-ci est analysé par chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La colonne utilisée est une colonne Nucleodur® (Macherey-Nagel, Hoerd, France) de dimension 250 mm x 4,6 mm. L'extrait (10mg/ml) est élué selon un gradient avec deux solutions d'éluion. La première (phase A) est composée d'acétonitrile contenant 0,01M d'acide trifluoroacétique (40 : 60 v/v) et la deuxième (phase B) d'acétonitrile. Le gradient se fait sous les conditions suivantes : 100% (A) vers 100% (B) pendant 15min, puis 100% (A) et 100% (B) durant 30min. Le degré de purification de l'extrait est de 85-90%. L'extrait de lupulones est alors constitué de 40% de *co*-lupulones (C₂₅H₃₆O₄, MM : 400,56 g/mol) et de 60% de lupulones (C₂₆H₃₈O₄, MM : 414,58 g/mol) (Figure 18). En conditions *in vitro*, la solution mère de lupulones est solubilisée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) à une concentration de 100mg/ml et conservée à -20°C. La concentration finale de lupulones lors des traitements sur les cellules est de 40µg/ml.

2.2 Autres molécules testées

Pour comprendre les mécanismes d'action des lupulones, d'autres molécules chimiques ont été testées :

- La molécule TRAIL ligand (50 ng/ml) (Alexis Biochemicals, Suisse) ; les anticorps inhibiteurs des récepteurs de mort TRAIL, anti-humain DR4 ou anti-humain DR5 (250 ng/ml) (Alexis Biochemicals, Suisse) et l'inhibiteur spécifique de la caspase-8, Z-IETD-FMK (50 µM) (R&D systems, Royaume-Unis) ont été utilisés pour l'étude de la voie extrinsèque lors du processus apoptotique.
- La vitamine C (C₆H₈O₆, MM : 176,12) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) a été utilisée dans les études du stress oxydatif induit par l'activation de la voie intrinsèque.

- Les inhibiteurs spécifiques de la protéine p53, pifithrin- α (30 μ M), de l'activation du facteur NF- κ B, quinazoline (30 nM) (Merck Chemicals, France) ainsi que les inhibiteurs spécifiques des voies MAPKs ; l'inhibiteur de la voie JNK, SP600125 (10 μ M), l'inhibiteur de la voie ERK, SL327 (10 μ M) et l'inhibiteur de la voie p38, SB203580 (10 μ M) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne), ont été utilisés lors de l'étude de ces différentes voies, afin de déterminer l'origine du mécanisme d'action des lupulones .

3. La cytométrie en flux

3.1 Principe général de la technique

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser (Figure 21). La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier (Villas, 1998).

En bref, les cellules sont dispersées dans le sérum physiologique et passent à travers un faisceau de lumière laser. La diminution du faisceau direct permet la mesure de la masse cellulaire. Les cellules qui émettent de la fluorescence sont alors reconnues par une cellule photoélectrique particulière (Figure 21).

Les signaux détectés donnent des informations sur les propriétés physiques intrinsèques des cellules, telles que la taille (FSC-forward scatter) et la granularité (SSC-side scatter), ainsi que des informations relatives aux propriétés optiques, induites par la fluorescence, obtenues par des marquages spécifiques des structures ou des fonctions cellulaires. Ces signaux sont collectés par des photo-multiplieurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur grâce à une composante informatique et optique (miroir dichroïque et filtre optique). L'ordinateur analyse les données statistiques et représente sous forme d'histogramme ou de « dot plots » (nuages de points) la population cellulaire dont les propriétés sont évaluées.

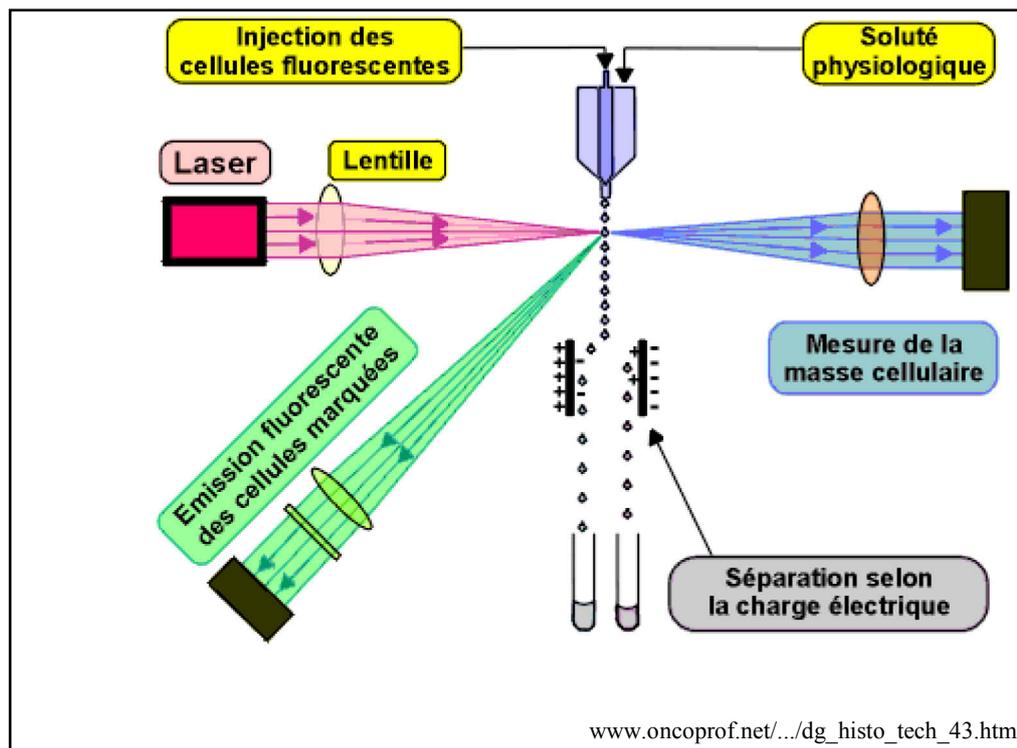


Figure 21: Principe de la cytométrie en flux

Toutes les expériences sont réalisées à l'aide du cytomètre FACScan avec un laser de longueur d'onde de 488 nm (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Des filtres lumineux et dichroïques permettent l'analyse simultanée de 3 couleurs, en plus de la lumière blanche : FL-1, FL-2, FL-3 (Tableau 2). Les données sont traitées et analysées à l'aide du logiciel CellQuest (Becton Dickinson, USA).

| Laser | Paramètres | Filtres (nm) | Exemple de Fluorochrome |
|-------|------------|--------------|-------------------------|
| 488nm | FL-1 | 515/30 | FITC |
| | FL-2 | 585/42 | IP, PE |
| | FL-3 | 650 | F. Rouge, IP |

Tableau 2: Les différents filtres du cytomètre en flux Becton Dickinson

3.2 Analyse de la mort cellulaire : apparition des corps hypodiploïdes

Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est-à-dire l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques responsables de la prolifération cellulaire. La cytométrie en flux permet de suivre les cellules durant chaque phase du cycle, G_0/G_1 , S et G_2/M , en mesurant la quantité d'ADN présent dans la cellule. Lors de la mort cellulaire, l'ADN peut être fragmenté par le processus apoptotique ou éclaté par le processus nécrotique. Les cellules mortes ou mourantes contiennent alors une quantité d'ADN inférieure à $2n$, dont la fluorescence émise réduite est détectée par le cytomètre. Cette population cellulaire, appelée corps hypodiploïdes, s'accumule alors dans une région inférieure à la phase G_0/G_1 , appelée Sub G_0/G_1 (Figure 22).

Pour l'analyse de la mort cellulaire, l'intercalant d'ADN, l'iodure de propidium (IP) est utilisé. Le cytomètre va mesurer la fluorescence émise par l'IP, suite à une excitation à 488 nm, et les populations cellulaires présentes à une phase donnée sont triées. La méthode utilisée est basée sur la technique décrite par Nicolletti et coll., 1991.

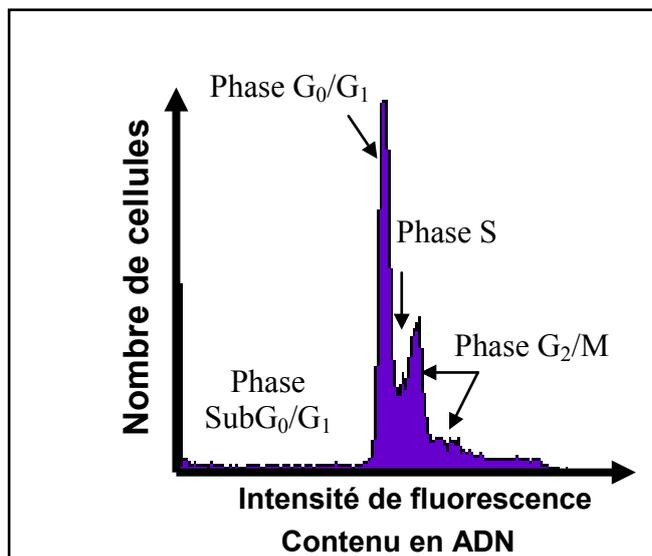


Figure 22: Analyse du cycle cellulaire des cellules SW480 et SW620 par cytométrie en flux

3.3 Mesure de la production du stress oxydatif

La mitochondrie est une source majeure de la formation de stress oxydatif ou des espèces réactives d'oxygène (ERO ou ROS), pouvant être impliquées dans l'induction de la mort cellulaire (Kumar B et coll, 2009 ; Klamt F et coll, 2008). L'état d'oxydoréduction de la cellule peut être évalué par l'utilisation des dérivés du diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (H₂DCF-DA) en cytométrie en flux. H₂DCF-DA pénètre dans la cellule où il sera transformé par des estérases cellulaires en 2',7'-dichlorodéhydrofluorescéine (H₂DCF). En présence de ROS, H₂DCF est oxydé en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) par le cytochrome c, les peroxydases ou l'ion Fe²⁺. DCF émet alors une fluorescence détectée par le cytomètre. (Ubezio et coll, 1994) (Figure 23). Pour la détection du stress oxydatif, deux produits importants du stress ont été mesurés, l'anion superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à l'aide du fluorochrome CM-H₂DCFDA (acétyl d'ester diacétate 5-(et -6)-chlorométhyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (C₂₂H₁₉Cl₃O₈ ; MM : 577,8) Molecular Probes, Invitrogen, France).

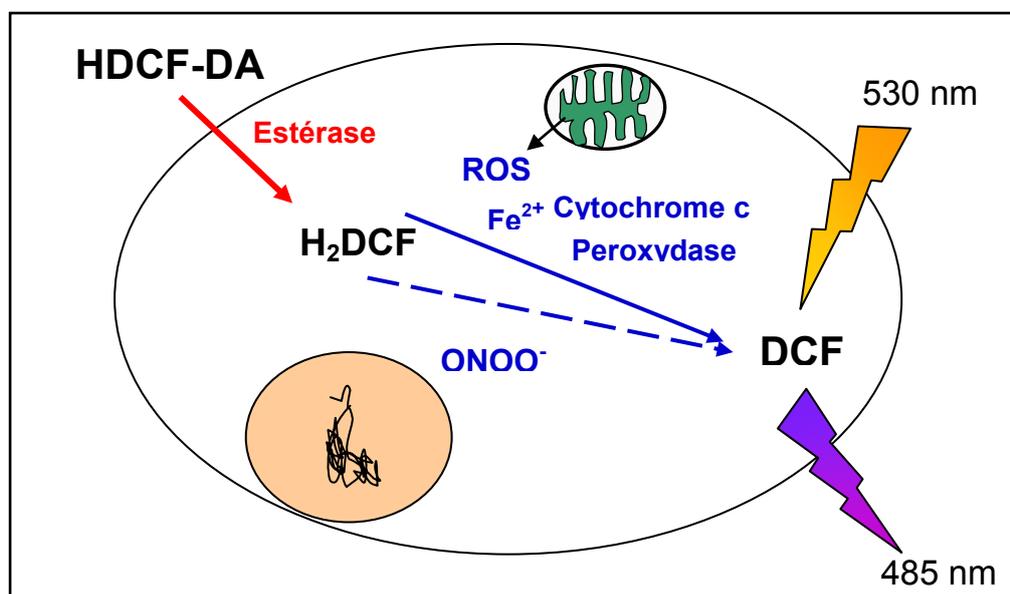


Figure 23: Mécanisme d'action du 2', 7'-dichlorodihydrofluorescéine (HDCF-DA).

La cellule est perméable au HDCF-DA non fluorescent. Celui-ci est clivé par des estérases cellulaires, produisant une molécule relativement polaire qui s'accumule dans la cellule. Ces molécules non fluorescentes sont oxydées en dichlorofluorescéine (DCF) par des peroxydases au cours de l'oxydation mitochondriale. La DCF émet une fluorescence, qui permet la visualisation de l'état d'oxydoréduction de la cellule.

3.4 Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial

Pour faciliter le transport de métabolites au sein de la membrane interne, la mitochondrie utilise un gradient électrochimique. Ce gradient appelé potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) est basé sur un gradient de proton, qui va charger négativement la matrice mitochondriale et positivement la chambre externe. Une diminution du $\Delta\Psi_m$ entraîne un dysfonctionnement de la mitochondrie, qui va activer la voie apoptotique intrinsèque (Maddika et coll, 2005). La détermination du potentiel membranaire mitochondrial est réalisée par cytométrie en flux avec l'utilisation du fluorochrome : 3,3'-diéthylthiopyranine iodide (DiOC₂(3)) (C₂₁H₂₁IN₂O₂, MM : 460,31, Molecular Probes, Invitrogen, France). Cette molécule cationique lipophile pénètre dans le cytosol des cellules où elle fluoresce en vert (530 nm, FL-1) ou rouge (650 nm, FL-3) suite à une excitation à 488 nm. Elle s'accumule alors dans les mitochondries où le potentiel de membrane est actif avec une fluorescence émise importante. Lorsque le potentiel est perturbé, la perméabilisation de la mitochondrie augmente et le fluorochrome est libéré dans le cytosol. Suite à des changements de pH la fluorescence va alors s'arrêter et le signal va diminuer (Campos et coll, 2004).

3.5 Analyse de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN est une des étapes clés du processus apoptotique. Afin de déterminer cette fragmentation, un kit *in situ* basé sur la technique du TUNEL, Mebstain® Apoptosis Direct Kit (MBL International Corporation, Nagoya, Japan) est utilisé. Durant l'apoptose, la chromatine va être coupée par des endonucléases, au niveau de sites de coupures situés entre les nucléosomes (Gavriely et coll, 1992). Les fragments générés vont alors pouvoir être fixés, au niveau de leur extrémité 3'-OH, par une déoxynucléotidyl transférase terminale (TdT), avec FITC-dUTP (Figure 24). Plus l'ADN sera fragmenté et plus le signal fluorescent émis sera fort.

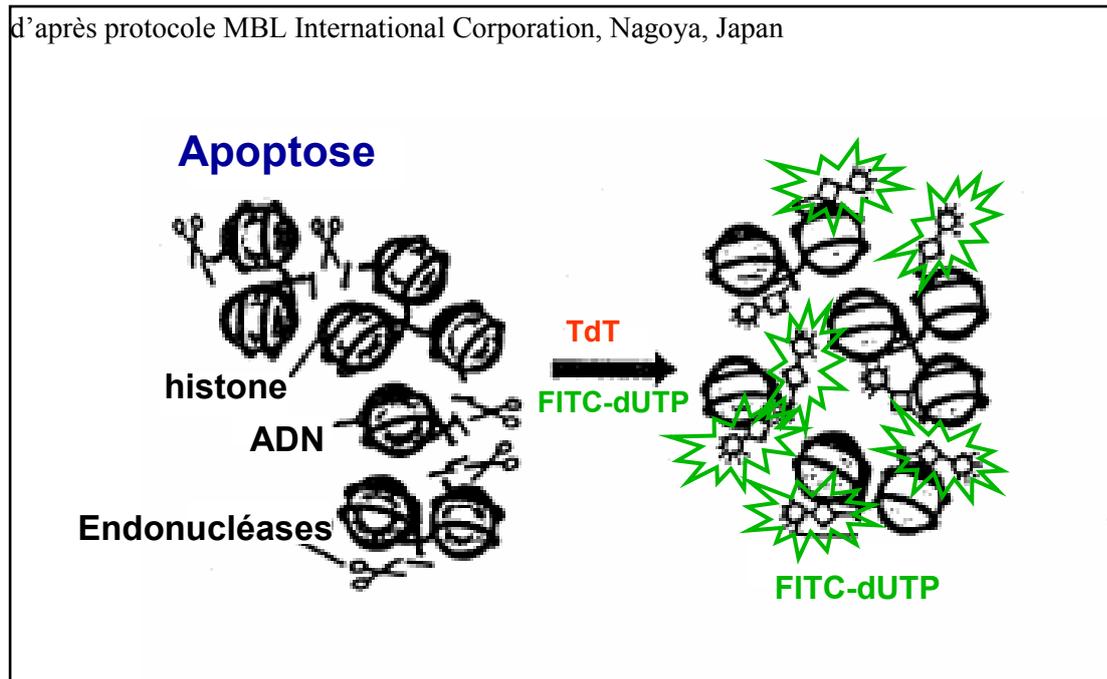


Figure 24: Principe de la méthode TUNEL par cytométrie en flux

4. Analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR en temps réel

La reverse transcriptase PCR ou RT-PCR est une technique d'amplification d'une séquence d'ARN, qui repose sur deux parties. La première partie consiste à convertir la séquence d'ARN en ADN, appelé ADNc, par des enzymes thermostables, les transcriptases inverses (reverse transcriptase RT). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Ces enzymes sont des polymérases qui auront besoin d'une amorce 3'-OH libre, pour initier la synthèse. La deuxième partie consiste à synthétiser le deuxième brin complémentaire de l'ADNc et d'amplifier la séquence double brin obtenue par PCR en utilisant la Taqpolymérase. La RT-PCR en temps réel consiste en l'ajout en plus des deux amorces d'une sonde marquée, également spécifique de la séquence cible. Les fragments amplifiés sont alors mis en évidence au fur et à mesure des cycles de la réaction, en phase exponentielle, assurant ainsi une meilleure sensibilité de la technique importante et une sécurité du résultat (Bustin et coll, 2006 ; Schrader et coll, 2003). La sonde utilisée est une sonde TaqMan® (Applied Biosystem) (Figures 25 et 26).

Une extraction de l'ARN total est réalisée, sur les cellules traitées ou non par les lupulones (40 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 et 48h, à l'aide du kit RNeasy (QIAGEN, VWR, Dannemark). Pour l'étape de conversion de l'ARN (1 μg) en ADN, le kit High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems) est utilisé. La chimie TaqMan, TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis) est utilisée pour mesurer le niveau de la transcription et de l'amplification de chaque séquences d'ARN cibles. La béta-actine est utilisée comme contrôle endogène. La RT-PCR en temps réel est réalisée avec TaqMan Universal PCR master mix et ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) en triplicata. Les données sont ensuite analysées et normalisées par rapport au contrôle interne et aux cellules non traitées et les analyses statistiques sont réalisées selon les méthodes du delta Ct (cycle threshold) décrites précédemment (Livak et coll, 2001).

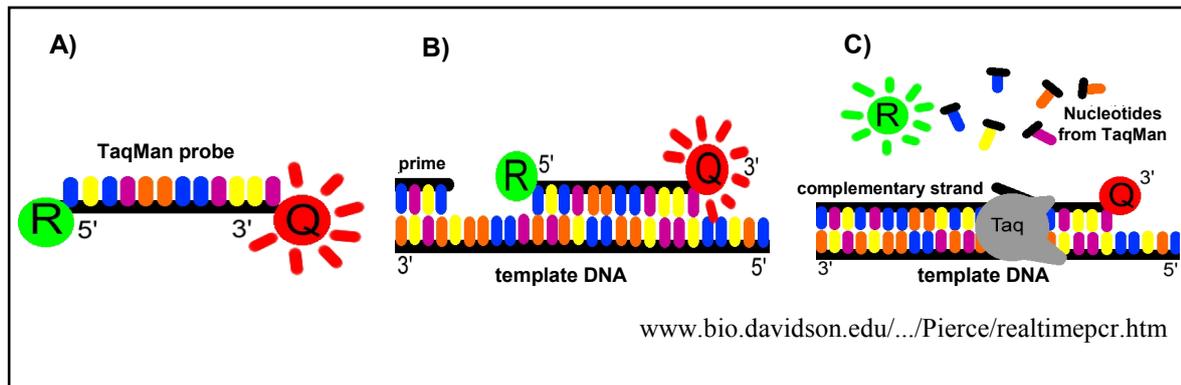


Figure 25: Principe de la chimie Taqman® en PCR en temps réel. (A) La sonde Taqman est composée d'une séquence spécifique à la séquence cible, avec deux fluorochromes, un quencher et un reporter. Le quencher perturbe le reporter, qui ne peut émettre. (B) La sonde se lie au brin cible, ainsi que l'amorce. La réaction de synthèse du brin complémentaire peut démarrer à l'aide de la Taq polymérase. (C) En présence de nucléotides, la synthèse du brin complémentaire est créée par la Taq polymérase, qui va libérer le reporter. Ceci entraîne une inactivation du quencher et l'émission d'un signal par le reporter, permettant de suivre chaque brin pendant l'amplification.

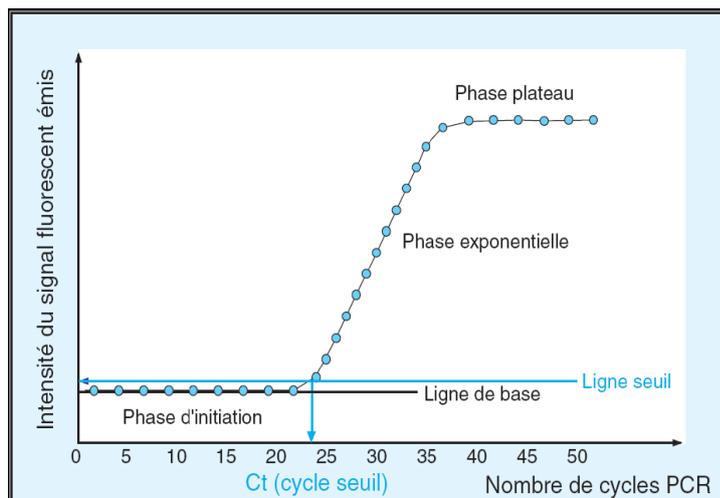


Figure 26: Profil d'une courbe de PCR en temps réel

5. Principe des tests colorimétriques et des tests ELISA

5.1 Tests colorimétriques

Les tests colorimétriques sont utilisés pour la mesure de l'activité spécifique d'enzymes sur des plaques de 96 puits. Nous avons utilisé ces tests pour la mesure de l'activité des différentes caspases -8, -9 et -3.

L'expérience est basée sur l'hydrolyse du substrat Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroaniline (Ac-DEVD-pNA) par la caspase-3 ou du substrat Acétyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline (Ac-IETD-pNA) par la caspase-8, présentes dans les lysats cellulaires. Cette réaction conduit à la libération de p-nitroaniline (pNA) dont la concentration est déterminée après mesure de la densité optique à 405 nm. Les valeurs obtenues sont ajustées à l'aide d'une courbe standard avec des concentrations données en pNA. Concernant la caspase-9, l'essai est réalisé avec le kit APOCYTO Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (MBL International Corporation, Japon). Le principe du test est similaire à ceux des caspases-3 et -8 mais le substrat utilisé est le N-Acétyl-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroaniline (Ac-LEDH-pNA). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'activité au sein des différents échantillons traités par rapport au groupe contrôle. L'activité spécifique pour les caspases-3 et -8 est exprimée en nmoles de pNA libérés / min / mg de protéines totales tandis que l'activité spécifique de la caspase-9 est exprimée en nmoles de pNA libérés / mg de protéines totales.

5.2 Le test ELISA

Nous avons utilisé le principe de la méthode « ELISA sandwich » (Figure 27) pour la mesure du cytochrome c, la détection des IAPs (la survivine et XIAP) et la détection des sous-unités de la famille de NF- κ B. Un premier anticorps, appelé anticorps de détection est fixé au fond des puits de la plaque de microtitration 96 puits. L'antigène, qui possède deux épitopes différents, va être d'abord reconnu par l'anticorps de détection puis par un deuxième anticorps, qui sera couplé à la peroxydase. Un substrat à la peroxydase (H_2O_2 + diamine orthophénylène) est ensuite ajouté et la réaction catalytique va libérer un produit coloré. La densité optique du produit est alors mesurée par spectrophotométrie à 450 nm.

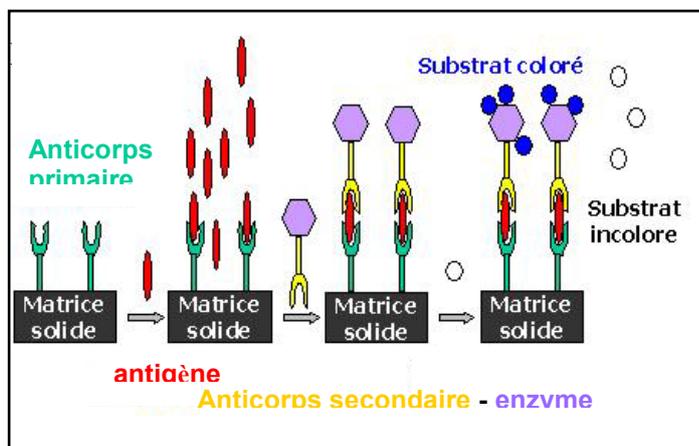


Figure 27: Principe simplifié de la méthode "ELISA Sandwich"

Concernant la détection du facteur NF- κ B, nous avons mesuré deux sous-unités de NF- κ B, prépondérantes dans l'apoptose, p50 et p65, à l'aide d'une technique basée sur le même principe que la méthode « ELISA Sandwich » à l'aide du kit TransAMTM NF- κ B Family (Active Motif Europe, Belgique). Dans les puits d'une plaque de microtitration (96 puits) est fixé un oligonucléotide, correspondant à une séquence consensus de NF- κ B (5'-GGGACTTCC-3'). La forme active de NF- κ B va se lier spécifiquement à l'oligonucléotide. L'anticorps primaire va ensuite reconnaître les épitopes correspondant soit à la sous-unité p50 soit à la sous-unité p65. Un anticorps secondaire couplé à la peroxydase reconnaît l'anticorps primaire et après ajout du substrat à la peroxydase (H_2O_2 + diamine orthophénylène), la réaction catalytique va libérer un produit coloré. La densité optique du produit est alors mesurée par spectrophotométrie à 450 nm.

II. MODELE PRECLINIQUE DE CANCEROGENESE EXPERIMENTALE

1. Modèle animal et traitements

Le modèle de cancérogenèse utilisé lors de nos expériences *in vivo* est un modèle bien connu et utilisé dans de nombreuses études scientifiques (Hagos et coll, 2007 ; Jacobsen et coll, 2006). Les animaux utilisés sont des rats mâles Wistar (n = 18), obtenus par les Laboratoires Charles River (Les Oncins, France), pesant entre 240 et 250 g et maintenus à des conditions standards d'expérimentations : 22°C, 60% d'humidité relative dans l'air avec des cycles de 12h de lumière / 12h de nuit et une atmosphère renouvelée toutes les heures. Les animaux suivent un régime alimentaire standard et ont un libre accès à la boisson.

Une fois toutes les deux semaines, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale d'azoxyméthane (AOM) (Sigma Aldrich, Allemagne), à raison de 15 mg / kg. L'AOM entraîne un processus de transformation de l'épithélium normal du colon en un carcinome avec comme étape intermédiaire, la formation de polypes adénomateux (Reddy BS, 2004). Dans ce modèle les lésions préneoplasiques apparaissent 3 à 4 semaines après les injections d'AOM et la première tumeur apparaît au bout de six mois rendant ce modèle très attractif.

Une semaine après la dernière injection d'AOM les rats sont séparés au hasard en deux groupes expérimentaux et un groupe contrôle. Le premier groupe expérimental (n = 6) reçoit tous les jours, une solution contenant 0,001% de lupulones et 0,001% d'acide ascorbique ou vitamine C dans leur eau de boisson contenant 0,5% d'éthanol. Le deuxième groupe expérimental (n = 6) est traité de la même manière mais avec une solution de 0,005% de lupulones. Le groupe contrôle (n = 6) est traité avec une solution contenant 0,5% d'éthanol et 0,001% de vitamine C dans l'eau de boisson. La vitamine C est utilisée pour protéger les lupulones de l'oxydation. Les rats consomment quotidiennement, entre 30 et 34 ml de boisson pendant la période expérimentale. La moyenne quotidienne de prise de lupulones par rat dans les deux groupes expérimentaux, est respectivement, de 0,8 et 4 mg/kg. Toutes les expériences réalisées sur les animaux sont en accord avec le guide institutionnel du Comité Français de l'Ethique (autorisation n° A67-480, Ministère Français de l'Agriculture).

2. Mesure et détermination des cryptes aberrantes et des tumeurs coliques

Tous les animaux sont sacrifiés 7 mois après la dernière injection d'AOM. Le colon est ensuite prélevé, lavé une fois avec de la solution saline et les tissus graisseux sont enlevés de la muqueuse afin de pouvoir mesurer le nombre, la taille et la localisation des tumeurs.

Le volume tumoral est évalué, après une autopsie de l'animal, selon la formule suivante :

$$V = 4/3\pi \times (A/2)^2 \times B/2$$

Où A représente la largeur de la tumeur et B sa longueur en millimètres.

La détermination de cryptes anormales hyperprolifératives, se fait sur un segment de 6 cm de long correspondant à la partie distale du colon. Le segment est fixé dans un tampon de formaline (10%) et incubé dans une solution de bleu de méthylène (0,2%) pendant 5 min et rincé dans un tampon de Krebs-Ringer. Le segment est ensuite examiné en microscopie avec un objectif de grossissement x5. Les critères utilisés pour l'identification de cryptes hyperprolifératifs et des foyers de cryptes aberrantes (FCA) sont :

- une augmentation de la taille
- une paroi de cellules épithéliales plus épaisse
- une zone péricryptale plus importante que celle des cryptes normales

RESULTATS

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 1

Etudes des effets chemopréventif des lupulones sur les cellules cancéreuses coliques humaines métastatiques SW620, ainsi que sur un modèle de cancérogenèse colorectale chez le rat

1. Résumé

Les acides amers du houblon (*Humulus lupulus L.*) sont divisés en deux familles, les humulones ou acides alpha et les lupulones ou acides bêta. L'objectif de notre étude fût de déterminer les effets anti-prolifératifs des lupulones sur un modèle *in vitro* de cellules humaines coliques métastatiques, les cellules SW620 ainsi que d'évaluer leur effet chimiopréventif sur un modèle *in vivo* de carcinogenèse. Les lupulones (40 µg/ml) induisent une inhibition de la croissance cellulaire des SW620 de 70% après un traitement de 48h. Ils augmentent l'expression de récepteurs de mort appartenant à la superfamille TNF-alpha, comme le récepteur Fas et les récepteurs apoptotiques de TRAIL, TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5). Ces observations suggèrent que les lupulones activent les voies de signalisation impliquant les récepteurs de Fas et TRAIL dans le but d'induire l'apoptose. Les lupulones entraînent également une perméabilisation de la membrane mitochondriale. La carcinogenèse colique est initiée chez des rats Wistar grâce à des injections intrapéritonéales d'azoxyméthane (AOM) une fois par semaine pendant deux semaines. Les rats reçoivent des lupulones (0,001 à 0,005%) dilués dans leur eau de boisson, une semaine après la dernière injection, tandis que le groupe contrôle reçoit l'excipient. Après 7 mois de traitement, les rats traités aux lupulones à 0,001% et 0,005% montrent une réduction de respectivement 30 et 50% du nombre de lésions prénéoplasiques (foyers de cryptes aberrantes) au niveau du colon. De plus, une diminution drastique du nombre total de tumeurs coliques est observée chez les rats traités aux lupulones. Les lupulones induisent l'apoptose des cellules SW620 en activant l'ensemble des voies de mort Fas et TRAIL et empêchent le développement du cancer du colon à faible dose (4 mg/kg/jour). Nos résultats démontrent l'utilité des lupulones dans les essais de prévention du cancer du colon.

2. Introduction

Les acides amers du houblon sont divisés en deux principales classes ; les acides- α ou humulones et les acides- β ou lupulones. Ces deux catégories sont composées de mixtures de molécules homologues et les lupulones sont composés d'une mixture de *n*-, *co*- et *ad*-lupulones (Zhang et coll., 2004 ; Verzele et coll., 1978). Quelques études ont été menées sur le potentiel biologique des humulones ou de mixture d'acides amers du houblon. Ces substances présentent une action anti-bactérienne mais également des propriétés anticancéreuses comme l'inhibition de la prolifération des cellules leucémiques, l'induction de la différenciation cellulaire et de l'apoptose (Gerhauser, 2005 ; Honma et coll., 1998), l'inhibition de l'expression de la COX-2 (Yamamoto et coll., 2002 ; Lee et coll., 2007) ou encore la réduction de la sécrétion de la prostaglandine E2. Les humulones inhibent également l'angiogenèse dans les conditions *in vitro* et *in vivo* (Shimamura et coll., 2001). A la différence des humulones, les propriétés anticancéreuses des lupulones n'ont jamais été étudiées, due à l'instabilité de ces molécules notamment à la lumière.

Dans ce chapitre, notre but est d'évaluer les mécanismes anti-prolifératifs des lupulones sur une lignée cellulaire colique métastatique humaine, les cellules SW620 et d'évaluer leur potentiel anticarcinogène dans les conditions *in vivo*. Nos résultats démontrent que les lupulones entraînent une apoptose des cellules SW620, en activant des voies de signalisation de mort cellulaire et que ces composés inhibent la formation de tumeurs colorectales dans un modèle expérimental de carcinogenèse colique.

3. Résultats : PUBLICATION n°1

Chemopreventive effects of lupulone, a hop β -acid, on human colon derived-metastatic SW620 cells and in rat model of colon carcinogenesis

V Lamy, S Roussi, Mi Chaabi, F Gossé, N Schall, A Lobstein, F Raul.

Carcinogenesis, 2007; 28:1575-1581

Lien électronique sur le site de l'éditeur:

<http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/reprint/28/7/1575>

4. Conclusion

Nos premiers résultats démontrent pour la première fois, le haut potentiel anti-cancéreux des lupulones. En effet, les lupulones sont capables d'induire la mort cellulaire, en activant des voies de signalisation de mort impliquant les récepteurs Fas et TRAIL, sur les cellules coliques métastatiques SW620. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la lignée SW620 est résistante à TRAIL ligand. De plus, à faible dose (4 mg/kg/jour), les lupulones sont capables de réduire le nombre de tumeurs coliques chez les rats, montrant ainsi l'importance de leur utilisation pour des essais de prévention contre le cancer colorectal.

Ces observations suggèrent une étude plus précise du mécanisme de mort cellulaire induit par les lupulones au niveau des cellules métastatiques SW620 mais également au niveau des cellules primaires SW480, dont les cellules SW620 sont dérivées, afin de comprendre l'action des lupulones à différents stades du cancer du colon. Ces premiers résultats démontrent le haut potentiel chimiopréventif des lupulones, qui sont capables de surmonter la résistance à TRAIL ligand des cellules SW620 par l'activation des récepteurs de mort TRAIL, induisant ainsi la mort spécifique des cellules cancéreuses (Kelley et coll., 2001).

CHAPITRE 2

Les lupulones activent différentes voies de mort cellulaire, impliquant les récepteurs apoptotiques de la voie TRAIL.

1. Résumé

Cette étude a été réalisée dans le but de comparer les voies de mort activées par les lupulones dans les cellules coliques humaines primaires SW480 (sensibles à TRAIL) et dans les cellules métastatiques dérivées SW620 (résistantes à TRAIL). Les lupulones entraînent une surexpression des récepteurs DR4 et DR5 à la surface des cellules, pour les deux lignées en présence ou en absence de TRAIL ligand. La mort cellulaire induite par les lupulones est inhibée lorsque les récepteurs DR4 et DR5 sont bloqués. Pour les cellules SW480, les lupulones produisent la mort cellulaire à travers un lien entre la voie extrinsèque (DR4/DR5) et intrinsèque (mitochondrie) impliquant la caspase-8 et le clivage de la protéine Bid. Ce clivage provoque une perturbation de la mitochondrie, entraînant la surexpression de la protéine pro apoptotique Bax, qui va permettre la libération du cytochrome c et une activation des caspases -9 et -3. Une activation d'un inhibiteur naturel à l'apoptose, la protéine XIAP est observée, induisant l'inhibition d'une partie de la caspase-3 et pouvant expliquer la sensibilité plus faible des cellules SW480 aux lupulones. Pour les cellules métastatiques SW620, les lupulones restaurent leur sensibilité à TRAIL ligand et activent la voie de mort extrinsèque via les récepteurs DR4/DR5 et l'implication spécifique de la cascade d'activation caspase-8/caspase-3. En effet, les lupulones induisent une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 à la surface de la mitochondrie, entraînant sa stabilité. Le fait que les lupulones soient capables d'activer la voie de signalisation TRAIL, même dans les cellules résistantes, montre le haut potentiel de ces molécules pour la thérapie et la prévention du cancer colorectal.

2. Introduction

TRAIL ligand est une molécule souvent étudié comme un agent anti-cancéreux, grâce à sa capacité d'induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses sans effets toxiques sur les cellules normales (Kelley et coll, 2001 ; Almasan et coll, 2003). TRAIL ligand induit l'apoptose en se liant à ses deux récepteurs de mort DR4 et DR5. L'activation de ces récepteurs entraînent la formation d'homo complexes ou d'hétéro complexes pour le recrutement et l'activation du domaine de mort associé à Fas (FADD), qui est suivi par l'activation de caspases initiatrices (caspases -8, -9 et -10) et de la caspase effectrice -3, responsable de l'apoptose (Kischkel et coll, 2000 ; Belyanskaya et coll, 2008).

Le processus d'apoptose implique deux voies de signalisations principales, une voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie et une voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort (Falschlehner et coll, 2007). De plus, une interconnexion existe entre ces deux voies. En effet, l'activation de la caspase-8 par les récepteurs de mort, peut activer directement la caspase-3 et peut cliver la protéine Bid, une protéine appartenant la famille des protéines Bcl-2. Bid tronquée va perturber la mitochondrie entraînant l'augmentation de l'expression de la protéine apoptotique Bax, la libération du cytochrome c dans le cytosol et l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3 (Sandra et coll, 2005 ; Shi et coll, 2008). La mitochondrie perturbée, peut également activer la production de stress oxydatif intracellulaire (ROS) pouvant causer des dommages à l'ADN ou à d'autres organites impliqués dans la mort cellulaire (Kim et coll, 2008b).

Afin de découvrir précisément, les mécanismes impliqués dans les effets pro apoptotiques, précédemment décrits, des lupulones, nous avons comparé les voies de signalisation induites par les lupulones, dans la lignée cellulaire colique humaine primaire SW480, sensible à TRAIL ligand et dans sa lignée métastatique dérivée SW620, résistante à TRAIL ligand.

3. Résultats : PUBLICATION n° 2

Lupulone, a hop bitter acid, activates different death pathways involving apoptotic TRAIL-receptors, in human colon tumor cells and in their derived metastatic cells.

V Lamy, S Roussi, M Chaabi, F Gossé, A Lobstein, F Raul.

Apoptosis 2008 ; 13 : 1232-1242

Lien électronique du site de l'éditeur :

<http://www.springerlink.com/content/g651g45g27p02515/fulltext.pdf>

4. Résultats complémentaires

4.1 Effets des lupulones sur l'expression des ARNm de DR4 et DR5

Les lupulones sont capables d'induire une augmentation de l'expression protéique des récepteurs de mort DR4 et DR5 pour la lignée cellulaire primaire SW480, sensible à TRAIL mais également pour la lignée métastatique SW620, résistante à TRAIL. L'expression des ARNm de chaque récepteur a été mesurée par QRT-PCR, afin de déterminer si les lupulones sont capables d'induire l'activation de leur transcription. Après une extraction totale de l'ARN, le kit High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) est utilisé pour la transformation d'1 µg d'ARN en ADNc et la mesure de chaque gène sélectionné est déterminé avec l'utilisation de TaqMan® Gene Expression assays (DR4, Hs00269492; DR5, Hs00366272; Applied Biosystems, Foster City, CA). La QRT-PCR est réalisée par la chimie Taqman®, avec le TaqMan® Universal PCR master mix et le logiciel de détection, ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems Sequence detector; Applied Biosystems, Foster City, USA). Les données sont analysées avec la méthode comparative de cycles seuil (C_T).

Les résultats obtenus sont représentés par la Figure 28. Une augmentation des transcrits DR4 et DR5 est observée uniquement pour les cellules SW620 de manière dépendante du temps. Les lupulones sont capables d'activer la transcription des gènes DR4 et DR5 uniquement pour les cellules métastatiques SW620. L'augmentation de l'expression protéique observée pour les cellules primaires SW480 est certainement due à des modifications post-transcriptionnelles.

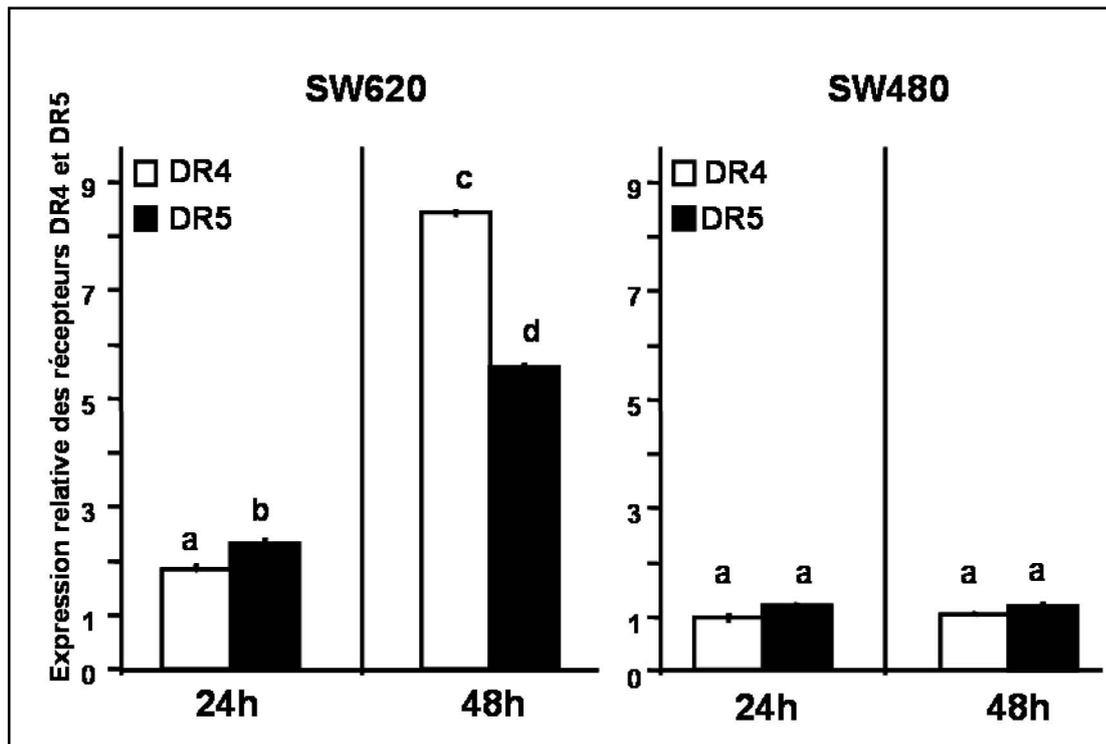


Figure 28: Analyse de l'expression relative des ARNm de DR4 et DR5 après traitement aux lupulones. Les histogrammes représentent les changements observés par rapport aux cellules non traitées. Les données sont calculées à l'aide de la méthode comparative des cycles seuils (Livak et Schmittgen, 2001) et correspondent à la moyenne de trois expériences distinctes \pm SE. Les colonnes ne portant pas les mêmes lettres diffèrent de manière significative : $a \neq b \neq c \neq d$, $P < 0.05$.

4.2. Détermination de l'expression des protéines Bcl2, Mcl-1 et Bax

Comme nous l'avons décrit précédemment, les protéines de la famille Bcl-2 sont d'importants régulateurs de la réponse apoptotique en assurant notamment le contrôle de la perméabilité mitochondriale et de la libération d'agents apoptotiques par celle-ci. La surexpression de la protéine Bax, proapoptotique est souvent liée à la disruption mitochondriale et à la libération du cytochrome c tandis que la surexpression des protéines Mcl-1 ou Bcl2, anti-apoptotiques, va conduire à une stabilisation de la membrane mitochondriale (Armstrong, 2006 ; Brunelle et Letai, 2009). Nous avons déterminé l'expression de ces trois protéines à la surface de la mitochondrie dans le but de comprendre l'implication de la mitochondrie dans la réponse apoptotique aux lupulones uniquement pour les cellules primaires SW480. L'expérience est réalisée selon le matériel et méthode décrit dans le chapitre 1. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux et les résultats sont représentés sur la Figure 29.

Les résultats observés pour les SW620 concernant les expressions de Bcl-2 et Bax sont en corrélation avec nos observations décrites dans le chapitre 1. En effet, les lupulones induisent une augmentation de l'expression de Bcl-2 et de Bax avec un ratio Bax/Bcl-2 égal à 1. Toutefois nous observons une augmentation significative de l'expression d'une autre protéine anti-apoptotique Mcl-1 de manière dépendante du temps (2,6% des cellules contrôle exprimant Mcl-1 contre 62% des cellules traitées aux lupulones à 62h). Chez les cellules SW480, les lupulones induisent une augmentation significative de la protéine Bax uniquement (2,5% des cellules contrôle exprimant Bax contre 31% des cellules traitées aux lupulones à 62h), entraînant la perturbation mitochondriale observée précédemment. Ces résultats suggèrent que la protéine anti-apoptotique Mcl-1 est un élément clé dans la stabilisation de la mitochondrie pour les cellules SW620, expliquant l'implication spécifique de celle-ci pour les cellules SW480.

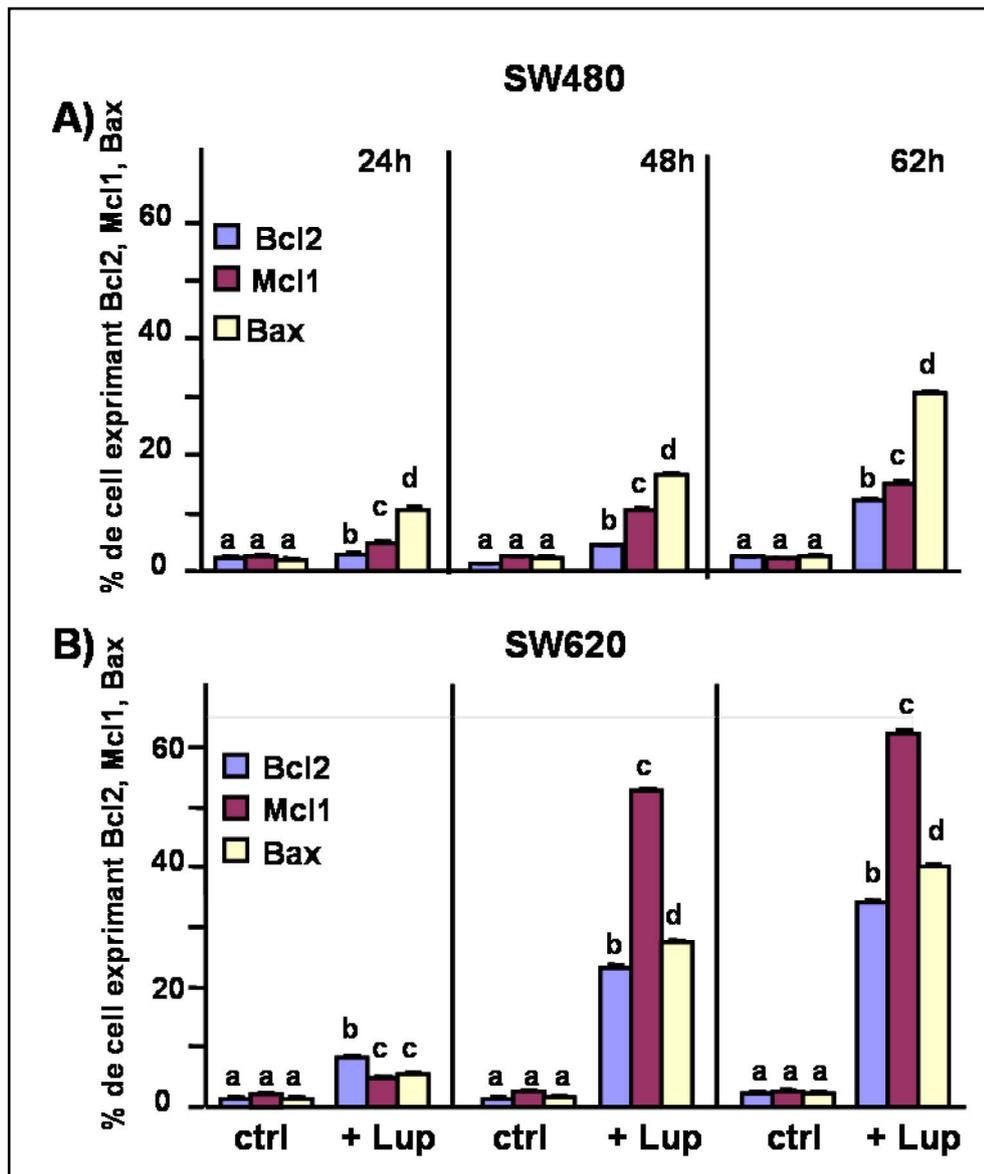


Figure 29: Expression des protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bax après traitement aux lupulones. L'augmentation de la fluorescence verte émise par le fluorochrome FITC est mesurée par cytométrie en flux et les histogrammes représentent le pourcentage de cellules exprimant Bcl-2, Mcl-1 ou Bax (A) pour les cellules SW480 et (B) pour les cellules SW620. Les données traduisent la moyenne des valeurs \pm SE de trois expériences différentes. A chaque période les colonnes ne portant pas les mêmes lettres diffèrent significativement entre elles : $a \neq b \neq c \neq d$, $P < 0.05$

4.3. Analyse de la fragmentation d'ADN induite par les lupulones

La fragmentation de l'ADN est l'étape finale caractéristique de l'apoptose. Bien que nous ayons montré une activation de la caspase-3 dans les deux lignées cellulaires SW480 et SW620, nous avons mesuré la fragmentation de l'ADN par la méthode du TUNEL afin de confirmer l'apoptose induite par les lupulones. Les fragments d'ADN sont détectés par le cytomètre en flux grâce à l'utilisation du kit TUNEL, Mebstain® Apoptosis Direct Kit (MBL International Corporation, Nagoya, Japan).

Les résultats obtenus sont représentés par la Figure 30. Les lupulones induisent une fragmentation de l'ADN après, 48 et 62h de traitement dans les deux lignées cellulaires. Toutefois une sensibilité plus grande des cellules SW620 est observée.

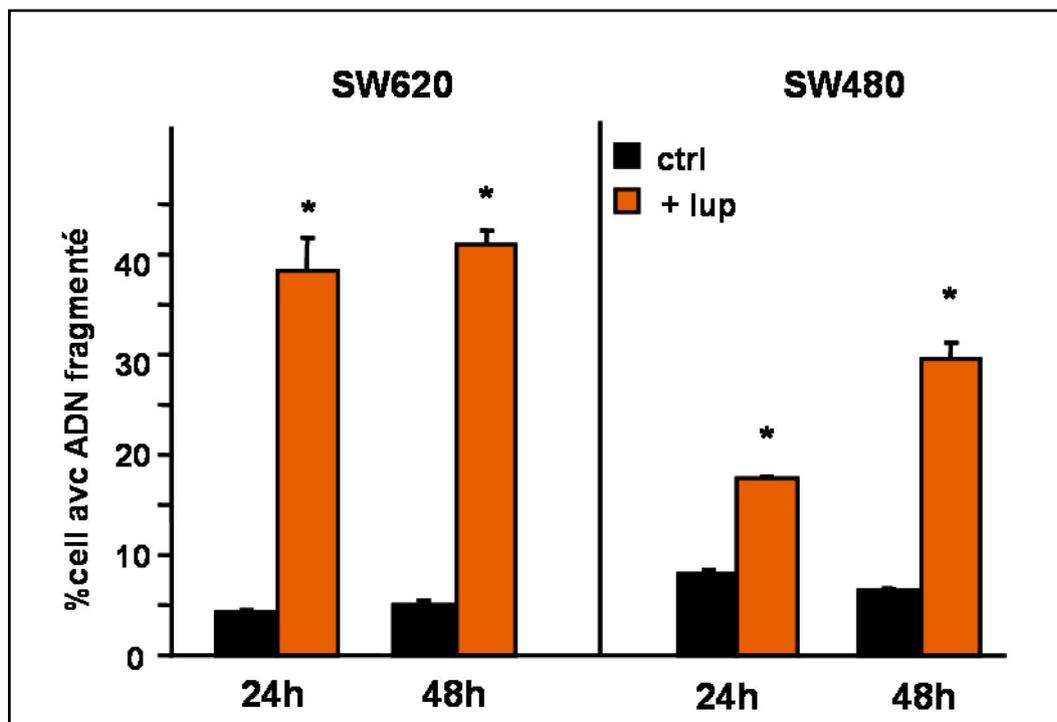


Figure 30: Induction de la fragmentation d'ADN par les lupulones

Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de cellules ayant de l'ADN fragmenté. Les histogrammes sont le résultat de la moyenne de trois expériences +/- SE. Un test de student est réalisé, contrôle versus traités : * $P < 0,05$.

4.4 Etude d'un membre de la famille des inhibiteurs naturels de l'apoptose IAP : XIAP

Les lupulones activent les voies extrinsèque et intrinsèque pour les cellules SW480 et uniquement la voie extrinsèque pour les cellules SW620. Pourtant, une plus grande sensibilité aux lupulones est observée pour les cellules SW620, de même qu'une activité de la caspase-3 pratiquement similaire pour les deux lignées. La protéine XIAP est un membre de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose, les IAPs et peut inhiber l'activité de la caspase-3 (Dubrez-Daloz et coll., 2008 ; Resch et coll., 2008). Nous avons mesuré la présence de la protéine XIAP dans la fraction cytosolique pour chaque lignée cellulaire, à l'aide du kit XIAP ELISA kit (Calbiochem, Merckbiosciences, Allemagne). Les résultats sont illustrés par la Figure 31.

Les lupulones induisent une augmentation de la protéine XIAP uniquement pour les cellules primaires SW480, en fonction du temps. Ces résultats suggèrent que dans les SW480, la protéine XIAP est activée en réponse aux lupulones et inhibe une partie des caspases-3 actives, expliquant la sensibilité plus faible de ces cellules en dépit de l'activation des deux voies intrinsèque et extrinsèque.

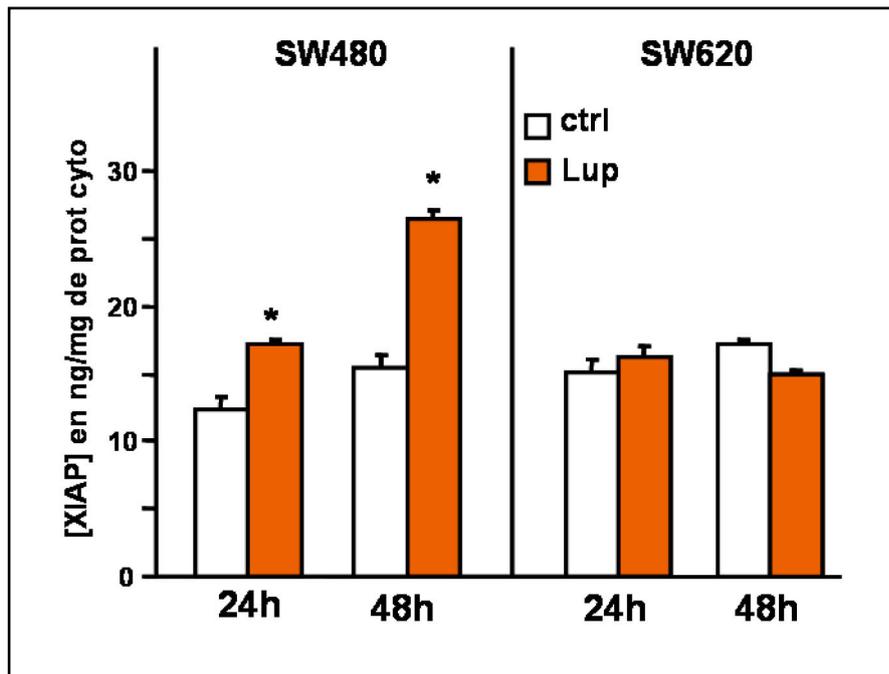


Figure 31: Détection de la protéine XIAP en présence de lupulones. Les cellules sont traitées avec du DMSO 0,1% +/- lupulones (40 μ g/ml) pendant 24 et 48h. La mesure de la protéine XIAP est réalisée par la méthode ELISA. Les données sont indiquées en concentration de XIAP en ng/mg de protéines cytosoliques totales. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs +/- SE de trois expériences différentes. Lupulones versus contrôle : * $P < 0,05$

5. Conclusion

Les lupulones sont capables d'induire l'apoptose, en activant l'expression des protéines des récepteurs de mort TRAIL, DR4 et DR5 à la surface des cellules. Cette activation a lieu aussi bien dans les lignées sensibles à TRAIL, les SW480 que dans les lignées résistantes à TRAIL, les SW620. Ces résultats démontrent le haut potentiel des lupulones comme agents anti-cancéreux contre le cancer du colon. Toutefois des différences sont observées dans les deux lignées, en effet cette activation semble être dépendante de la transcription dans les lignées métastatiques SW620 ce qui n'est pas le cas dans les cellules SW480. Notre prochain objectif sera donc, de découvrir quelles sont les voies activées par les lupulones à l'origine de la régulation des récepteurs DR4 et DR5.

Cette étude nous montre également l'implication spécifique de la mitochondrie dans la lignée SW480. Pourtant, une plus grande sensibilité aux lupulones est observée dans les cellules SW620. Afin de mieux comprendre ces différences, nous nous sommes également intéressé à l'expression des protéines de la famille Bcl-2, dont les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Mcl-1 permettent une stabilisation de la mitochondrie tandis que les protéines anti-apoptotiques comme Bax, Bam ou Bid entraînent une perturbation de la mitochondrie se traduisant par la libération du cytochrome c (Armstrong et coll., 2006 ; Fernandez-Luna, 2008). Nos résultats montrent que la protéine Mcl-1 est un facteur clé dans la stabilisation de la mitochondrie pour les cellules SW620, expliquant l'activation spécifique de la voie extrinsèque. La différence de sensibilité entre les deux lignées aux lupulones peut s'expliquer par l'augmentation spécifique pour les SW480 d'une protéine inhibitrice de la caspase-3, la protéine XIAP. Son activation inhibe une partie des caspases-3 actives, impliquant une mort cellulaire plus lente malgré l'activation des deux voies intrinsèque et extrinsèque.

En conclusion, cette étude démontre que les lupulones peuvent être considérés comme des agents anti-cancéreux prometteurs. Ils induisent l'apoptose en impliquant la voie de signalisation à TRAIL dans les cellules coliques humaines primaires SW480 (sensibles à TRAIL) mais également dans les cellules métastatiques dérivées SW620 (résistantes à TRAIL). Ces résultats démontrent l'importance de leur utilisation dans la prévention et la thérapie du cancer colorectal.

CHAPITRE 3

Rôles de la protéine p53 mutée et du facteur de transcription NF- κ B dans l'induction de la mort cellulaire par les lupulones.

1. Résumé

Nous avons montré précédemment que les lupulones induisent l'apoptose dans les deux lignées par une activation de la voie de signalisation des récepteurs de mort de TRAIL, DR4 et DR5. Le but de cette étude est de déterminer l'implication de deux facteurs importants dans la régulation de l'apoptose lors de cette induction pour les lignées SW480 et SW620. La protéine p53 est un facteur de transcription qui joue un rôle central dans la réponse à différents stress cellulaires notamment par une activation de la transcription de gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose. La lignée cellulaire cancéreuse colique primaire SW480 et sa lignée dérivée métastatique SW620 présentent les mêmes mutations de la protéine p53. Ces mutations ne semblent pas affecter l'habilité de p53 à se fixer sur l'ADN. Les lupulones augmentent l'expression de p53 dans les deux lignées cellulaires et induisent son activation. Nous avons observé que les lupulones entraînent une augmentation des transcrits de p53 uniquement pour les cellules SW620. L'augmentation de l'expression de p53 pour les cellules SW480 doit résulter de modifications post-transcriptionnelles. P53 présente une activité proapoptotique pour les cellules SW620 contrairement aux cellules SW480 où elle est anti-apoptotique et où les lupulones initient une translocation de p53 du noyau vers le cytoplasme. Une inhibition des fonctions de p53 induit une augmentation significative de la mort cellulaire et une séquestration de celle-ci dans le noyau. Il est donc possible que pour les SW480, p53 mutée soit capable de former des hétérocomplexes avec les protéines de la famille de Bcl-2 afin de les stabiliser et de protéger la mitochondrie et l'intégrité cellulaire. Un autre facteur important dans la régulation de l'apoptose est le facteur de transcription NF- κ B, qui joue un rôle important dans la survie cellulaire et l'initiation de la réaction inflammatoire. Nous avons observé que les lupulones induisent une translocation dans le noyau de NF- κ B uniquement dans les cellules SW620. Pour ces dernières, une inhibition de NF- κ B induit une nette augmentation de la mort cellulaire, montrant que les cellules actives, en parallèle à l'initiation de la voie extrinsèque, une réponse de survie cellulaire.

2. Introduction

La protéine p53 a un rôle central dans la réponse de nombreux stress cellulaires incluant par exemple les dommages à l'ADN. L'activation de p53 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou encore l'apoptose (Meek, 1999). Cette protéine peut interagir comme un facteur de transcription et peut réguler celle de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose (Laptenko et Prives, 2006). De plus il a été récemment démontré que p53 est également capable de moduler la voie intrinsèque ou mitochondriale par des interactions avec les membres de la famille de Bcl-2 (Wolff et coll, 2008).

La plupart des cancers, comme le cancer colorectal, ont développé des mutations au niveau des gènes de p53, induisant des fonctions altérées de la protéine. La lignée cancéreuse colique humaine SW480 est dérivée d'un adénocarcinome primaire du colon obtenu d'un patient caucasien d'environ 50 ans et la lignée métastatique SW620 est dérivée de métastases situées au niveau d'un ganglion lymphatique du même patient. De ce fait, ces deux lignées représentent un modèle de la progression du cancer colorectal *in vitro* intéressant (Hewitt et coll, 2000). Les deux lignées présentent des mutations du gène de p53 avec une guanosine à la place d'une adénosine sur le codon 273 et une cytosine à la place d'une thymidine sur le codon 309 entraînant une substitution d'une arginine en histidine et d'une proline en serine sur la protéine p53 (Huerta et coll, 2007). En dépit de ces mutations et en fonction de la nature du stress cellulaire, p53 peut garder sa capacité à induire les mécanismes de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'apoptose (Rochette et coll, 2005).

Le facteur de transcription NF- κ B est également un facteur majeur dans la régulation de l'apoptose. En effet, il joue un rôle central notamment dans la survie cellulaire et l'initiation de la réaction inflammatoire. Il peut réguler l'expression de protéines anti-apoptotiques comme les protéines de la famille Bcl-2 tels que Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 (Sethi et coll., 2008). Il a également été démontré que les protéines de la famille des inhibiteurs naturels de l'apoptose comme la protéine XIAP ou les cIAP 1 et 2 modulent et sont modulées par l'activation du facteur NF- κ B pour engendrer les voies de signalisation de survie cellulaire (Gyrd-Hansen et coll., 2008 ; Mattson et Meffert, 2006). La famille NF- κ B est composée de 5 membres ; p50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel. Tous ces membres contiennent un domaine homologue Rel (RHD), sur lequel se trouve le signal de localisation nucléaire (NLS). Ce même domaine est impliqué dans la fixation de NF- κ B à l'ADN et à la

fixation de sa protéine inhibitrice I κ B dans les cellules normales. La famille I κ B est composée de 7 membres ; I κ B- α / β / γ / ϵ / ζ , I κ BNS et Bcl-3. Trois d'entre eux, I κ B- ζ , I κ BNS et Bcl-3 sont localisés dans le noyau et régule la transcription en inhibant NF- κ B dans le noyau. Les autres sont cytosoliques et forment un complexe avec NF- κ B empêchant sa translocation dans le noyau (Inoue et coll., 2007). Un signal de stress peut entraîner la dissociation du complexe NF- κ B avec I κ B et induire l'activation et la translocation de NF- κ B dans le noyau et donc l'activation de voies de survie cellulaire ainsi qu'une réponse inflammatoire.

Les lupulones, acides amers du houblon (*Humulus lupulus L.*) sont une mixture d'isomères *n-*, *co-* et *ad-*lupulones. Nous avons démontré précédemment que les lupulones induisent l'apoptose dans les lignées SW480 et SW620 par l'activation de la voie de signalisation des récepteurs de mort cellulaire à TRAIL. Chez les cellules SW480, les lupulones induisent une connexion entre les voies extrinsèque et intrinsèque, impliquant l'altération de la mitochondrie. Dans les cellules métastatiques SW620, les lupulones initient l'apoptose par une activation de la voie extrinsèque uniquement.

Afin de pouvoir mieux comprendre les mécanismes moléculaires activés par les lupulones en particulier pour les cellules SW620 résistantes à TRAIL et l'implication spécifique de la mitochondrie chez les SW480, nous avons évalué dans un premier temps les effets des lupulones sur la transcription et l'expression de la protéine p53 dans les deux lignées. En effet, l'activation de p53 peut réguler la transcription des gènes de DR4, DR5 et/ou des membres de la famille de Bcl-2 comme Bcl-2 ou Bax. De plus, par des mécanismes indépendants de la transcription, p53 peut être transférée du noyau vers la mitochondrie, où elle peut interagir avec Bax, Bcl-2 et induire la libération du cytochrome c (Mihara et coll, 2003).

Dans un deuxième temps nous avons également évalué les effets des lupulones sur l'activation et la translocation dans le noyau du facteur de survie NF- κ B dans les deux lignées. Son initiation pourrait moduler des facteurs anti-apoptotiques et entraîner une réponse de survie aux lupulones dans les deux lignées.

3. Résultats : PUBLICATION n° 3

Opposite role of mutated p53 in lupulone-treated primary human colon cancer cells and their derived metastatic cells

Lamy V, Bousserouel S, Gossé F, Minker C, Lobstein A, Raul F.

Cell Proliferation (article en révision)

Opposite role of mutated p53 in lupulone-treated primary human colon cancer cells and their derived metastatic cells

V. Lamy^{1,2}, S. Boussarouel^{1,2}, F. Gossé^{1,2}, C. Minker³, A. Lobstein³ and F. Raul^{1,2}

1 University of Strasbourg, Unit of Pathophysiology and Translational Research, Faculty of Medicine, Strasbourg (France)

2 Institut de Recherche contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD), Laboratory of Nutritional Cancer Prevention, Strasbourg, (France)

3 CNRS UMR7081, University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch (France)

Correspondence:

Dr F. Raul

Laboratory of Nutritional Cancer Prevention,
IRCAD

1, Place de l'hôpital

67091 Strasbourg-Cedex, France

Tel: +33 (0)3 88 11 90 23

Fax: +33 (0)3 88 11 90 97

E-mail: francis.raul@ircad.u-strasbg.fr

Abstract

Introduction/objectives: The p53 protein plays a central role in response to different cellular stresses by up-regulating the transcription of several implicated in the control of apoptosis. The SW480 cell line is derived from a human colon adenocarcinoma and the SW620 cell line from a lymph node metastasis of the same patient. Both cell lines exhibit the same p53 mutations which do not affect p53 DNA binding ability. Here, we aimed to compare the involvement of mutated-p53 protein on lupulone-triggered apoptosis.

Methods and results: We used flow cytometry analyses, Western blotting and real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction studies. Up-regulation and activation of p53 protein by lupulone was observed in both cell lines. However, lupulone-treated SW620 cells exhibited an important up-regulation of p53 transcripts and such an effect was not observed for SW480 cells where the increase of p53 expression resulted from a post-transcriptional regulation. In SW620 cells treated with lupulone, p53 showed pro-apoptotic activity. In SW480 cells, lupulone initiated a translocation of p53 from nucleus to cytoplasm. The inhibition of p53 functions by pifithrin in these cells induced a significant increase of cell death after lupulone treatment, a sequestration of p53 in the nucleus and the drop of mitochondrial anti-apoptotic Bcl-2 and Mcl-1 protein expression.

Conclusions: Our data suggest that p53 plays a pro-apoptotic role in the metastatic SW620 cells. On the opposite in SW480 cells, p53 seems to favour cell survival. This report support different functions of mutated p53 in cancer cells depending on cell type and death signals.

Introduction

The p53 protein plays a central role in response to a wide range of cellular stresses including DNA damage. Activated p53 leads to cell cycle arrest, cell senescence or apoptosis [1]. This protein can interact like a transcriptional factor and up-regulate the transcription of several genes implicated in the control of cell proliferation or apoptosis [2]. However, it was recently reported that p53 protein was also able to modulate the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway via interactions with members of the Bcl-2 family [3,4].

Most human cancers, including colon cancer, exhibit mutations of the p53 gene and altered protein function. The SW480 cell line is derived from a primary colon adenocarcinoma obtained from a 50-y-old Caucasian male, and the SW620 cell line from a lymph node metastasis of the same patient. Therefore, these two related cell lines represent an interesting *in vitro* model of the progression of colon cancer from a primary tumour to its metastatic spreading [5]. Both cell lines exhibit a mutated p53 gene with a guanosine to an adenosine mutation at codon 273 and a cytosine to thymidine mutation at codon 309 resulting respectively in arginine to histidine and in a proline to serine substitution in the p53 protein [6]. It was reported that despite these mutations and depending on the cellular stress, p53 protein may retain its ability to induce DNA repair mechanisms, cell cycle arrest and apoptosis [7,8].

Lupulone, a bitter acid of hops (*Humulus lupulus L.*) consists of a mixture of the isomers *n*-, *co*- and *ad*-lupulones. We have previously shown that lupulone induces apoptosis in SW480 and SW620 cells by activating TRAIL death receptor signaling pathways. In SW480 cells, lupulone induced a cross-talk between the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways involving mitochondria alterations. In the metastatic SW620 cells, lupulone induced an activation of the extrinsic apoptotic pathway *via* TRAIL death-receptor activation [9]. In order

to gain more insight into the molecular mechanisms triggered by lupulone, particularly in TRAIL-resistant SW620 cells and in the mitochondria implication observed only in SW480 cells, we aimed to investigate the effects of lupulone on p53 mRNA and protein expression in both cell lines. Indeed, activation of p53 may regulate DR4, DR5 TRAIL-death receptor and/or Bcl-2 family member expression like Bcl-2 or Bax. Moreover, by transcription-independent mechanisms, p53 protein may be translocated into the mitochondria, where it may interact with Bax, Bcl-2 or Bcl-X_L and induce the release of cytochrome c [10,11]. In the present report we demonstrate that p53 involvement in lupulone-induced apoptosis was the opposite in SW480 cells *versus* SW620 cells. Our data support the view that the role of mutated p53 protein should be interpreted very cautiously and was dependent on the cancer cell type and the nature of the cellular stress [3].

Materials and methods

Materials

Lupulone was obtained from an industrial by-product (Brasseries Kronenbourg, Strasbourg, France) and was isolated following the procedure described previously [12]. RT-PCR was performed by using different kits; RNeasy Mini kit, High-Capacity cDNA Archive kit, TaqMan Gene expression for primer of p53, TaqMan Universal PCR master mix and ABI Prism 7500 Sequence Detection System, which were obtained from Applied Biosystems (Foster City, USA). Primary antibodies to p53, DR4 and DR5 were obtained from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland); primary antibodies to phospho-p53 (Ser 15) and phospho-p53 (Ser 492) were obtained from Abcam (Paris, France); antibody to p53 conjugated-FITC, used for p53 detection by flow cytometry, and the p53 chemical inhibitor pifithrin- α were obtained from Calbiochem, Merck Chemicals (Darmstadt, Germany);

antibodies to Bcl-2 conjugated-FITC, primary antibodies to Mcl-1 and Bax were obtained from BD Biosciences (Erembodegem, Belgium).

Cell culture

SW480 and SW620 cells were obtained from the European Collection of Animals Cell Culture (Salisbury, UK). They were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 25 mM glucose and supplemented with 10 % heat-inactivated (56°C) horse serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 % non-essential amino acids (Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France) and kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. For experiments, after trypsinization (0.5 % trypsin/2.6 mM ethylenediamine tetraacetic acid), cells were seeded at 1×10^6 cells in culture dishes (100 mm internal diameter). The culture medium was DMEM supplemented with 3% heat-inactivated horse serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 10 µg/ml insulin and 1 % non-essential amino acids (Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France).

Analysis of p53 mRNA level by RT-PCR

To determine expression of p53 mRNA, an extraction of total RNA and analysis by RT-PCR were performed. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, VWR, Copenhagen, Denmark) following manufacturer's instructions. The High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) was used to reverse transcribe RNA (1 µg) in 20 µl of reaction mix and the measurements of the transcription levels of the selected genes were performed with TaqMan Gene Expression assays (protein p53, Hs00153349; Applied Biosystems, Foster City, USA). Actin beta was assigned as an endogenous control (cat n° Hs99999903; Applied Biosystems, Foster City, USA). Real time RT-PCR was

performed with TapMan Universal PCR master mix and ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems Sequence detector; Applied Biosystems, Foster City, USA) in triplicate wells. The data were analyzed with a comparative threshold cycle (ΔC_T) method. This method consist to determine the values of Δ cycle threshold (ΔC_t) by normalizing the average Ct value of each treatment with value of each opposite endogenous control (β -actin). Then, calculation of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ of each treatment and statistical analysis were performed as described by Livak and Schmittgen [13].

Detection of p53 expression in cells by flow cytometry

Cells were treated with lupulone (40 μ g/ml) and harvested by trypsinization at 24 and 48 h. Cell pellets were washed with phosphate saline buffer (PBS) and were fixed with a solution of PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) during 1h at 4°C in the dark. Cell pellets were washed with a solution of PBS/BSA 0,2 % / Tween 0,5 % and were incubated with FITC-conjugated mouse anti-human p53 antibody (Calbiochem; Merck Chemicals, France) or FITC-conjugated mouse IgG1 monoclonal isotype control antibody (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 1 h at 4°C in the dark. After washing with the solution of PBS / BSA 0,2 % / Tween 0,5 %, cells were re-suspended in PBS (37°C) and the fluorescence (515 nm) of 10.000 events per sample were analyzed by FACScan and CellQuest Software (BD Biosciences, Belgium).

Detection of p53 protein expression by Western blotting

Cells (8×10^6) were treated with PFT- α (30 μ M) and/or lupulone (40 μ g/mL) and harvested at 24 and 48 h. Nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions were isolated from cells using the Nuclear Extract Kit and Mitochondrial Fractionation Kit (ActiveMotif Europe, Rixensart,

Belgium), and the protein content of each fraction, was measured with the Lowry method. Western blotting analysis was performed as previously described [9] with a protein load of 50 μg .

Cell death analysis after p53 inhibition

SW480 or SW620 cells (1×10^6) were seeded in culture dishes and pre-treated with a p53 inhibitor, pifithrin- α (30 μM) (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) 1 h before lupulone treatment (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were harvested by trypsinization at 24 and 48 h, washed with PBS, centrifuged and fixed with 1ml methanol:PBS (9:1 v/v) during 1-3 h at -20°C . Cells were washed twice in PBS and re-suspended in 200 μl PBS containing 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A and 0,1 mg/ml propidium iodide (Sigma Aldrich, Munchen, Germany). After incubation in the dark at 37°C for 30 min, the fluorescence of cells (10.000 events) was analyzed by flow cytometry and CellQuest software (FACScan, BDBiosciences, Erembodegem, Belgium).

Expression of TRAIL receptors DR4 and DR5 after p53 inhibition

Cells were pre-treated 1 h with pifithrin- α at 30 μM and treated with lupulone (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 and 48 h. After trypsinization, cell pellets were washed with PBS and incubated with monoclonal mouse anti-human antibodies TRAIL-R1 (DR4) (1:100) or TRAIL-R2 (DR5) (1:100) (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) for 30 min at 4°C . Cells were washed twice with PBS and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody (1:50) (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany) or with FITC-conjugated mouse IgG1 monoclonal isotype control antibody (1:50) (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 30 min at 4°C in the dark. After washing with PBS, cells were re-suspended in PBS and the fluorescence of 10.000 events per sample (515 nm) was analysed by FACScan and CellQuest software (FACScan, BDBiosciences, Erembodegem, Belgium).

Expression of Bcl-2, Mcl-1 and Bax proteins after p53 inhibition

SW480 cells were pre-treated 1 h with pifithrin- α at 30 μ M and treated with lupulone (40 μ g/ml) for 24 and 48 h. Cells were harvested by trypsinization and proceeded for the fixation (PBS/PFA 4%) and permeabilization (PBS/BSA 0,2 % / Tween 0,5 %) step. For Bcl-2 protein detection, cells were labelled directly with 20 μ l FITC-conjugated mouse anti-human Bcl-2 monoclonal antibody or FITC-conjugated mouse IgG1 monoclonal Isotype control antibody (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 30 min at 4°C in the dark. For Mcl-1 and Bax detection, cells were incubated with rabbit anti-human Bax polyclonal antibody or rabbit anti-human Mcl-1 polyclonal antibody (1:100) (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 30 min at 4°C. After washing twice, FITC-conjugated swine anti-rabbit F(ab')₂/FITC antibody was added (1:10) (Abcam, Paris, France) for 30 min at 4°C in the dark. After washing twice in permeabilization buffer, the fluorescence of 10,000 cells were analysed using FACScan flow cytometer and CellQuest software (FACScan, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

Statistical analysis

All data were presented as mean \pm standard error (SE) from three independent experiments. Significant differences between control and treated groups were evaluated by one-way ANOVA analysis, Student's t-test or the Student-Neuman-Keuls multiple comparison test was used to determine the significance of statistical differences between data.

Results

Expression of p53 mRNA and protein after lupulone treatment

We reported previously that lupulone activated apoptosis in SW480 and SW620 cells through TRAIL death receptor signaling pathways, with a specific activation of the intrinsic mitochondrial pathway in SW480 cells [9]. In order to gain more insight into these processes p53 mRNA and protein expressions were assessed using real time PCR and flow cytometry.

The p53 mRNA expression increased significantly in SW620 cells after lupulone treatment in a time-dependent manner: a 2 fold increase in the amount of p53 mRNA was observed at 24 h and reached 7 fold at 48 h relative to untreated control cells (Fig. 1A). In lupulone-treated SW480 cells, the amount of p53 transcripts was significantly lower when compared with the level detected in SW620 cells and increased only marginally with time during lupulone treatment. However, a time-dependent increase of p53 protein expression was observed after lupulone treatment in both SW620 and SW480 cell lines (Fig. 1B). These data suggested that in SW620 cells, p53 expression was regulated at the transcriptional level, whereas in SW480 cells the increase of p53 expression did not result from an up-regulation of p53 gene transcription, but to post-transcriptional events. Nevertheless, it was clear that in both cell lines, lupulone was able to significantly enhance p53 protein expression.

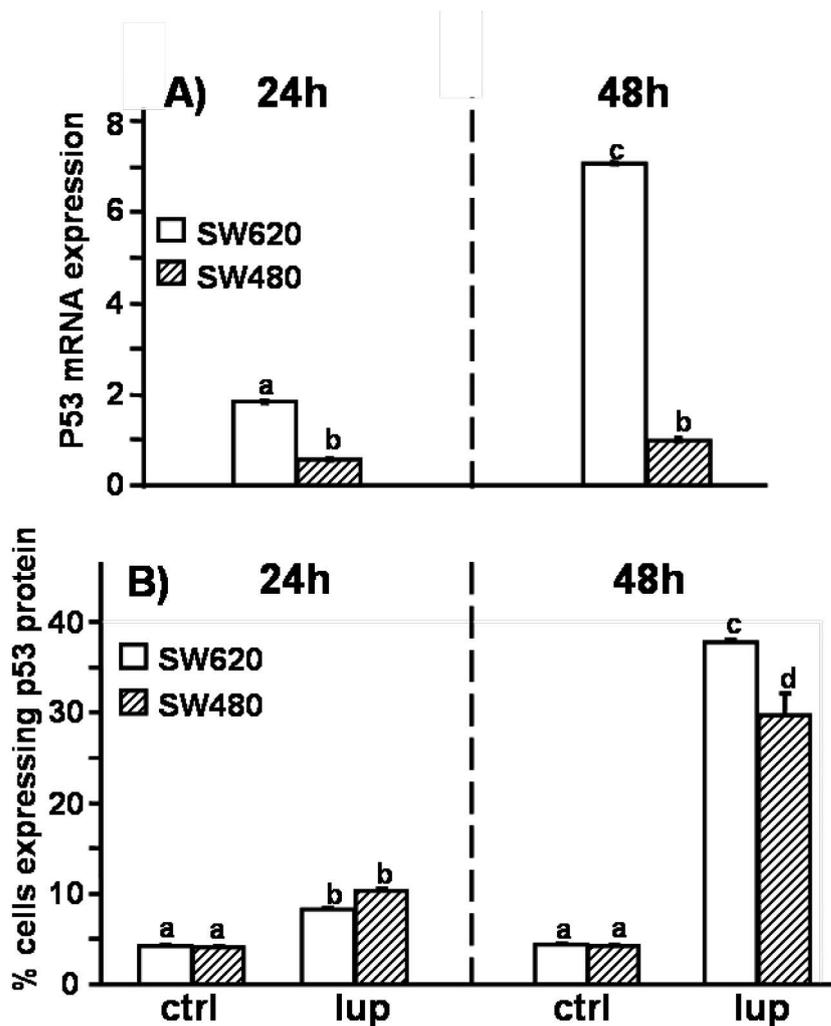


Figure 1. Expression of p53 mRNA and protein in SW480 and SW620 cells. Cells were treated with DMSO 0.1% +/- lupulone (40 μ g/ml) for 24 and 48 h. (A) Real-time quantitative measurement of p53 mRNA levels represented as the fold change over untreated cells. Data are calculated with the comparative cycle threshold method [13] and correspond to the mean value \pm SE, $n = 3$. Columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c$ $P < 0.05$. (B) Determination of p53 protein expression by flow cytometry. At each time point, cells were harvested and stained with FITC-conjugated anti-human p53 antibody. Increased green fluorescence was measured by flow cytometry and data are represented by histograms as the percent of cells expressing p53 protein. Data are the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. Columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c \neq d$ $P < 0.05$.

Activation of the p53 protein after lupulone treatment

Active p53 proteins are characterized by phosphorylation at specific sites like at serine-15 or serine-392 [14, 15]. Using Western blotting, we measured the amount of total p53 proteins and phosphorylated p53 proteins at serine-15 and serine-392 after 24 and 48h of lupulone treatment (Fig. 2).

In both cell lines, we observed a strong increase of the phosphorylated p53 protein at ser-392 in time-dependent manner as well as an increase in the amount of total p53 proteins (Fig. 2). Concerning the phosphorylated p53 protein at serine-15, lupulone induced an important increase after 48h of treatment in SW620 cells while this increase was weaker in SW480 cells. These results showed that lupulone enhanced p53 protein expression and induced its activation after 24h of lupulone treatment.

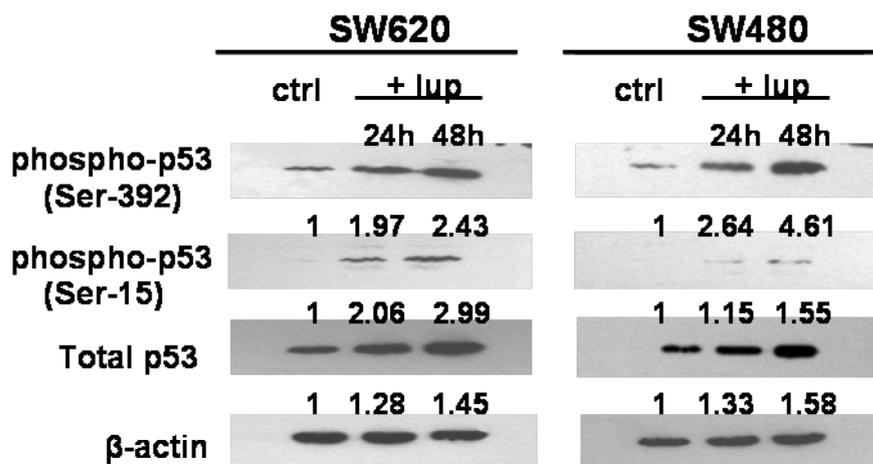


Figure 2. Effect of lupulone on the protein levels of total p53 and of phosphorylated (phospho-)p53. The amount of total p53 protein, phospho-p53 (Ser-392) and phospho-p53 (Ser-15), was analyzed by Western blotting and corresponded to a band of 53 kD. β-actin was used as an internal control. Determination of p53 protein amounts was assessed after protein extraction from SW620 and SW480 cells after 24 and 48h of lupulone treatment. Data are representative of at least three independent experiments. The numbers at the bottom of each lane indicate the fold increase relative to the untreated control.

Intracellular localization of the p53 protein in SW480 and SW620 cells

Drugs may cause a stress signal which favour the activation and the translocation of p53 from nucleus to cytosol and mitochondria by transcription-independent mechanisms, and cause mitochondrial perturbations leading to the release of cytochrome c [4]. Using Western blotting, we compared the amount of p53 present in nucleus, cytosol and mitochondria after lupulone treatment (Fig. 3).

We observed that after 48 h of lupulone treatment, the amount of p53 was increased in the nucleus of both cell lines (Fig. 3A). In lupulone-treated SW480 cells, an accumulation of p53 in the cytosol and mitochondria was observed, such effects were not found in the SW620 cells where p53 was retained in the nucleus (Fig. 3B, C). These data indicate that in SW480 cells but not in SW620 cells, lupulone treatment favoured a translocation of p53 protein from nucleus to the cytoplasm.

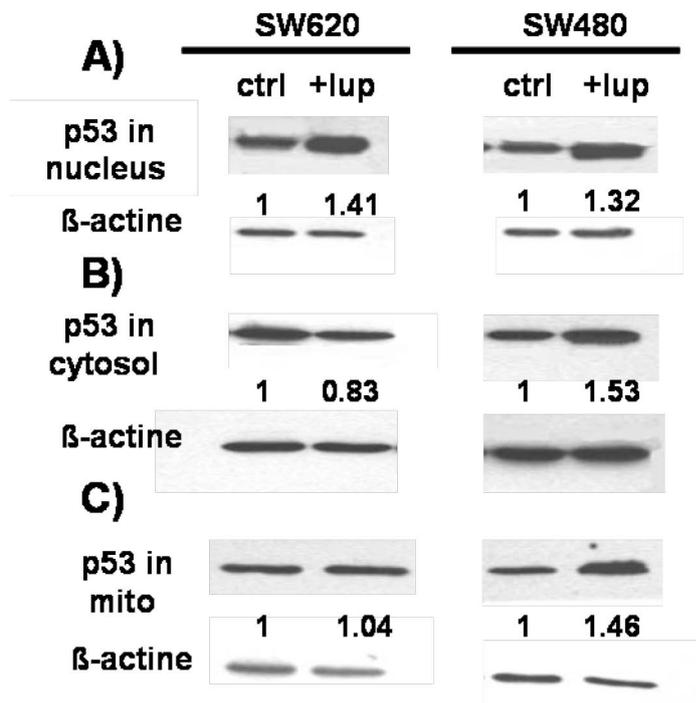


Figure 3. Intracellular localization of p53 protein in SW480 and SW620 cells. The amount of p53 protein was analyzed by Western blotting and corresponded to a band of 53 kD. β -actin was used as an internal control. Determination of amount of p53 protein was measured in (A) the nucleus fraction, (B) the cytosolic fraction, and (C) in the mitochondria fraction of SW620 and SW480 cells after 48 h of lupulone treatment. Data are representative of at least three independent experiments. The numbers at the bottom of each lane indicate the fold increase relative to the untreated control.

Effect of p53 inhibition on SW480 and SW620 cell death

In order to determine the role of p53 in lupulone-triggered apoptosis, cells were treated with pifithrin- α (PFT- α , 30 μ M), a reversible inhibitor of p53-responsive genes which blocks p53-mediated apoptosis [16,17]. Cells were exposed to the inhibitor 1 h before lupulone (40 μ g/ml) treatment. The amount of dead or dying hypodiploid cells were determined with propidium iodide by flow cytometry, and these cells were detected in the Sub G0/G1 region [18,19].

In SW620 cells, PFT- α caused a slight but significant ($P < 0.05$) diminution of cell death after lupulone treatment (Fig. 4). Surprisingly, in lupulone-treated SW480 cells exposed to the p53 inhibitor a huge increase in the amount of hypodiploid cells was observed. Indeed, after 48 h of treatment with lupulone + PFT- α the percentage of cells in the SubG0/G1 region was increased by +40% relative to SW480 cells treated with lupulone used as a single drug (Fig. 4). Our data strongly suggest that p53 may act like an anti-apoptotic factor in lupulone-treated SW480 cells, and such an effect was not observed in the metastatic SW620 cells.

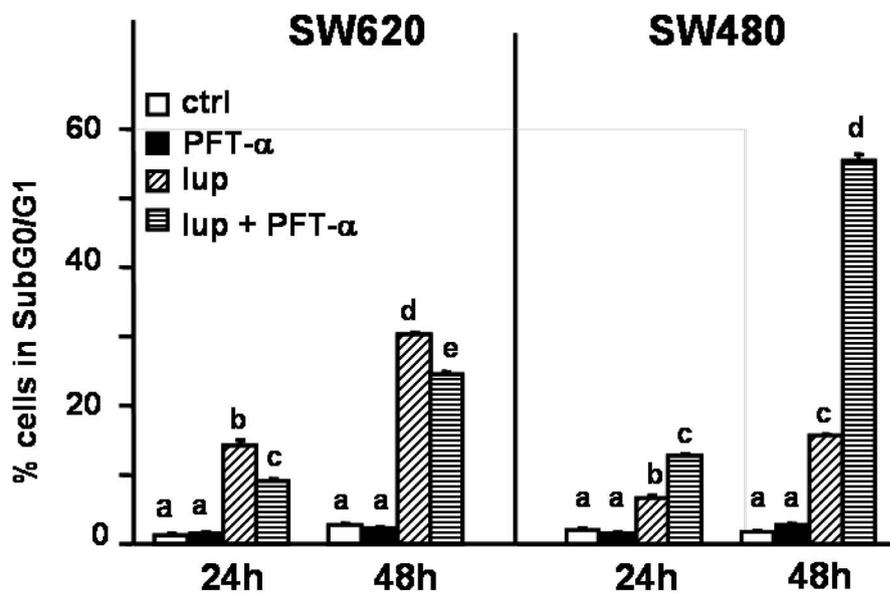


Figure 4. Effect of p53 inhibition on cellular death. Cells were pre-treated with p53 inhibitor, pifithrin- α (PFT- α , 30 μ M), 1 h before lupulone treatment (40 μ g/ml) for 24 and 48 h. At each time point, cells were harvested, stained with propidium iodide and analysed by flow cytometry. The percentage of hypodiploid cells present in the subG0/G1 region is represented as histograms and corresponds to the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. For each cell line, columns not sharing the same superscript letter differ significantly, $a \neq b \neq c \neq d \neq e$ $P < 0.05$.

PFT- α prevented p53 translocation in SW480 cells

PFT- α is an inhibitor of p53 transcriptional activity and has been reported to block p53 translocation from nucleus to cytosol through a transcription-independent manner [20]. Using western blotting, we compared the amount of p53 present in nucleus and cytosol, after pre-treatment with PFT- α (30 μ M) in lupulone-treated SW480 cells.

PFT- α induced an accumulation of p53 in the nucleus of lupulone-treated cells associated with a reduced amount of p53 in the cytosolic fraction (Fig. 5A). These data demonstrated that PFT- α prevented the translocation of p53 from nucleus to cytosol in lupulone-treated SW480 cells.

Effect of p53 inhibition on the expression of Bcl-2 family members in SW480 cells

It has been reported that, by a transcription-independent manner and after translocation from nucleus to the cytosol or mitochondria, p53 can form heterocomplexes with Bcl-2 or Mcl-1 leading to the activation of Bax, inducing mitochondria disruption [4,10]. Using flow cytometry, Bcl-2, Mcl-1 and Bax expression were measured after p53 inhibition by PFT- α in lupulone-treated SW480 cells (Fig. 5B).

We observed that lupulone treatment induced a significant increase of Bax protein in a time-dependent manner, leading to the disruption of mitochondria observed previously [9]. P53 inhibition induced an increase of Bax protein and a diminution of Bcl-2 and Mcl-1 expression (10% of cells expressing Bcl-2 after lupulone vs 5% after PFT- α ; 13% of cells expressing Mcl-1 after lupulone vs 6% after PFT- α and 30% of cells expressing Bax after lupulone vs 45% after PFT- α) (Fig. 5 B). These results suggested that in SW480 cells, mutated p53 might interact with Bcl-2 and Mcl-1 in order to protect mitochondria.

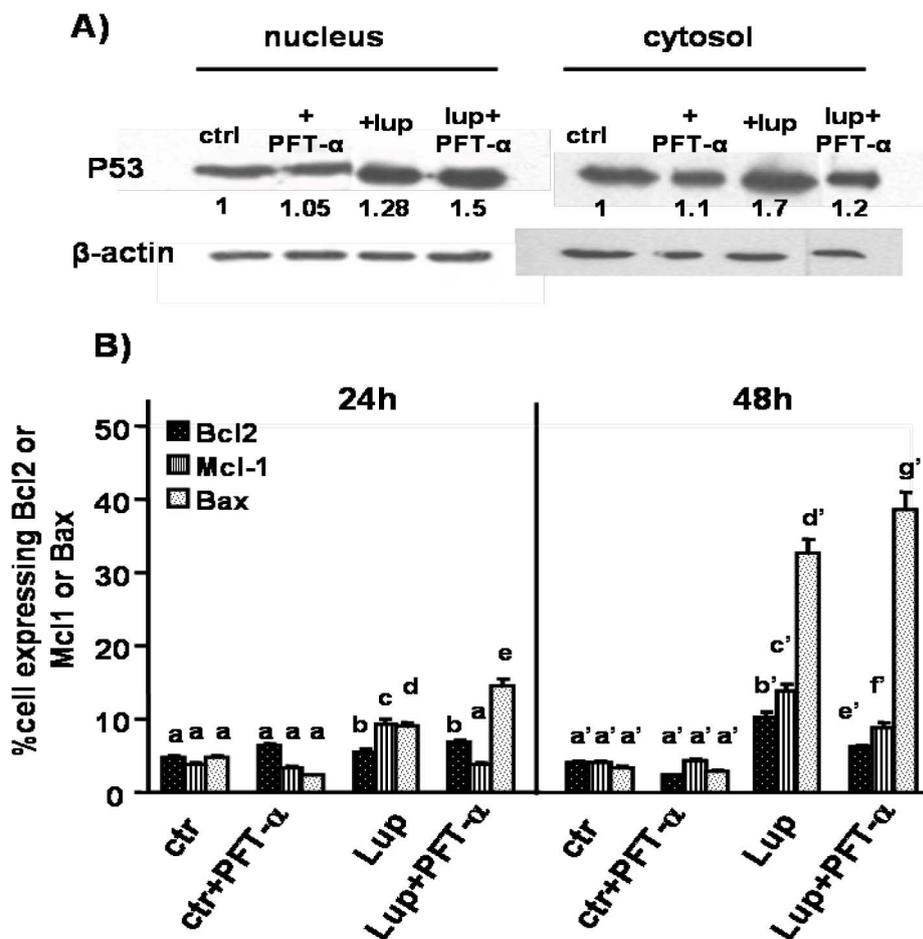


Figure 5. Effect of PFT- α on p53 translocation and Bcl-2, Mcl-1, Bax expression in SW480 cells. Cells were pre-treated with p53 inhibitor, pifithrin- α (PFT- α , 30 μ M), 1 h before lupulone treatment (40 μ g/ml) for 24 and 48 h. (A) inhibition of p53 translocation by PFT- α . The amount of p53 protein was analyzed by Western blotting and corresponded to a band of 53 kD. β -actin was used as an internal control. The amount of p53 protein was determined, in the nucleus fraction and in the cytosolic fraction of SW480 cells after lupulone treatment for 48h. Data are representative of at least three independent experiments. The number at the bottom of each lane indicates the fold increase relative to the untreated control. (B) Expression of Bcl-2, Mcl-1 and Bax proteins. At each time point, cells were harvested, fixed and permeabilized. After washing, cells were incubated with appropriate antibody (see Material and methods). Increased green fluorescence was measured by flow cytometry and data are represented by histograms as the percentage of cells expressing Bcl-2, Mcl-1 or Bax proteins. Data are the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. At each time period (24 or 48 h) columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c \neq d \neq e$ or $a' \neq b' \neq c' \neq d' \neq e' \neq f' \neq g'$ $P < 0.05$.

Regulation of TRAIL death receptors expression by p53

DR4 and DR5 expression were measured at the surface of cell membrane after inhibition of p53 functions by PFT- α in lupulone-treated SW620 and SW480 cells. Up-regulation of TRAIL-death receptors by p53 and more specifically of DR5 expression has been reported during the activation of apoptosis [21, 22].

In lupulone-treated SW620 cells, p53 inhibition by PFT- α caused a significant reduction of DR5 receptor expression, DR4 expression was only slightly affected (Fig. 6A). These data suggested that in SW620 cells p53 seemed to act as a pro-apoptotic regulator by enhancing DR5 expression in response to lupulone treatment. Moreover, the specific regulation of DR5 expression by p53 without affecting DR4 death receptor may explain the limited decrease of cell death observed after p53 inhibition. On the contrary in lupulone-treated SW480 cells, the inhibition of p53 induced a slight but significant increase of both DR4 and DR5 expression (Fig. 6B). These data also support the view that in SW480 cells p53 may play the role of an anti-apoptotic factor.

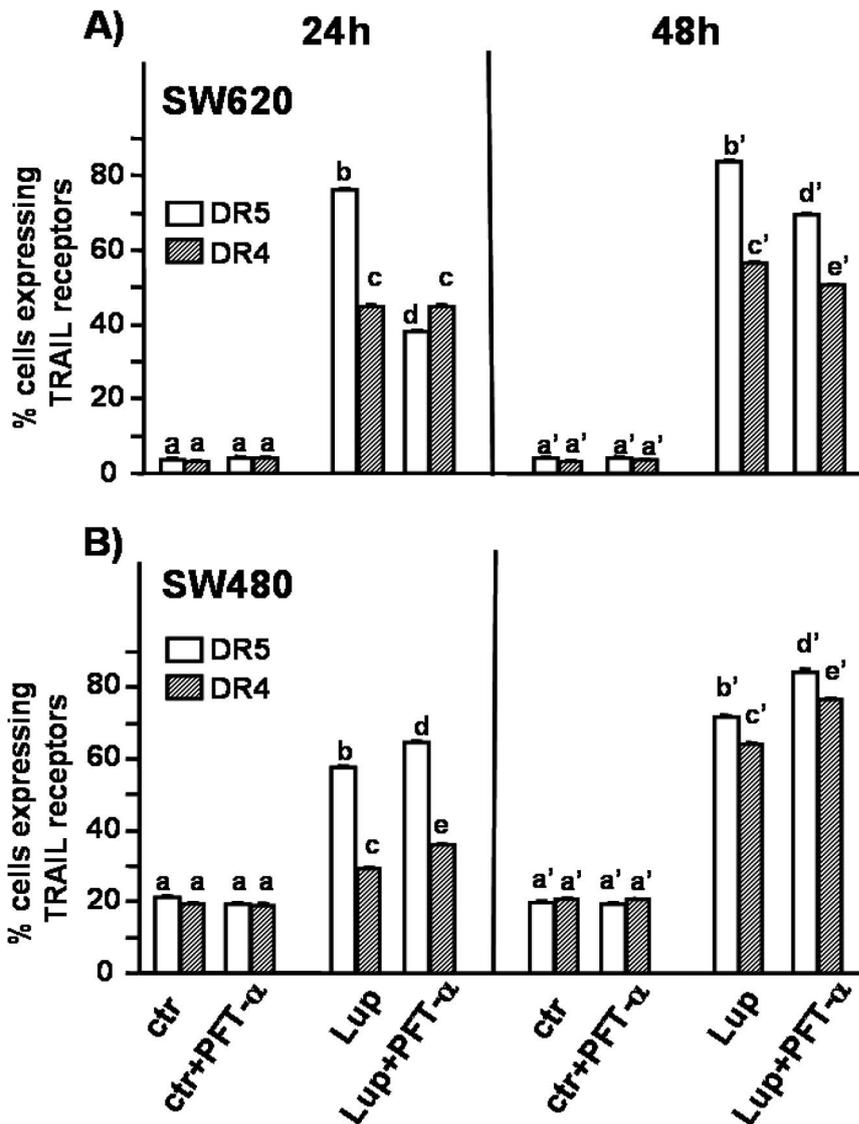


Figure 6. Analysis of DR4/DR5 receptor expression after p53 inhibition. Cells were pre-treated with p53 inhibitor, pifithrin- α (PFT- α , 30 μ M), 1 h before lupulone treatment (40 μ g/ml) for 24 and 48 h. At each time point, cells were harvested, stained with monoclonal antibodies against TRAIL DR4 or DR5 receptor and after washing with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody. Increased green fluorescence was measured by flow cytometry and data are represented by histograms as the percentage of cells expressing DR4 or DR5 receptors (A) in SW620 cells and (B) in SW480 cells. Data are the mean value \pm SE of at least three separate experiments. At each time period (24 or 48 h) columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c \neq d \neq e$ or $a' \neq b' \neq c' \neq d' \neq e'$ $P < 0.05$.

Discussion

After cell exposure to drugs initiating a stress signal, it was reported that p53 may activate different cellular responses, including DNA repair, cell cycle arrest or apoptosis [23, 24]. In the SW480 cells obtained from a human colon adenocarcinoma, and in the derived-metastatic SW620 cells, p53 is mutated with the same mutations in codon 273 and codon 309 resulting in substitutions of an arginine to histidine and a proline to serine at the level of the p53 protein [6]. In spite of these mutations, p53 can be active in these cell lines and induce cell growth or apoptosis [6, 25].

In both SW480 and SW620 cells we observed an up-regulation of p53 mRNA and protein by lupulone when compared with untreated cells. However the amount of p53 transcripts was far lower in SW480 cells as compared with the amount detected in SW620 cells. In the latter, p53 was regulated at the transcriptional level whereas in SW480 cells the increase in p53 expression resulted from a post-transcriptional regulation. We showed that p53 was phosphorylated at serine-392 in both cell lines but the phosphorylation of serine-15 was strongly increased in SW620 cells but not in SW480 cells after treatment with lupulone. Thus, the phosphorylation at serine-15 induced by lupulone may prevent the translocation of p53 from nucleus to the cytoplasm. Indeed, several studies showed that phosphorylation at serine-15 prevented p53 from being exported from the nucleus and stimulated p53 transcriptional activity through the increased association with p300 coactivator [26,27].

In SW620 cells, lupulone induced apoptosis by the activation of the extrinsic pathway via TRAIL death receptors DR4 and DR5 [9]. In these cells, we showed that the enhanced expression of p53 mRNA and protein observed after 48h of lupulone treatment was localized in the nucleus. The inhibition of p53 functions by PFT- α , an inhibitor of p53-mediated transcription blocking p53-related apoptosis [16, 17], caused a small reduction of cell death. In order to determine the possible involvement of p53 in lupulone-triggered cell death, we

measured the expression of TRAIL-death receptors, DR4 and DR5 since it was shown that targets genes of p53 are associated with growth control and cell cycle checkpoint (*GADD45*, *WIP1*, *MDM2*, *EGFR*...) but also with apoptosis (*BAX*, *BCL-X_L*, *FAS1*, *FASL* and *DR5*) [21]. Our data showed that p53 up-regulated the expression of TRAIL DR5 death receptor in SW620 cells, but DR4 expression remained unaffected and this may explain the observed limited decrease of lupulone-induced cell death after p53 inhibition by PFT- α . Thus, in SW620 cells, active mutated-p53 played rather a pro-apoptotic role in cell death induction. After 48h of lupulone treatment, the amount of p53 transcripts and of phosphorylated p53 proteins as well as total p53 proteins were significantly enhanced, p53 was retained in the nucleus where it may regulate target genes like DR5, in order to amplify the apoptotic response.

We have previously reported that lupulone induced a cross-talk between extrinsic and intrinsic pathways in SW480 cells, with activation of DR4 and DR5 receptors, Bid protein cleavage, mitochondria disruption and release of cytochrome c [9]. Here, we report in opposite to SW620 cells, that the level of p53 mRNA remained low in lupulone-treated SW480 cells. Lupulone induced an activation of mutated-p53 protein and a time-dependent accumulation in the nucleus, but also in cytosol and mitochondria. It has been reported that by a transcription-independent manner, p53 protein can be translocated from the nucleus to the cytosol or mitochondria and can form protein heterocomplexes with Bcl-X_L, Bcl-2 or Mcl-1 leading to the activation of Bax or Bad with consequently mitochondria disruption and the release of cytochrome c [4, 10, 11, 28]. Thus, the p53 protein translocation observed in SW480 cells may participate to the mitochondrial alterations observed in lupulone-treated SW480 cells. Surprisingly, inhibition of p53 by PFT- α induced a significant increase of cell death after lupulone treatment. Furthermore, p53 inhibition up-regulated significantly the expression of DR4 and DR5 receptors at the cell surface. These data suggest that in SW480

cells treated by lupulone, p53 may play an important anti-apoptotic role. The apparent paradoxical finding that PFT- α increases rather than suppresses apoptosis induced by lupulone in SW480 cells suggested that the main consequence of p53-induced gene transcription was to up-regulate the expression of genes whose products block the pro-apoptotic signaling pathways. Therefore a selective blockade of p53-mediated transcription by PFT- α would increase rather than suppress cell death [29]. However the present study is in favour of another mechanism since the inhibition of p53 function by PFT- α in lupulone-treated SW480 cells caused an accumulation of p53 protein in the nucleus and a correlated reduced amount in the cytosol, confirming the ability of PFT- α to prevent the translocation of p53 from nucleus to cytosol [20, 30]. In lupulone-treated SW480 cells, p53 was weakly phosphorylated at the level of serine-15 allowing the observed translocation of p53 into the cytoplasm where p53 might interact with mitochondrial proteins exerting a protective effect on mitochondria function since we showed that the p53 inhibitor PFT- α enhanced the apoptotic response induced by lupulone.

Considering our present data it may be hypothesized that p53 carries mutations which do not affect p53 capacity to bind to DNA [7] but may stabilize Bcl-2 or Bcl-X_L through the formation of heterocomplexes between p53 and mitochondrial proteins favouring mitochondria protection and not its disruption. As a consequence PFT- α by causing a sequestration of p53 into the nucleus may prevent the formation of these heterocomplexes and favour the observed activation of apoptosis. This is supported by the observed increase of pro-apoptotic Bax protein expression initiated by lupulone and the significant diminution of anti-apoptotic Bcl-2 and Mcl-1 proteins expression in SW480 cells after p53 inhibition.

Our present report suggests that p53 may play a different role on death signaling pathways triggered by lupulone in SW480 and SW620 cells. In both cell lines, p53 protein is over-

expressed, and carries the same mutations [6]. We show that the lupulone-triggered apoptotic mechanisms in these cells involve p53 activation. Thus, p53 may act in a transcription-dependent manner and plays a pro-apoptotic role in the metastatic SW620 cells. On the opposite in SW480 cells, p53 seems to act *via* a transcription-independent mechanism favouring cell survival. This report support different functions of mutated p53 in cancer cells depending on the drug-induced stress, the nature of cells and death signals.

Acknowledgements

Virginie Lamy is supported by a fellowship and fundings provided by the Conseil Régional d'Alsace, France. The authors would like to thank Dr Behnam Taidi (Carlsberg Breweries A/S, Development Center, Strasbourg, France) for supplying the industrial by-product containing high amounts of beta-acids (lupulone).

References

- 1 Meek DW (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification. *Oncogene* **18**, 7666-7675.
- 2 Laptenko O, Prives C (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* **13**, 951-961.
- 3 Fuster JJ, Sanz-González SM, Moll UM, Andrés V (2007) Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *TREND Mol. Med.* **13**, 192-199.
- 4 Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM (2008) p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res.* **18**, 733-744.
- 5 Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsokos M et al. (2000) Validation of a model of colon cancer progression. *J. Pathol.* **192**, 446-454.
- 6 Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, Huerta-Yepez S, Lin J, Chen D et al.(2007) Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: role of Fas, Apaf-1, NF- κ B, IAPs, Smac/DIABLO and AIF. *J. Surg. Res.* **142**, 184-194.
- 7 Rochette PJ, Bastien N, Lavoie J, Guérin SL, Drouin R (2005) SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *J. Mol. Biol.* **352**, 44-57.
- 8 Sugikawa E, Hosoi T, Yazaki N, Gamanuma M, Nakanishi N, Ohashi M (1999) Mutant p53 mediated induction of cell cycle arrest and apoptosis at G1 phase by 9-hydroxyellipticine. *Anticancer Res.* **19**, 3099-3108.
- 9 Lamy V, Roussi S, Chaabi M, Gosse F, Lobstein A, Raul F (2008) Lupulone, a hop bitter acid, activates different death pathways involving apoptotic TRAIL-receptors, in human colon tumor cells and in their derived metastatic cells. *Apoptosis* **13**, 1232-1242.

- 10 Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P et al. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell.* **11**, 577-590.
- 11 Sayan BS, Sayan E, Knight RA, Melino G, Cohen GM (2006) p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 13566-13573.
- 12 Lamy V, Roussi S, Chaabi M, Gossé F, Schall N, Lobstein A et al. (2007) Chemopreventive effects of lupulone, a hop {beta}-acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **28**, 1575-1581.
- 13 Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 402-408.
- 14 Liu HF, Hsiao PW, Chao JI (2008) Celexomib induces p53-PUMA pathway for apoptosis in human colorectal cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **176**, 48-57.
- 15 Roy AM, Baliga MS, Elmets CA, Katiyar SK (2005) Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax and caspase-3 pathways. *Neoplasia* **7**, 24-36.
- 16 Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z et al. (2001) A synthetic inhibitor of p53 protects neuron against death induced by ischemic and excitotoxic insults and amyloid β -peptide. *J. Neurochem.* **77**, 220-228.
- 17 Komarova EA, Gudkov AV (2000) Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc)* **65**, 41-48.
- 18 Li X, Ding X, Adrian TE (2004) Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest.* **22**, 389-400.
- 19 Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* **1**, 1458-1461.

- 20 Charlot JF, Nicolier M, Prétet JL, Mougin C (2006) Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* **11**, 813-827.
- 21 Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr (1998) Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**, 3287-3299.
- 22 Shi J, Shen HM (2008) Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1729-1742.
- 23 Hainaut P, Vähäkangas K (1997) p53 as a sensor of carcinogenic exposures: mechanisms of p53 protein induction and lessons from p53 gene mutations. *Pathol Biol* **45**, 833-844.
- 24 Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL (2008) The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 979-987.
- 25 Hirota Y, Horiuchi T, Akahane K (1996) p53 antisense oligonucleotide inhibits growth of human colon tumor and normal cell lines. *Jpn J. Cancer Res.* **87**, 735-742.
- 26 Dumaz N, Meek DW (1999) Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J.* **18**, 7002-7010.
- 27 Zhang Y, Xiong Y (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**, 1910-1915.
- 28 Lahiry L, Saha B, Chakraborty J, Bhattacharyya S, Chattopadhyay S, Banerjee S et al. (2008) Contribution of p53-mediated Bax transactivation in theaflavin-induced mammary epithelial carcinoma cell apoptosis. *Apoptosis* **13**, 771-781.
- 29 Steele AJ, Prentice AG, Hoffbrand AV, Yogashangary BC, Hart SM, Nacheva EP et al. (2008) p53-mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism. *Blood* **112**, 3827-3834.

30 Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC (2003) P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 265-267.

4. Résultats complémentaires

4.1. Détermination du rôle du facteur de transcription NF- κ B

4.1.1 Activation de NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B est un médiateur central dans la survie cellulaire et dans l'initiation de la réaction inflammatoire. Il peut induire l'expression de molécules anti-apoptotiques comme les IAPs ou encore des protéines de la famille Bcl-2, comme Bcl-2, Bcl-XL ou encore Mcl-1 (Sethi et coll., 2008). Nous avons mesuré la présence de deux sous-unités de NF- κ B, prépondérantes dans l'apoptose, les sous-unités p50 et p65, à l'aide d'une technique basée sur la méthode « ELISA sandwich » avec le kit TransAMTM NF- κ B Family (Active Motif Europe, Belgique). Les résultats sont représentés par la figure 32.

Les lupulones induisent une augmentation de l'expression des deux sous-unités p50 et p65 dans le noyau, uniquement pour les cellules SW620 après 24h de traitement. En effet les cellules SW480 ne montrent pas de changement significatif entre les groupes contrôle et traités. Ces résultats suggèrent que le facteur NF- κ B est activé uniquement dans les cellules métastatiques SW620.

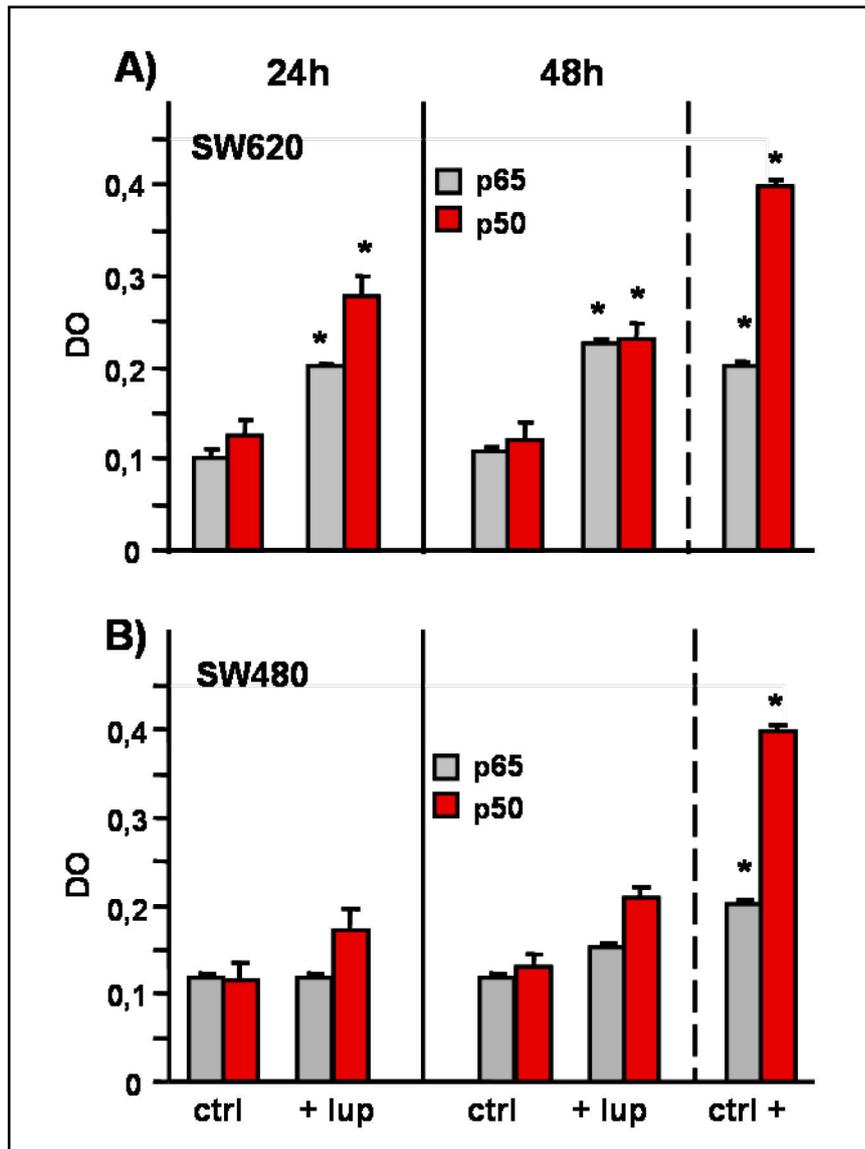


Figure 32: Activation du facteur NF- κ B induite par les lupulones.

La mesure des deux sous unités prépondérantes dans la régulation de l'apoptose p50 et p65 est effectuée à l'aide du kit colorimétrique TransAMTM NF- κ B Family et les résultats sont exprimés en densité optique. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs +/- SE de trois expériences différentes. Lupulones versus contrôle : * $P < 0,05$

4.1.2 Analyse de la mort cellulaire après l'inhibition du facteur NF- κ B

Afin de déterminer si le facteur NF- κ B est bien impliqué dans la régulation de la réponse apoptotique induite par les lupulones notamment dans les cellules métastatiques SW620, nous avons analysé la mort cellulaire après une inhibition de NF- κ B, par cytométrie en flux. Les cellules sont pré-traitées avec ou sans un inhibiteur spécifique de NF- κ B, la quinazoline (QNZ) (30 nM) (Calbiochem, Merck Chemicals, Darmstadt, Allemagne) 1h avant le traitement aux lupulones (40 μ g/ml). Les cellules sont récoltées à 24 et 48h et incubées avec une solution d'iodure de propidium comme décrit dans les chapitres précédents. Les résultats sont illustrés par la figure 33.

L'inhibition du facteur NF- κ B entraîne une importante augmentation de la mort cellulaire pour les cellules SW620 après 48h de traitement (31% de cellules traitées aux lup en SubG0/G1 vs 67% de cellules traitées aux lup + inhibiteur NF- κ B). Contrairement aux cellules SW620, les cellules SW480 ne montrent pas de différences entre le traitement aux lupulones seuls et le traitement aux lupulones avec une inhibition de NF- κ B. Ces résultats suggèrent que le facteur NF- κ B est uniquement impliqué dans la régulation de l'apoptose pour les cellules métastatiques SW620 et est activé pour induire une réponse de survie cellulaire.

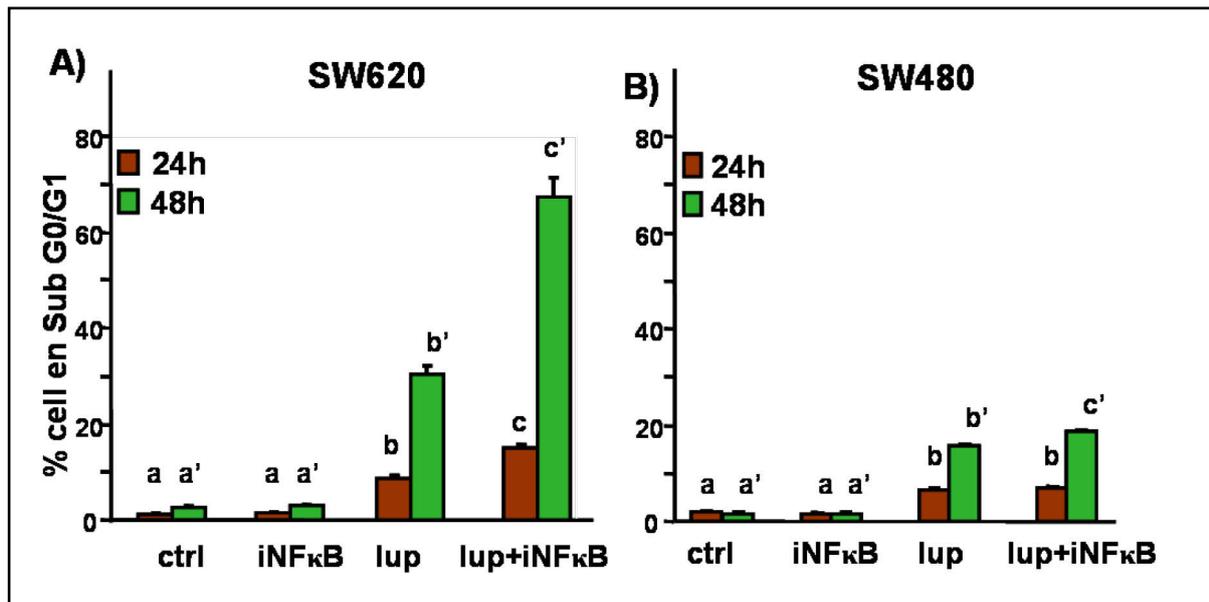


Figure 33: Analyse de la mort cellulaire après une inhibition du facteur NF-κB.

Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de cellules se trouvant en Sub G0/G1 (A) pour les cellules SW620 et (B) pour les cellules SW480. Les données traduisent la moyenne des valeurs ± SE de trois expériences différentes. A chaque période les colonnes ne portant pas les mêmes lettres différent significativement entre elles : $a \neq b \neq c$ et $a' \neq b' \neq c'$, $P < 0.05$

5. Conclusion

Nous avons démontré précédemment que les lupulones sont capables d'induire l'apoptose par l'activation de la voie de signalisation de TRAIL dans les deux lignées SW480 (sensible à TRAIL) et SW620 (résistante à TRAIL). Afin de comprendre l'origine de cette activation nous nous sommes intéressés à deux facteurs de transcription. Le premier est considéré comme un facteur clé dans la régulation de l'apoptose, la protéine p53. Bien qu'elle présente des mutations dans les deux lignées SW480 et SW620, elle peut assurer son rôle de régulateur du cycle cellulaire ou de l'apoptose selon son environnement.

Dans notre première étude nous avons démontré que la protéine p53 joue deux rôles opposés dans les lignées cellulaires SW480 et SW620. Pour les cellules SW620, les lupulones entraînent l'activation de la transcription de p53, de son expression protéique et de son activité. L'augmentation de son expression est observée uniquement dans le noyau où elle est capable de réguler et d'activer spécifiquement DR5. P53 ne semble pas être l'origine de l'activation de la voie TRAIL mais semble être initiée dans le but de prolonger la réponse apoptotique face au stress induit par les lupulones. Au contraire, dans les cellules SW480, la protéine p53 est activée par des modifications post-transcriptionnelles et l'augmentation de son expression est observée dans le noyau, le cytoplasme et la mitochondrie. La pifithrin- α (PFT- α), inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53, est capable d'empêcher sa translocation vers la mitochondrie, entraînant une augmentation significative de la mort cellulaire, démontrant le rôle anti-apoptotique important de p53 dans ces cellules. De plus, son inhibition entraîne une augmentation de l'expression de la protéine apoptotique Bax et une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1. Ces résultats suggèrent que les mutations présentes sur p53 lui confèrent la capacité de former des hétérocomplexes avec les protéines de la famille de Bcl-2 non pas dans le but de perturber la mitochondrie mais dans celui de la stabiliser face au stress induit par les lupulones.

Le deuxième facteur de transcription est le facteur NF- κ B, médiateur central de la survie cellulaire et de l'initiation de la réaction inflammatoire. Nos résultats montrent que les lupulones induisent l'activation de NF- κ B uniquement pour les cellules statiques SW620. NF- κ B active un mécanisme de survie cellulaire et peut être à l'origine de la surexpression de la protéine Mcl-1, entraînant la stabilisation de la mitochondrie. De nouvelles expériences vont devoir être menées pour vérifier cette hypothèse.

En conclusion, ces résultats montrent que pour les cellules SW620, les lupulones activent p53 dans le but de prolonger la réponse apoptotique et non de l'initier et parallèlement, les lupulones initient le facteur NF- κ B induisant des mécanismes de survie cellulaire pouvant expliquer la stabilisation mitochondriale observée. Pour les cellules SW480, la protéine p53 joue un rôle complètement opposé et active une réponse de survie cellulaire en même temps que la voie apoptotique TRAIL, tandis qu'aucune activation du facteur NF- κ B n'est observée.

CHAPITRE 4

Implication des voies de signalisation MAP kinases dans l'induction de l'apoptose par les lupulones.

1. Résumé

La famille des MAPKs est principalement formée des voies JNK, ERK et p38. Les MAPKs régulent et contrôlent des processus cellulaires fondamentaux comme l'apoptose et leurs rôles respectifs dépendent fortement du type cellulaire, de la nature et de la durée d'exposition des stimuli de stress. Dans ce chapitre, nous voulons déterminer le rôle des voies JNK, p38 ou ERK dans l'induction de l'apoptose par les lupulones pour les cellules tumorales primaires SW480 et pour leurs dérivées métastatiques SW620. Pour les cellules métastatiques SW620, seule la voie p38 joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose. Une inhibition spécifique de la voie p38 entraîne une forte diminution de la mort cellulaire, de la fragmentation de l'ADN, ainsi qu'une nette diminution de la transcription et de l'expression protéique des récepteurs de mort DR4 et DR5 et de p53 mutée. Nous avons également observé que cette inhibition induisait une diminution de l'expression des protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bax à la surface de la membrane mitochondriale mais le ratio Mcl-1/Bax reste constant, suggérant l'implication d'un autre facteur de transcription dans la régulation de ces protéines. Nous avons donc pu démontrer dans ces cellules, que les lupulones activent la voie MAPK p38, qui initie la transcription et l'activation des récepteurs de TRAIL, DR4 et DR5 et du facteur de transcription p53. DR4 et DR5 vont activer la voie extrinsèque induisant la fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose. En parallèle, la mitochondrie va surexprimer à la surface de sa membrane les protéines de la famille de Bcl-2, dont Mcl-1, entraînant sa stabilisation. Concernant les cellules primaires SW480, les voies JNK ou p38 ne sont pas impliquées dans la réponse apoptotique induite par les lupulones, contrairement à la voie ERK, qui initie des mécanismes de survie cellulaire. Une inhibition spécifique de la voie ERK entraîne une nette augmentation de la mort cellulaire. Nous avons précédemment démontré que dans ces cellules, la p53 mutée joue un rôle anti-apoptotique important. Nos résultats ont montré que la voie ERK ne semble pas réguler l'expression et l'activation de la p53. Ces données suggèrent que les lupulones activent l'apoptose par les voies extrinsèque et intrinsèque et une réponse de survie cellulaire induite par deux voies différentes, la voie ERK et la voie p53.

2. Introduction

Les membres de la famille des MAP kinases peuvent réguler et contrôler les processus cellulaires fondamentaux comme la croissance, la prolifération, la migration cellulaire ou encore l'apoptose. Chez les mammifères, six groupes distincts de MAPKs ont été décrits : 4 groupes appartenant aux kinases ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), les kinases JNK (Jun N-terminal Kinase) et les kinases p38 (Dhillon et coll, 2007). La voie de signalisation ERK est activée en réponse à des facteurs de croissance ou à un stress et joue un rôle clé dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Son activation entraîne une amplification et une dérégulation de ces facteurs cibles de transcription nucléaire comme *c-myc* et AP-1 (Ouyang et coll, 2008). Les voies JNK et p38 sont décrites comme des kinases activées en réponse à un stress, entraînant des réactions inflammatoires et dans certain cas l'activation de l'apoptose. La voie JNK est activée par des cytokines, des radiations UV ou encore des agents de dommages à l'ADN tandis que la voie p38 est essentiellement activée par un stress environnemental ou des cytokines inflammatoires (Dhillon et coll, 2007). En réponse à un stress, les voies JNK et p38 peuvent activer et réguler la protéine p53 avec une augmentation de son activité transcriptionnelle, sa stabilisation et une induction de l'apoptose. De plus, une initiation de la voie p38 ou de JNK peut induire une translocation de la protéine Bax du cytoplasme vers la mitochondrie ou une inhibition de la protéine Bcl-2, entraînant l'apoptose (Fan et Chambers, 2001 ; Kim et coll, 2008). Les mécanismes précis de régulation de l'apoptose par ces voies MAPKs sont encore inconnus pour l'instant.

Il a été démontré que les voies de MAPKs sont souvent dérégulées dans les cancers et peuvent influencer la réponse apoptotique des agents anti-tumoraux. Les rôles des MAPKs dépendent énormément du contexte cellulaire, du type de cellule, de la nature et de la durée du signal de stress, pour induire une réponse apoptotique ou de survie cellulaire (Brantkey-Finley et coll, 2003). De ce fait le rôle des voies ERK, JNK ou p38 dans la réponse des tumeurs aux agents anti-tumoraux est complexe et la description de rôles proapoptotiques ou de survie cellulaire a été proposée pour chacune des voies pour différents systèmes cellulaires (Tewari et coll, 2008 ; Aesoy et coll, 2008). Il est tout de même souvent admis que l'activation des voies JNK et p38 entraîne une suppression de l'activité de la voie ERK et module l'apoptose dans des modèles spécifiques de cellules cancéreuses (Xia et coll, 1995).

Nous avons démontré précédemment que les lupulones, acides amers du houblon, sont capable d'activer la voie apoptotique des récepteurs de mort à TRAIL, DR4 et DR5 dans

les cellules cancéreuses coliques humaines SW480 et de leurs dérivées métastatiques SW620. Nous avons également démontré que les lupulones activent la protéine p53, qui joue un rôle opposé chez les SW480 (anti-apoptotique) et les SW620 (proapoptotique). D'après ces résultats nous nous sommes donc intéressés au possible rôle des voies de signalisation MAPKs, ERK, JNK et p38 dans l'initiation et la régulation de l'apoptose dans les cellules SW480 et SW620 suite à un traitement aux lupulones.

3. Résultats : PUBLICATION n°4

Involvement of p38 MAPK in the apoptotic pathways triggered by lupulone in human colon cancer-derived SW620 metastatic cells

Lamy V, Bousserouel S, Gossé F, Minker C, Lobstein A, Raul F.

Cellular Signalling (article soumis)

**Involvement of p38 MAPK in the apoptotic pathways triggered by lupulone
in human colon cancer-derived SW620 metastatic cells**

**Virginie Lamy^{1,2}, Souad Boussarouel^{1,2}, Francine Gossé^{1,2}, Carole Minker³, Annelise
Lobstein³ and Francis Raul^{1,2}**

¹ University of Strasbourg, Unit of Pathophysiology and Translational Research EA 4438,
Faculty of Medicine, Strasbourg, France

² IRCAD - EITS, Strasbourg, France

³ CNRS UMR7081, University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France

Correspondence:

Dr F. Raul

Laboratory of Nutritional Cancer Prevention,

IRCAD

1, Place de l'hôpital, 67091 Strasbourg-Cedex, France

Tel: +33 (0)3 88 11 90 23

Fax: +33 (0)3 88 11 90 97

E-mail: francis.raul@ircad.u-strasbg.fr

Abstract

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38, regulate and control fundamental cellular processes like apoptosis. The role of MAPKs pathways depends strongly on cell type, nature and of the stress stimuli. Here, we aimed to determine the role of JNK, p38 and ERK in the activation of apoptotic pathways induced by the chemopreventive agent lupulone, a hop phenolic acid, in metastatic SW620 cells. We showed that only p38 pathways played an important role in lupulone-induced apoptosis. Indeed the specific inhibition of p38 prevented TRAIL death receptors DR4/DR5 and p53 gene transcription and protein expression as well as DNA fragmentation. We also demonstrated that p38 was not involved in the activation of anti-apoptotic Bcl-2, Mcl-1 proteins at the mitochondrial membrane surface, supporting the implication of another survival factor in the preservation of mitochondria integrity in lupulone-treated cells. In conclusion we demonstrated that lupulone activated p38-controlled up-regulation of TRAIL-death receptors DR4 and DR5 and of p53 leading to a specific activation of the apoptotic extrinsic pathway. These events may explain the specific activation of the apoptotic extrinsic pathway in the TRAIL-resistant metastatic SW620 cells. These events highlight the potential of lupulone in cancer chemoprevention and/or therapy.

1. Introduction

The family members of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) regulate and control fundamental cellular processes as growth, proliferation, differentiation, migration or/and apoptosis. Six distinct groups of MAPKs have been described in mammals; extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, Jun N-terminal kinase (JNK)1/2/3 and the p38 isoforms $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ [1]. The ERK signalling pathways are activated in response to growth factors or mitogenic signals and play a key role in cell proliferation, survival and differentiation. Activation of ERK induces the amplification and deregulation of its nuclear transcription targets, notably *c-myc* and AP-1 [2, 3]. But actually, it is clear that the deregulation of these pathways may lead to many other perturbations at the level of cell signalling depending of cell types and stress signals [4, 5]. The JNK and p38 MAPK pathways are described as stress-activated kinases, inducing inflammation and in certain cases programmed-cell death. The JNK pathways are activated by cytokines, UV radiation, growth factor deprivation or DNA-damaging agents while p38 isoforms are strongly activated by environmental stress and inflammatory cytokines [1]. In response to stress stimuli JNK as well as p38 MAPK may activate and regulate p53 protein expression with enhanced p53 transcriptional activity, p53 stabilization and consequently p53-induced apoptosis. Furthermore, p38 activation induces the translocation of the pro-apoptotic Bax protein from the cytoplasm to mitochondria while JNK phosphorylates the anti-apoptotic Bcl-2 protein leading to a Bcl-2 inhibition [5, 6]. The precise regulatory mechanisms involved in the pro-apoptotic effects triggered by these kinases remain still unclear.

In cancer cells it has been shown that MAPKs signalling pathways are deregulated and can influence the apoptotic response to antitumor agents. The roles played by MAPKs are strongly context-dependent, influenced by cell type, nature and duration of stimuli in order to

monitor apoptosis or cell survival [7]. So the role of ERK, JNK or p38 kinases in the response of tumor cells to antitumor agents is very complex, and both destructive and protective roles of each MAPK have been proposed in different systems [5, 8, 9]. It was also reported that activation of JNK or p38 may often lead to the suppression of ERK activity and so modulates apoptosis in specific cancer cell models [10, 11].

We aimed to investigate the role of ERK, JNK or p38 kinases in the lupulone-triggered induction of apoptosis in the human metastatic colon cancer SW620 cells line. We have previously demonstrated that lupulone, a beta-acid largely present in hops (*Humulus lupulus L*), is able to activate the extrinsic apoptotic signalling pathway involving the activation of TRAIL death-receptors in TRAIL-resistant metastatic SW620 cells [12].

2. Material and Methods

2.1 Lupulone

Lupulone was obtained from an industrial by-product that contains high amounts of beta-acids (Carlsberg Breweries A/S, Strasbourg, France) and was isolated following the procedure described previously [13].

2.2 Cell culture

SW620 cells were obtained from the European Collection of Animals Cell Culture (Salisbury, UK). They were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 25 mM glucose and supplemented with 10 % heat-inactivated (56°C) horse serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 % non-essential amino acids (Invitrogen Corp.,

Cergy Pontoise, France) and kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. For experiments, after trypsinization (0.5 % trypsin/2.6 mM ethylenediamine tetraacetic acid), cells were seeded at 1 x 10⁶ cells in culture dishes (100 mm internal diameter). The culture medium was DMEM supplemented with 3% heat-inactivated horse serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 10 µg/ml insulin and 1 % non-essential amino acids (Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France).

2.3 Cell death analysis

1 x 10⁶ SW620 cells were seeded in culture dishes and pre-treated with JNK specific inhibitor SP600125 (10 µM) or ERK specific inhibitor, SL327 or p38 specific inhibitor, SB203580 (10 µM) (Sigma Aldrich, Germany) 30 min before lupulone treatment (40µg/ml). Cells were harvested by trypsinization at 24 and 48h, washed with PBS, centrifuged and fixed with 1ml methanol:PBS (9:1 v/v) during 1-3h at -20°C. Cells were washed twice in PBS and re-suspended in 200µL PBS containing 0,25 µg/ml RNase A and 0,1 mg/ml propidium iodide (Sigma Aldrich, Munchen, Germany). After incubation in the dark at 37°C for 30 min, the fluorescence of cells (10 000 events) was analyzed by flow cytometry and CellQuest software (FACScan, BDBiosciences, Erembodegem, Belgium).

2.4 Analysis of mRNA levels by RT-PCR

To determine expression of DR4, DR5 and p53 mRNA, an extraction of total RNA and analysis by RT-PCR were performed after treatment with p38 inhibitor, SB203580 and lupulone. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, VWR, Copenhagen, Denmark) following manufacturer's instructions. The High-Capacity cDNA

Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) was used to reverse each transcribe RNA (1 μg) in 20 μl of reaction mix and the measurements of the transcription levels of the selected genes were performed with TaqMan Gene Expression assays (protein p53, Hs00153349; DR4, Hs00269492; DR5, Hs00366272; Applied Biosystems, Foster City, CA) Actin beta was assigned as an endogenous control (cat n° Hs99999903_m1; Applied Biosystems, Foster City, USA). Real time RT-PCR was performed with TapMan Universal PCR master mix and ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems Sequence detector; Applied Biosystems, Foster City, USA) in triplicate wells. The data were analyzed with a comparative threshold cycle (C_T) method. This method consists to determine the values of Δ cycle threshold (ΔC_T) by normalizing the average C_T value of each treatment with value of each opposite endogenous control (β -actin). Then, calculation of $2^{-\Delta\Delta C_T}$ of each treatment and statistical analysis were performed as described by Livak and Schmittgen [14].

2.5 Detection of p53 expression in cells by flow cytometry

Cells were treated with p38 inhibitor, SB203580 (10 μM) 30 minutes before the treatment with lupulone (40 $\mu\text{g/ml}$). Cells were harvested by trypsinization at 24 and 48 h, cell pellets were washed with phosphate saline buffer (PBS) and were fixed with a solution of PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) during 1h at 4°C in the dark. Cell pellets were washed with a solution of PBS/BSA 0,2 % / Tween 0,5 % and were incubated with FITC-conjugated mouse anti-human p53 antibody (Calbiochem; Merck Chemicals, France) or FITC-conjugated mouse IgG1 monoclonal isotype control antibody (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 1h at 4°C in the dark. After washing with the solution of PBS / BSA 0,2 % / Tween 0,5 %, cells were re-suspended in PBS (37°C) and the fluorescence (515

nm) of 10 000 events per sample were analyzed by FACScan and CellQuest Software (BD Biosciences, Belgium).

2.6 Expression of TRAIL receptors DR4 and DR5 after p38 inhibition

Cells were pre-treated 30 min with p38 inhibitor, SB203580 at 10 μ M and treated with lupulone (40 μ g/ml) at 24 and 48h. After trypsinization, cell pellets were washed with PBS and incubated with monoclonal mouse anti-human antibodies TRAIL-R1 (DR4) (1:100) or TRAIL-R2 (DR5) (1:100) (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) for 30 min at 4°C. Cells were washed twice with PBS and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody (1:50) (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany) or with FITC-conjugated mouse IgG1 monoclonal isotype control antibody (1:50) (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 30 min at 4°C in the dark. After washing with PBS, cells were re-suspended in PBS and the fluorescence of 10,000 events per sample (515 nm) was analysed by FACScan and CellQuest software (FACScan, BDBiosciences, Erembodegem, Belgium).

2.7 Expression of Bcl-2, Mcl-1 and Bax after p38 inhibition

SW620 cells were pre-treated 30 min with p38 inhibitor, SB203580 at 10 μ M and treated with lupulone (40 μ g/ml) for 24 and 48 h. Cells were harvested by trypsinization and proceeded for the fixation (PBS/PFA 4%) and permeabilization (PBS/BSA 0,2 % / Tween 0,5 %) step. For Bcl-2 protein detection, cells were labelled directly with 20 μ l FITC-conjugated mouse anti-human Bcl-2 monoclonal antibody or FITC-conjugated mouse IgG1 monoclonal Isotype control antibody (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 30 min at 4°C in the dark. For Mcl-1 and Bax detection, cells were incubated with rabbit anti-human Bax polyclonal antibody or rabbit anti-human Mcl-1 polyclonal antibody (1:100) (BD Biosciences,

Erembodegem, Belgium) for 30 min at 4°C. After washing twice, FITC-conjugated swine anti-rabbit F(ab')₂/FITC antibody was added (1:10) (Abcam, Paris, France) for 30 min at 4°C in the dark. After washing twice in permeabilization buffer, the fluorescence of 10,000 cells were analysed using FACScan flow cytometer and CellQuest software (FACScan, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

2.8 Analysis of DNA fragmentation by TUNEL

After treatment, cells were harvested by trypsinization at 24 and 48h. Cell pellets were washed with solution of PBS containing 0,2% BSA and were fixed in a solution of PBS/4% PFA during 1h at 4°C in the dark. Cells were washed twice in PBS/ 0,2% BSA and pellets were permeabilized with a solution of PBS/ 0,5% Tween20/ 0,2% BSA during 30min, RT. After washing, cell pellets were incubated with the Mebstain Apoptosis direct kit solution (MBL, Japan) during 1h30 at 37°C, in the dark. This solution contained TdT buffer II, FITC-dUTP, TdT (transferase) (18:1:1). Control negative cells were incubated with solution of TdT buffer, FITC-dUTP (19:1) and H₂O₂ is used as a positive control. Cells were washed twice, were re-suspended in PBS/ 0,2% BSA and the fluorescence of cells (10 000 events) was analyzed by flow cytometry and CellQuest software (FACScan, BDBiosciences, Erembodegem, Belgium).

2.9 Statistical analysis

All data were presented as mean ± standard error (SE) from three independent experiments. Significant differences between control and treated groups were evaluated by one-way

ANOVA analysis, Student's t-test or the Student-Neuman-Keuls multiple comparison test was used to determine the significance of statistical differences between data.

3. Results

3.1 Inhibition of MAPKs and SW620 cell survival

In order to determine the role of JNK, ERK or p38 MAPKs in lupulone-triggered SW620 cell death, the cells were treated with specific inhibitors of JNK (SP600125), ERK (SL327) and p38 (SB203580) (Sigma Aldrich, Germany) [15-17], at a final concentration of 10 μ M for 30 min before lupulone treatment (40 μ g/ml). The amount of dead or dying cells present in the Sub G0/G1 region was detected by flow cytometry using propidium iodide [18]. A significant inhibition ($P < 0.01$) of cell death was observed with the p38 inhibitor after 24 and 48 h of lupulone treatment, and such an effect was not observed in the presence of JNK and ERK inhibitors (Fig. 1). These data suggested a specific role of p38 signalling pathway in lupulone-triggered cell death.

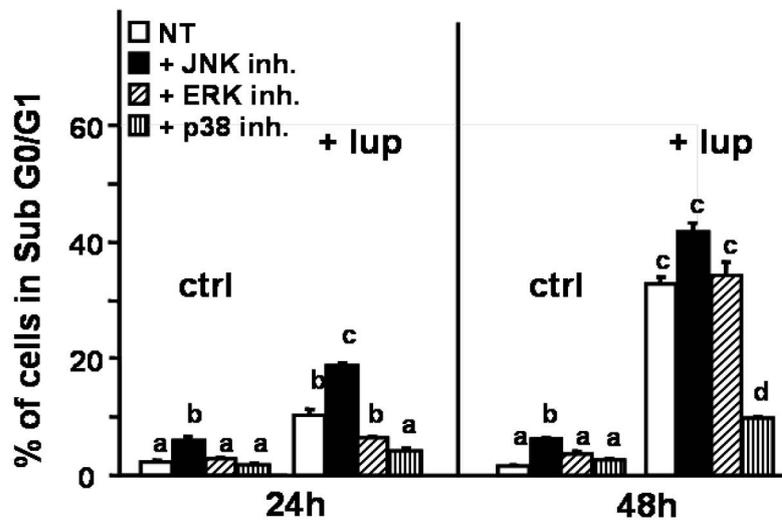


Fig. 1. Analysis of cell death-induced by lupulone after JNK, ERK and p38 inhibition. Cells were pre-treated with each specific inhibitor, SP600125 (10 μ M) for JNK, SL327 (10 μ M) for ERK and SB203580 (10 μ M) for p38, 30 min before lupulone treatment (40 μ g/ml) for 24 and 48h. At each time point, cells were harvested, stained with propidium iodide and analysed by flow cytometry. The percentage of hypodiploid cells present in the sub G0/G1 region is represented as histograms and corresponds to the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. For each time period 24 or 48 h, columns not sharing the same superscript letter differ significantly, $a \neq b \neq c \neq d$ $P < 0.05$.

3.2 Up-regulation of p53 expression by p38 after lupulone treatment

In response to a stress, p38 may favor apoptosis by regulating p53 protein expression [1, 19]. In SW620 cells, p53 protein carries two mutations, which seem not to affect its DNA binding ability [20]. In order to determine a possible crosstalk between p38 and p53 regulation, levels of p53 mRNA and protein expressions were assessed using real time PCR and flow cytometry. As shown in Figure 2A, the amount of p53 transcripts was up-regulated after lupulone treatment in a time-dependent manner reaching a 7 fold increase at 48 h as compared with untreated control cells. This effect was inhibited in the presence of the p38

inhibitor which prevented the up-regulation of p53 mRNA by lupulone (Fig. 2A). Similarly, lupulone enhanced significantly the p53 protein expression at 48h and the p38 inhibitor prevented this effect (Fig. 2B). These data demonstrated that p38 was directly involved in the activation of both p53 mRNA and protein expressions in lupulone-treated SW620 cells.

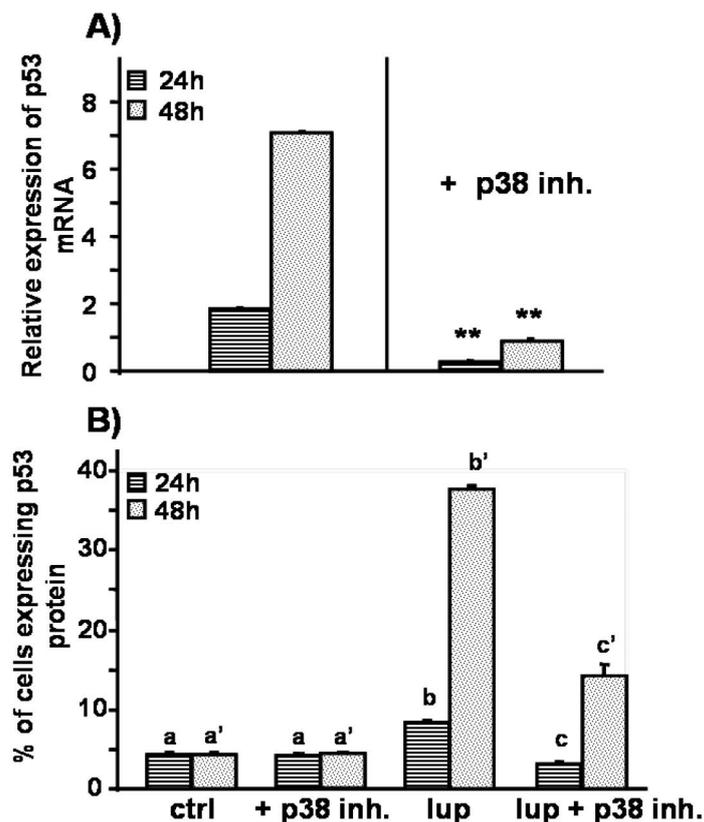


Fig. 2. Expression of p53 mRNA and protein after p38 inhibition. Cells were pre-treated with p38 inhibitor, SB203580 (10 μ M), 30 min before lupulone treatment (40 μ g/ml). (A) Real-time quantitative measurement of p53 mRNA levels. Levels are represented as the fold change over untreated cells. Data are calculated with the comparative cycle threshold method [14] and correspond to the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. For 24 or 48 h, **P<0.001. (B) Determination of p53 protein expression by flow cytometry. At each time point, cells were harvested and stained with FITC-conjugated anti-human p53 antibody. Increased green fluorescence was measured by flow cytometry and data are represented by histograms as the percent of cells expressing p53 protein. Data correspond to the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. For 24 or 48 h, columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c$ and $a' \neq b' = c'$ P<0.05.

3.3 Effect of p38 inhibition on TRAIL death receptors DR4/DR5

To determine the potential role of p38 MAPKs in the activation of TRAIL death receptors expression at the cell surface observed after lupulone treatment in SW620 cells [12,13], the levels DR4 and DR5 mRNA and protein expressions were assessed using real time PCR and flow cytometry.

As illustrated in Figure 3A and 3B, the p38 inhibitor prevented the lupulone-triggered up-regulation of both TRAIL DR4/DR5 mRNA and protein expressions. These data indicate that p38 MAPKs were directly involved in the regulation of the extrinsic apoptotic signalling pathway after lupulone treatment by inactivating TRAIL-resistance of metastatic SW620 cells.

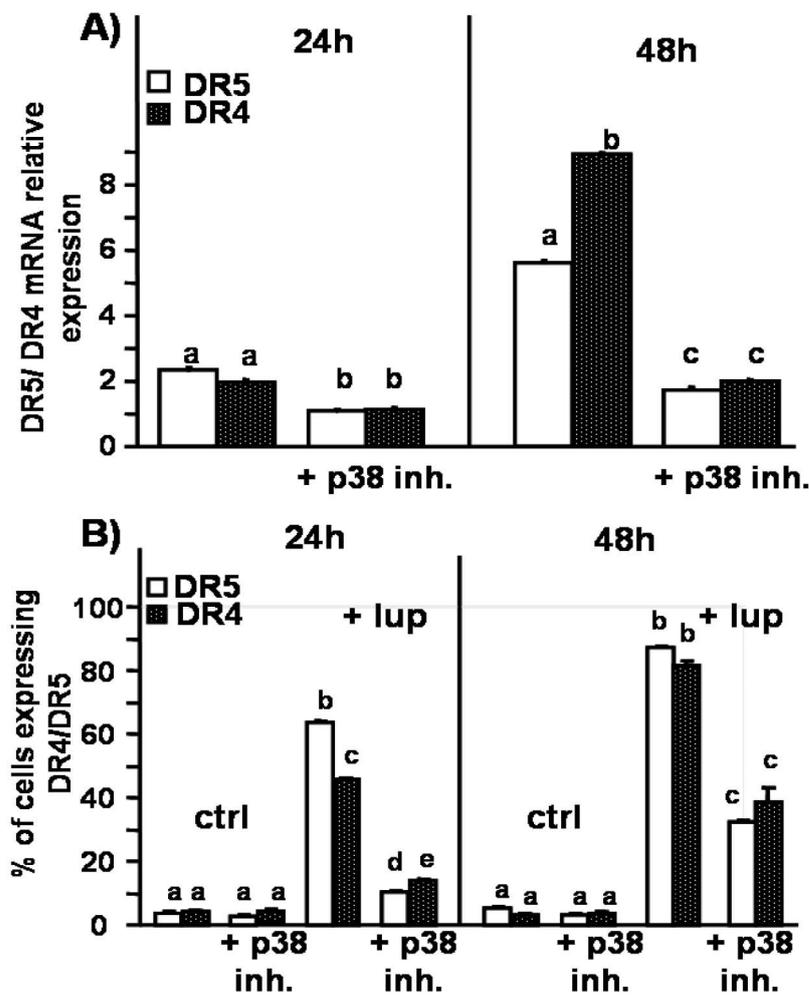


Fig. 3. Analysis of DR4/DR5 mRNA and protein expression after p38 inhibition. Cells were pre-treated with p38 inhibitor, SB203580 (10 μ M), 30 min before lupulone treatment (40 μ g/ml) for 24 and 48h. (A) Real-time quantitative measurement of DR4 or DR5 mRNA levels represented as the fold change over untreated cells. Data are calculated with the comparative cycle threshold method [14] and correspond to the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. For 24 or 48 h, columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c$ $P < 0,001$. (B) Analysis of DR4 or DR5 protein expression by flow cytometry. At each time point, cells were harvested, stained with monoclonal antibodies against DR4 or DR5 TRAIL receptors and with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 antibody. Increased green fluorescence was measured by flow cytometry and data are represented by histograms as the percentage of cells expressing DR4 or DR5 receptors. Data are the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. At each time period (24 or 48 h) columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c \neq d \neq e$ $P < 0.05$.

3.4 Effect of p38 inhibition on Bcl-2, Mcl-1 and Bax expressions

We have previously shown that in response to lupulone, SW620 cells are able to activate mechanisms favouring the protection of mitochondrial function [12]. Since it was reported that anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family like Bcl-2 or Mcl-1 are able to stabilize mitochondrial membrane after a disruption of mitochondria [21], we investigated whether p38 activation by lupulone was able to modulate the expression of these anti-apoptotic proteins. Using flow cytometry, we measured the percent of cells expressing anti-apoptotic Bcl-2, Mcl-1 or pro-apoptotic Bax proteins after an inhibition of p38 and lupulone treatment.

After 48h of lupulone treatment, Bcl-2 and Bax increased in the same proportions, as we have reported previously [13] but the amount of cells expressing anti-apoptotic Mcl-1 protein was significantly increased by 60% with a Mcl-1/Bax ratio equal to 2 (Fig.4). Inhibition of p38 reduced by 50% the lupulone-triggered activation of Mcl-1, Bcl-2 and Bax but the Mcl-1/Bax ratio remained unchanged and equal to 2. These data suggested that p38 was not involved in the initiation of the increased expression of the Bcl-2 family proteins, Mcl-1, Bax and Bcl-2 in response to lupulone.

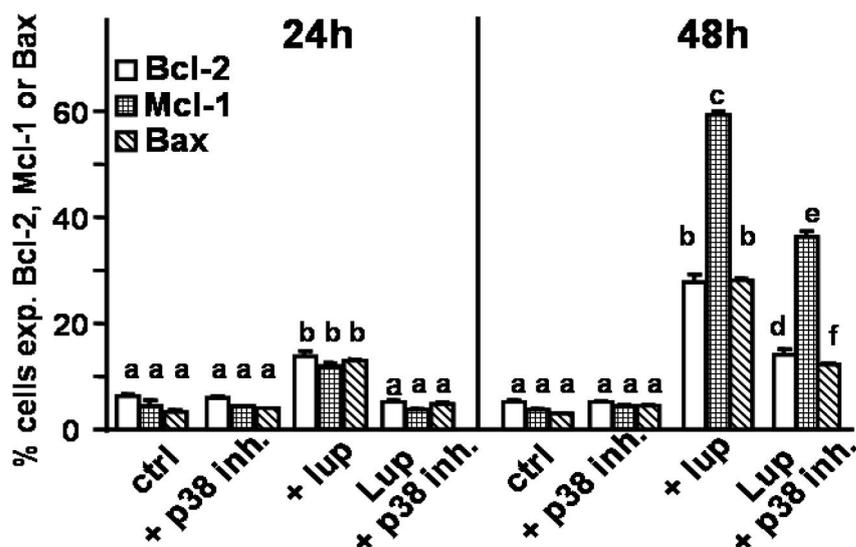


Fig. 4. *Effects of lupulone on Bcl-2, Mcl-1 and Bax expression after p38 inhibition.* At each time point, SW620 cells were harvested, fixed and permeabilized. After washing, cells were incubated with appropriate antibody (see Material and methods). Increased green fluorescence was measured by flow cytometry and data are represented by histograms as the percentage of cells expressing Bcl-2, Mcl-1 or Bax proteins. Data are the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. At each time period (24 or 48 h) columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c \neq d \neq e \neq f$, $P < 0.05$.

3.5 Involvement of p38 MAPK in lupulone-triggered DNA fragmentation

We reported previously that lupulone induced the extrinsic apoptotic pathway involving activation of the caspase-8, caspase-3 cascade [12]. Apoptosis is accompanied by condensation and fragmentation of nuclei with extensive degradation of chromosomal DNA, which is a biochemical hallmark of apoptosis [22]. The TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method which was developed by Gavrieli et al [23] is a sensitive method to visualize *in situ* the DNA fragmentation at the single cell level. Here, we assessed the role of lupulone-triggered activation of p38 MAPK on DNA fragmentation. In lupulone-treated SW620 cells, the inhibition of p38 MAPK reduced by 65% the amount of cells with

fragmented DNA after 48h (Fig. 5). These data strongly suggested again that p38 MAPK represented a major signalling pathway in the induction of apoptosis after lupulone treatment.

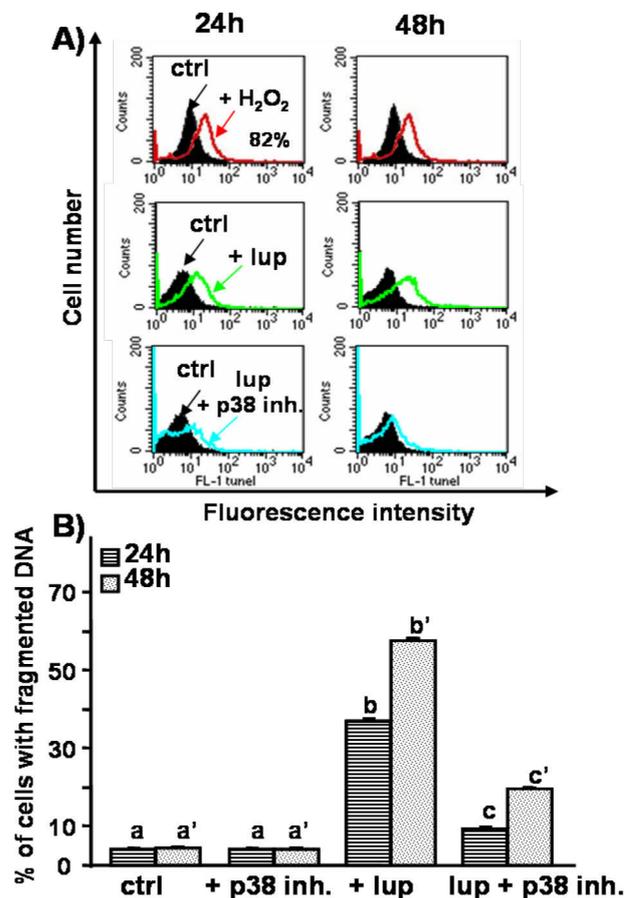


Fig. 5. Measure of DNA fragmentation induced by lupulone after p38 inhibition. Cells were pre-treated with p38 inhibitor, SB203580 (10 μ M), 30 min before lupulone treatment (40 μ g/ml) for 24 and 48h. At each time point, cells were harvested, fixed, permeabilized and stained with the Mebstain Apoptosis direct kit solution (MBL, Japan), as described in Material and Methods, and analysed by flow cytometry. H₂O₂ was used as a positive control, cells with increased green fluorescence produced DNA fragmentation. (A) Data are presented as representative cytometer histogram plots and the shift on the right corresponds to cells with fragmented DNA. Negative control and control cells presented the same profile (data not shown). (B) Histograms corresponded to the percentage of cells with fragmented DNA. Data are the mean value \pm SE of at the least three separate experiments. At each time period (24 or 48 h) columns not sharing the same superscript letter differ significantly: $a \neq b \neq c$ and $a' \neq b' \neq c'$, $P < 0.05$.

4. Discussion

The role of MAPK signalling pathways has been reported to be important in regulating apoptosis during conditions of cellular stress, and many studies have supported the general view that pro-apoptotic effects associated with JNK and p38 activation are counteracted by the ERK pathway activation and its survival signals [1, 24]. But the role of MAPKs is mainly context-dependent and influenced by cell types and by the nature of stress. Both destructive and protective roles for MAPKs have been proposed in different systems [5,7]. In the present study we demonstrated the prominent role of p38 MAPK signalling pathway in the activation of the TRAIL death receptor-mediated apoptosis by the chemopreventive agent lupulone in TRAIL-resistant metastatic SW620 cells.

We reported recently that lupulone induced apoptosis by an activation of the extrinsic pathway via TRAIL death receptors DR4/DR5 overcoming SW620 cell resistance to TRAIL. [12]. However, the mechanisms by which, lupulone was able to activate DR4/DR5 receptors remained unknown. In the present report we aimed to identify potential transcription factors involved in the activation of TRAIL receptors and apoptotic pathways triggered by lupulone. Our present data showed that when SW620 cells were exposed to lupulone in the presence of specific inhibitors of JNK, ERK or p38 MAPKs, only the p38 inhibitor was able to inhibit the pro-apoptotic effects of lupulone in these cells. Most studies have reported that p38 MAPK pathways are involved in a variety of complex cellular responses [25]. Similar to JNK, p38 may regulate apoptosis, cell cycle progression, growth and differentiation [1,26]. P38 can be activated by two main MAPKKs, MKK3 and MKK6. Overexpression of MKK6 can induce p38 activation leading to promotion of caspase activity and cell death [27]. Other studies demonstrated the prominent role of p38 in the induction of Bax translocation to mitochondria leading to a caspase-independent (intrinsic) cell death [6,28,29].

p38 is often involved in p53-regulated apoptosis and acts as a negative regulator of cell cycle progression [30,31]. In SW620 cells, p53 protein carries two mutations which do not affect its ability to bind to DNA [20]. In the present report we showed that in spite of these mutations, transcription and protein expression of mutated-p53 were up-regulated by p38 in SW620 cells treated by lupulone. We also showed that the stimulation and activation of TRAIL DR4/DR5 death receptor expression at the mRNA and protein levels by lupulone was p38 dependent. Indeed, the specific inhibition of p38 prevented DR4 and DR5 gene transcription and related protein synthesis. Our data suggested that lupulone may overcome TRAIL resistance of SW620 cells by activating p38 which in turn up-regulated the transcription and protein expressions of p53 and TRAIL-death receptors DR4/DR5.

We demonstrated previously that lupulone activated the TRAIL-death receptor (extrinsic) pathway leading to an activation of the caspase-8, caspase-3 cascade [12]. We also reported a cross-talk between the extrinsic and mitochondrial (intrinsic) apoptotic pathways through a caspase-8 dependent cleavage of protein Bid causing mitochondrial perturbations, with an alteration of mitochondrial membrane permeability and a similar parallel increase of both the pro-apoptotic Bax protein and the anti-apoptotic Bcl-2 protein. However mitochondria function was not compromised since no release of cytochrome c was observed [12,13]. Thus in the presence of lupulone mitochondria functions remained preserved in SW620 cells.

In this study we present evidence that lupulone induced the activation of another anti-apoptotic protein namely Mcl-1, which is a key factor in mitochondrial protection [21]. The inhibition of p38 pathways induced a decrease of the Mcl-1, Bcl-2 and Bax expression. Though, the Mcl-1/Bax ratio remained unchanged demonstrating that p38 was not involved in the regulation of the Bcl-2 family proteins. These data highlight the specificity of p38 in activating the extrinsic pathway in metastatic SW620 cells in response to lupulone. The key

role of p38 in the apoptotic processes triggered by lupulone in SW620 cells was confirmed by the observation that DNA fragmentation was prevented by the p38 inhibitor.

In conclusion, this study gives new insights into the complex mechanisms involved in lupulone-triggered apoptosis in TRAIL-resistant SW620 cells. We showed here that the chemopreventive agent lupulone activated the p38 signalling pathway which played a major role in the up-regulation of TRAIL death receptors and of p53 expressions at the genetic and proteic levels. DR4 and DR5 receptors activated caspase-8, and consequently caspase-3 [12] leading to DNA fragmentation. It was reported that other chemopreventive compounds like curcumin, resveratrol or quercetin induced apoptosis through an activation of JNK and p38 pathways and notably in SW620 cells after berberine treatment [32,33]. These events may explain the specific activation of the extrinsic apoptotic pathway by lupulone in the metastatic SW620 cells and highlights the potential of this agent in cancer chemoprevention and/or therapy.

Acknowledgements

Virginie Lamy is supported by a fellowship and fundings provided by the Conseil Régional d'Alsace, France. The authors would like to thank Dr Behnam Taidi (Carlsberg Breweries A/S, Development Center, Strasbourg, France) for supplying the industrial by-product containing high amounts of beta-acids (lupulone).

References

- [1] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, *Oncogene* 26 (2007) 3279-3290.
- [2] P.P. Roux, J. Blenis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (2004) 320-344.
- [3] X. Ouyang, W.J. Jessen, H. Al-Ahmadie, A.M. Serio, Y. Lin, W.J. Shih, V.E. Reuter, P.T. Scardino, M.M. Shen, B.J. Aronow, A.J. Vickers, W.L. Gerald, C. Abate-Shen, *Cancer Res.* 68 (2008) 2132-2144.
- [4] X. Wang, J.L. Martindale, N.J. Holbrook, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39435-39443.
- [5] M. Fan, T.C. Chambers, *Drug Res. Up.* 5 (2001) 253-267.
- [6] H.J. Kim, J.E. Oh, S.W. Kim, Y.J. Chun, M.Y. Kim, *Cancer Lett.* 260 (2008) 88-95.
- [7] C. Brantley-Finley, C.S. Lyle, L. Du, M.E. Goodwin, T. Hall, D. Szewedo, G.P. Kaushal, T.C. Chambers, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 459-69.
- [8] R. Tewari, V. Sharma, N. Koul, E. Sen, *J. Neurochem.* 107 (2008) 616-627.
- [9] R. Aesoy, B.C. Sanchez, J.H. Norum, R. Lewensohn, K. Viktorsson, B. Linderholm, *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 1630-1638.
- [10] Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, M.E. Greenberg, *Science* 270 (1995) 1326-1331.
- [11] C.C. Zhang, D.J. Shapiro, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 479-486.
- [12] V. Lamy, S. Roussi, M. Chaabi, F. Gosse, A. Lobstein, F. Raul, *Apoptosis* 13 (2008) 1232-1242.
- [13] V. Lamy, S. Roussi, M. Chaabi, F. Gosse, N. Schall, A. Lobstein, F. Raul, *Carcinogenesis* 28 (2007) 1575-1581.
- [14] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, *Methods* (2001) 402-408.
- [15] R. Hu, B.R. Kim, C. Chen, V. Hebbar, A.N. Kong, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1361-1367.
- [16] J.M. Olson, A.R. Hallahan, *TRENDS in Molecular Medicine* 10 (2004) 125-129.

- [17] J.M. Beaulieu, T.D. Sotnikova, R.R. Gainetdinov, M.G. Caron, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 32072-32080.
- [18] C. Riccardi, I. Nicoletti, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1458-1461.
- [19] H. Wang, Z. Wang, J. Chen, J. Wu, *Cell. Biol. Int.* 31 (2007) 1027-1035.
- [20] P.J. Rochette, N. Bastien, J. Lavoie, S.L. Guérin, R. Drouin, *J. Mol. Biol.* 352 (2005) 44-57.
- [21] J.S. Armstrong, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) 239-248.
- [22] P. Widlak, W.T. Garrard, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 263-274.
- [23] Y. Gavriely, Y. Sherman, S.A. Ben-Sasson, *J. Cell. Biol.* 119 (1992) 493-501.
- [24] B.A. Ballif, J. Blenis, *Cell. Growth Differ.* 12 (2001) 397-408.
- [25] T. Wada, J.M. Penninger, *Oncogene* 23 (2004) 2838-2849.
- [26] D. Sarkar, Z.Z. Su, I.V. Lebedeva, M. Sauane, R.V. Gopalkrishnan, K. Valerie, P. Dent, P.B. Fisher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 10054-10059.
- [27] T. Zarubin, J. Han, *Cell. Res.* 15 (2005) 11-18.
- [28] K.S. So, J.E. Oh, J.H. Han, H.K. Jung, Y.S. Lee, S.H. Kim, Y.J. Chun, M.Y. Kim, *Akt. Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 438-444.
- [29] A. Van Laethem, S. Van Kelst, S. Lippens, W. Declercq, P. Vandenabeele, S. Janssens, J.R. Vandenheede, M. Garmyn, P. Agostinis, *FASEB J.* 18 (2004) 1946-1948.
- [30] D.V. Bulavin, O.N. Demidov, S. Saito, P. Kauraniemi, C. Phillips, S.A. Amundson, C. Ambrosino, G. Sauter, A.R. Nebreda, C.W. Anderson, A. Kallioniemi, A.J. Jr. Fornace, E. Appella, *Nat. Genet.* 31 (2002) 210-215.
- [31] C. Bradham, D.R. McClay, *Cell Cycle* 5 (2006) 824-828.
- [32] C. Chen, A.N. Kong, *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (2005) 318-326.
- [33] W.H. Hsu, Y.S. Hsieh, H.C. Kuo, C.Y. Teng, H.I. Huang, C.J. Wang, S.F. Yang, Y.S. Liou, W.H. Kuo, *Arch. Toxicol.* 81 (2007) 719-728.

4. Résultats complémentaires sur la lignée SW480

4.1. Analyse de la mort cellulaire après inhibition des voies MAPK

Tout comme pour les cellules métastatiques SW620, nous avons voulu déterminer le rôle des MAPKs dans l'induction de l'apoptose par les lupulones pour les cellules SW480. Les cellules sont pré-traitées avec les inhibiteurs spécifiques de JNK, SP600125 (10 μ M), de ERK, SL327 (10 μ M) et de p38, SB203580 (10 μ M) (Sigma Aldrich, Germany) 30 min avant le traitement aux lupulones (40 μ g/mL). Le pourcentage de cellules mortes ou en voie de mourir est détecté avec l'iodure de propidium par cytométrie en flux dans la région du cycle cellulaire appelée SubG0/G1 (Riccardi et al, 2006).

Les résultats obtenus sont représentés par la Figure 34. Seule la voie ERK joue un rôle dans la réponse des cellules au stress causé par les lupulones. En effet, une inhibition de la voie ERK entraîne une nette augmentation dès 24h de la mort cellulaire (37% des cellules en SubG0/G1 après traitement avec inhibiteur ERK + lupulones contre 11% après un traitement aux lupulones seuls). Après 48h de traitement aux lupulones, l'inhibition de la voie ERK entraîne 65% de cellules mortes contre 15% seulement pour les cellules traitées aux lupulones seuls. Ces résultats montrent que la voie ERK est impliquée dans la réponse à la survie des cellules face au stress induit par les lupulones. Les deux autres voies JNK et p38 n'interviennent pas dans la régulation de l'apoptose ou de la survie cellulaire induite par les lupulones dans les cellules primaires SW480.

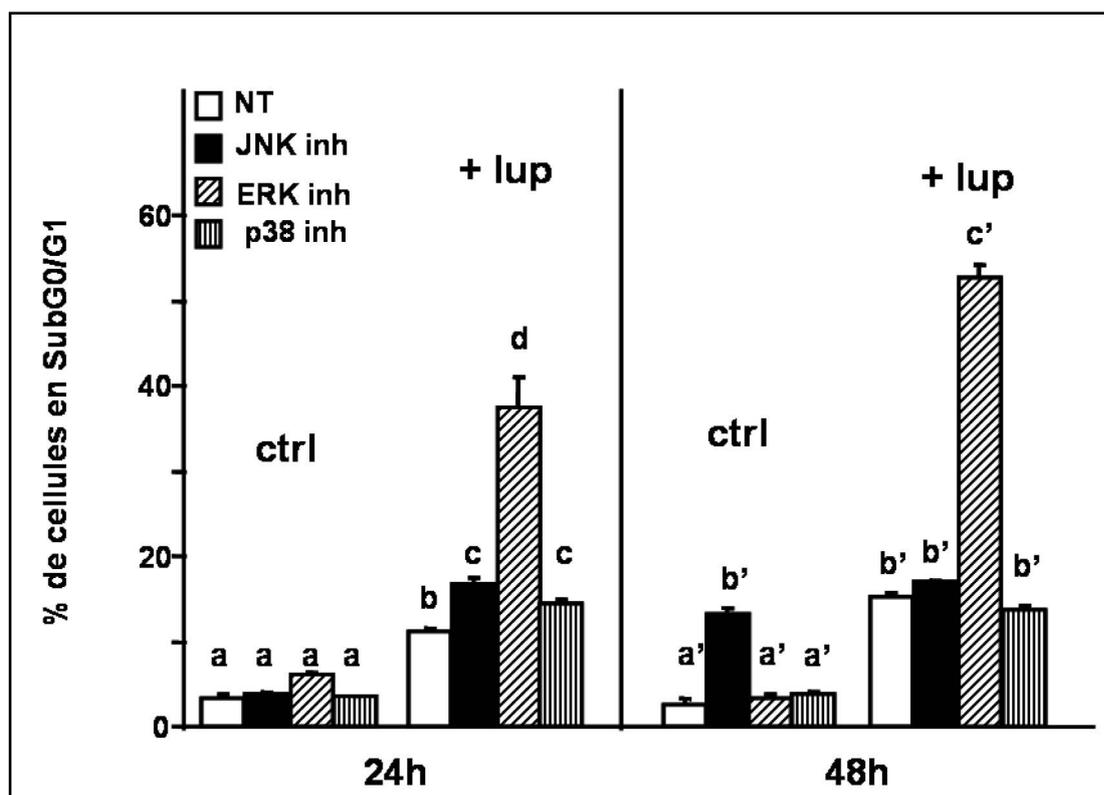


Figure 34: Analyse de la mort cellulaire induite par les lupulones après une inhibition des voies MAPKs. Le pourcentage de cellules hypodiploïdes présentes dans la région SubG0/G1 est représenté par un histogramme qui correspond à la moyenne \pm SE de trois expériences séparées. Les colonnes ne portant pas les mêmes lettres diffèrent de manière significative : $a \neq b \neq c \neq d$, $P < 0.05$.

4.2 Expression de la protéine p53 après inhibition de la voie ERK

La voie ERK semble être impliquée dans la réponse de survie cellulaire initiée parallèlement à l'activation de l'apoptose après traitement aux lupulones chez les cellules SW480. Nous avons déjà observé que les lupulones induisent l'activation de la protéine mutée p53, qui joue un rôle anti-apoptotique important seulement 48h après traitement. L'inhibition de la voie ERK induit une augmentation de la mort cellulaire dès 24h de traitement aux lupulones. Afin de déterminer si la voie ERK régule l'activation de p53 mutée chez les cellules SW480, nous avons mesuré l'expression de la protéine par cytométrie en flux après inhibition de la voie ERK avec un inhibiteur spécifique, SL327 (10 μ M) (Sigma Aldrich, Germany).

Les résultats sont présentés par la Figure 35. L'inhibition de la voie ERK n'a aucun effet sur l'augmentation des cellules qui expriment la protéine p53, après un traitement aux lupulones. La voie ERK ne régule pas l'expression de p53 dans les cellules SW480. De plus, comme avec les lupulones seuls, l'augmentation de l'expression de p53 se fait par des modifications post-transcriptionnelles et non par une augmentation de sa transcription (données non montrées).

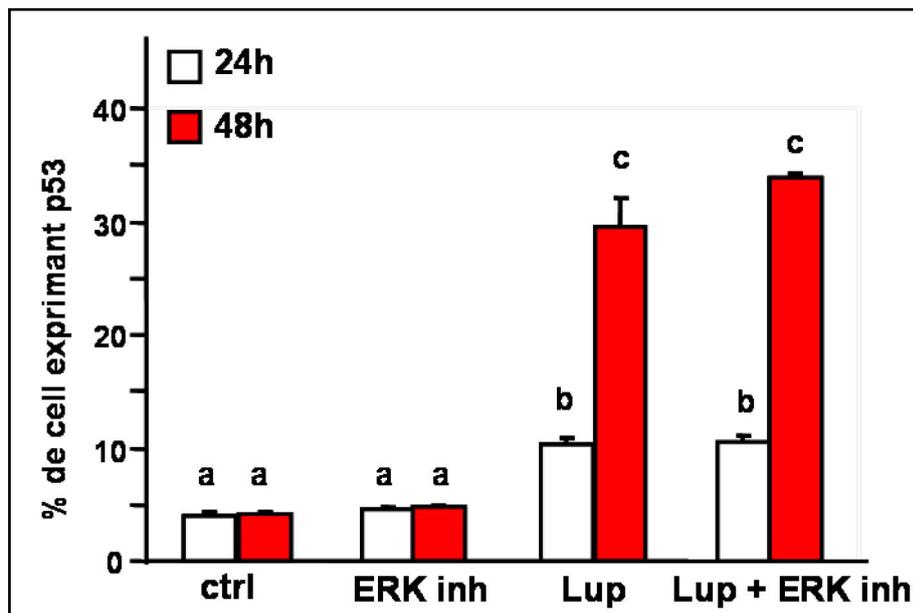


Figure 35: Expression de p53 après une inhibition de la voie ERK. Les cellules sont incubées avec un anticorps anti-humain p53 conjugué à la FITC après 24 et 48h de traitement aux lupulones. La fluorescence est mesurée par le cytomètre en flux et les résultats sont représentés par des histogrammes représentant le pourcentage de cellules qui expriment la protéine p53. Les données résultent de la moyenne \pm SE de trois expériences séparées. Les colonnes ne portant pas les mêmes lettres diffèrent de manière significative, $a \neq b$ ou $a' \neq b'$, $P < 0.05$.

5. Conclusion

Nos résultats présentés dans les chapitres précédents ont montré que les lupulones induisent dans les cellules métastatiques SW620, l'apoptose à travers l'activation de la voie extrinsèque par les récepteurs de mort cellulaire DR4 et DR5. Nous avons également montré que p53 mutée est activée et régule positivement le gène DR5 afin de prolonger cette réponse. Concernant les cellules primaires SW480, les lupulones induisent l'apoptose à travers l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque par les récepteurs DR4 et DR5. Contrairement aux cellules SW620, p53 activée joue un rôle anti-apoptotique en réponse aux lupulones. Dans ce chapitre nous avons voulu savoir si l'apoptose induite par les lupulones est régulée par les voies des MAPKs afin de comprendre comment les lupulones peuvent déclencher aussi bien l'augmentation et l'activation des récepteurs DR4 et DR5 que des mécanismes de survie cellulaire.

La première étude montre pour la première fois le mécanisme de l'induction de l'apoptose par les lupulones dans les cellules métastatiques SW620. Les lupulones sont capables d'activer spécifiquement la voie p38, qui va augmenter la transcription et l'expression protéique des récepteurs DR4 et DR5 ainsi que celles de la protéine mutée p53. Les récepteurs vont initier la caspase-8, qui va à son tour activer la caspase-3, entraînant la fragmentation de l'ADN. La caspase-8 active va également cliver la protéine Bid, qui va perturber la mitochondrie. En parallèle et en réponse à cette perturbation, la mitochondrie augmente l'expression des protéines de la famille Bcl-2 à la surface de sa membrane, notamment Mcl-1, induisant sa stabilisation. La deuxième étude montre l'implication de la voie ERK dans l'activation des mécanismes de survie cellulaire en réponse aux lupulones, pour les cellules primaires SW480. La réponse apoptotique déclenchée par les lupulones n'est pas initiée par les voies MAPKs. Ni la voie JNK, ni la voie p38 ne jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose par les lupulones, alors que la voie ERK semble jouer un rôle important dans la survie cellulaire. Nous avons montré que les lupulones augmentent l'expression protéique de p53 et entraînent son activation, semblerait-il pour stabiliser la mitochondrie. Nous avons dès lors supposé que la voie ERK activée va réguler la transcription et l'expression de la protéine p53. Pourtant nos résultats ont démontré que p53 n'est pas régulée par la voie ERK. Dans les cellules SW480, les lupulones induisent en parallèle, une activation de l'apoptose par les voies extrinsèque et intrinsèque et des mécanismes de survie initiés par deux voies différentes, la voie ERK et la voie de p53.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

La récurrence de certains cancers, comme le cancer colorectal est encore trop fréquente, impliquant une prise en charge de la maladie le plus précocement possible. La chimioprévention utilise des agents naturels, synthétiques ou biochimiques pour prévenir, inverser ou supprimer la cancérogenèse à travers notamment l'activation et la régulation de la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Durant nos travaux, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de la cancérogenèse colique représenté par la progression de la tumeur primaire colique humaine (SW480) en métastases (SW620). A travers ce modèle, nous avons démontré que les lupulones, microconstituants du houblon, peuvent activer ou réguler des cibles importantes de l'apoptose, comme les récepteurs apoptotiques de TRAIL (DR4/DR5), l'intégrité de la mitochondrie, l'activation des voies MAP kinases, de la protéine p53 ou encore du facteur NF- κ B. De même sur un modèle pré-clinique de cancérogenèse expérimental sur le rat, après 7 mois de traitement, les lupulones induisent une nette diminution de la formation de foyers de cryptes aberrantes, ainsi que celle de la formation des tumeurs coliques. Ces résultats établissent les différentes propriétés anti-cancéreuses des lupulones et leur haut potentiel comme agent chimiopréventif contre le cancer colorectal.

I. Activation par les lupulones, des voies de signalisation des récepteurs apoptotiques de TRAIL

Une première étude fût réalisée sur l'induction de l'apoptose par une mixture des acides amers, lupulones et humulones du houblon sur les cellules coliques humaines HL60 et U937 (Chen et coll., 2004), montrant l'implication des caspases et de la mitochondrie. Lors de nos travaux, nous avons comparé les voies apoptotiques induites par les lupulones dans le modèle de progression de la cancérogenèse représenté par les lignées tumorales coliques humaines primaires (SW480) et leurs dérivées métastatiques (SW620).

Dans les cellules SW480, sensibles à TRAIL, les lupulones induisent une interconnexion entre les voies extrinsèque et intrinsèque via une activation des récepteurs apoptotiques à TRAIL DR4 et DR5. Au contraire des SW480, les cellules métastatiques

SW620 sont résistantes à TRAIL. Pourtant, en réponse aux lupulones, ces dernières initient la voie extrinsèque via l'activation des mêmes récepteurs apoptotiques à TRAIL, DR4 et DR5.

Actuellement, le développement de nouvelles stratégies pour le traitement contre le cancer se concentre sur de nouvelles molécules ciblant ces récepteurs de mort, DR4 et DR5 comme le développement d'anticorps monoclonaux en phase clinique (Bellail et coll., 2009 ; Plummer et coll., 2007). En effet, l'induction de l'apoptose par ces récepteurs est spécifique aux cellules transformées ou cancéreuses mais pas à la plupart des cellules normales (Wang, 2008 ; Bellail et coll., 2009). Malheureusement, de nombreux cas de résistance à TRAIL ont été décrits pour le cancer colorectal et des études ont démontré qu'une façon de vaincre cette résistance est la combinaison de plusieurs agents chimiothérapeutiques (Kruyt, 2008 ; Meurette et coll., 2006). De ce fait identifier des substances naturelles capables en combinaison avec le ligand TRAIL, molécule produite par les cellules du système immunitaire (Herbeuval et coll., 2003 ; Zamai et coll., 2007), de surmonter cette résistance serait un challenge important pour la thérapie contre le cancer.

Nos résultats démontrent que les lupulones sont capables d'induire l'apoptose initiée par TRAIL dans les cellules cancéreuses en augmentant l'expression des récepteurs apoptotiques DR4 et DR5 à la surface de la membrane plasmique. Les cellules SW480 sont sensibles à TRAIL et expriment les récepteurs apoptotiques (Vaculová et coll., 2006). Bien que dans ces cellules les lupulones n'augmentent pas la quantité de transcrits des récepteurs DR4 et DR5, nous observons une importante surexpression de ces protéines à la surface de la membrane plasmique et une sensibilité des cellules à TRAIL ligand plus importante. A l'opposé les cellules métastatiques SW620 sont résistantes à TRAIL et n'expriment pas les récepteurs apoptotiques à la surface de la cellule (Vaculová et coll., 2006). Pourtant les lupulones sont capables d'induire une augmentation de la transcription et de l'expression protéique de ces récepteurs ainsi que de potentialiser les effets de TRAIL ligand. Une étude réalisée sur des clones de SW480 résistants à TRAIL a permis de démontrer qu'une cause majeure de la résistance à TRAIL est due à une déficience du transport intracellulaire des récepteurs DR4 et DR5 vers la surface cellulaire (Jin et coll., 2004). Nos résultats suggèrent que pour les cellules SW480, les lupulones régulent des mécanismes post-transcriptionnels et de transports intracellulaires externalisant les récepteurs de mort DR4 et DR5 à la surface cellulaire. Pour les cellules SW620 les lupulones empêchent la résistance à TRAIL en

régulant positivement la transcription, l'expression protéique et le transport intracellulaire de ces protéines, entraînant leur augmentation à la surface cellulaire.

Nos travaux démontrent que les lupulones initient l'apoptose par deux mécanismes différents dans les cellules SW480 et les cellules SW620. Les voies intrinsèque et extrinsèque sont activées dans les cellules SW480, avec une importante implication de la mitochondrie. Pourtant une différence de sensibilité aux lupulones entre les deux lignées est observée avec une sensibilité plus importante pour les cellules SW620. De plus, bien que les caspases-8 et -9 soient initiées, l'activité de la caspase-3 n'est pas plus importante pour les SW480 que pour les SW620 où seule la voie extrinsèque est impliquée. Il a été démontré que la voie de signalisation TRAIL peut être inhibée à différents stades et notamment à travers l'expression d'inhibiteurs naturels de l'apoptose, la famille des IAPs comme cIAP1 et cIAP2 ou encore la protéine XIAP, qui sont capables d'inhiber les caspases -3 et -7 (Hunter et coll., 2007). Les lupulones activent la protéine XIAP pour les cellules SW480, entraînant une inhibition d'une partie des caspases-3 actives. L'activation de la protéine XIAP ainsi que la capacité invasive et un cycle de division cellulaire beaucoup plus importants des cellules SW620 (de Vries et coll., 1995) peuvent expliquer la différence de sensibilité aux lupulones entre les deux lignées. Enfin, pour les cellules SW620, les lupulones initient uniquement la voie extrinsèque avec une activation directe de la caspase-3 par la caspase-8. Bien qu'un clivage de la protéine Bid soit observé, les perturbations mitochondriales sont limitées. La famille des protéines Bcl-2 est un facteur important de régulation de la mitochondrie permettant sa stabilisation ou sa perturbation (Armstrong, 2006 ; Brunelle et Letai, 2009). La protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2, Mcl-1 est souvent surexprimée par les cellules cancéreuses de la prostate ou par différents types de leucémies, leurs permettant une certaine « immortalisation » (Royuela et coll., 2001 ; Kitada et coll., 1998). En effet, la protéine Mcl-1 est rapidement dégradée en réponse à un signal de mort cellulaire, mais sera immédiatement réexprimée par un *stimulus* de survie cellulaire et joue donc un rôle déterminant dans la régulation de la survie cellulaire en réponse aux signaux de mort cellulaire (Yang-Yen, 2006). Les lupulones entraînent une augmentation du ratio Bcl-2/Bax dans les mêmes proportions, indiquant qu'elles ne sont pas impliquées dans la régulation de la mitochondrie. Mais les lupulones induisent surtout une importante augmentation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 uniquement dans les cellules SW620, démontrant son rôle clé dans la stabilisation de la mitochondrie ainsi que l'activation de mécanismes de survie.

II. Régulation de l'apoptose induite par les lupulones

La découverte de l'activation de voies apoptotiques, par les lupulones, impliquant les récepteurs de mort de TRAIL, DR4 et DR5 dans les deux lignées SW480 et SW620, nous a amené à déterminer le rôle de facteurs de transcription capables de réguler ces voies. L'initiation de certains facteurs de transcription par les lupulones pourrait expliquer notamment la perte de la résistance à TRAIL des cellules métastatiques SW620.

La protéine p53 est un facteur de transcription capable de réguler des gènes proapoptotiques comme des inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire, des régulateurs de sa propre activité, des composants de la voie extrinsèque comme DR5, Fas ou FasL, ou encore des membres de la famille de Bcl-2 (Amundson et coll., 1998). La plupart des tumeurs expriment des mutations sur le gène de p53 entraînant des altérations fonctionnelles de la protéine p53 mutée. Toutefois, des études comme celle de Rochette et coll. ont montré que les mutations de p53 identifiées sur les cellules coliques humaines SW480 n'empêchent pas celle-ci de se lier à l'ADN et d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN en réponse à un stress (Rochette et coll., 2005). Nos travaux ont démontré que malgré les mutations de p53, celle-ci est activée, dans les cellules métastatiques SW620, par les lupulones de manière dépendante de la transcription et joue son rôle apoptotique en régulant le gène DR5 afin de prolonger et non d'initier la réponse apoptotique. A l'opposé, dans les cellules primaires SW480, l'activation de p53 a lieu après des modifications post-transcriptionnelles et elle joue un rôle anti-apoptotique important. Suite à son initiation par les lupulones, p53 est transloquée du noyau vers la mitochondrie où elle semble former des complexes avec les protéines de la famille de Bcl-2.

Récemment des études ont démontré qu'indépendamment de son rôle dans la régulation de la transcription de gènes, p53 peut être transloquée du noyau vers la mitochondrie où elle est capable de former un complexe protéique avec les protéines de la famille des protéines de Bcl-2, afin de perturber la mitochondrie et d'activer la voie intrinsèque (Wolff et coll., 2008 ; Vaseva et coll., 2009). L'équipe de Wolff et coll., a ainsi mis en évidence que p53 mitochondriale contribue à la perméabilisation de la membrane mitochondriale en induisant la formation de multimères avec les canaux VDACs. De plus, la forme cytosolique de p53 interagit avec la protéine Bax, entraînant sa translocation dans la

mitochondrie et la libération par celle-ci des agents apoptotiques comme le cytochrome c (Wolff et coll., 2008). Ici, les mutations de p53 sont localisées dans la partie C terminale, et il est probable qu'elles vont permettre à p53 soit de former un complexe avec la protéine Bax afin de l'inhiber soit de former un complexe avec les protéines anti-apoptotiques comme la protéine Bcl-2 afin de l'activer et de la stabiliser. Les résultats que nous avons obtenus concernant l'augmentation de Bax et la diminution des protéines Bcl-2 et Mcl-1 à la suite de l'inhibition de la translocation de p53 par la pifithrine- α (Kelly et coll., 2003) sont en faveur de cette hypothèse.

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle central dans la survie cellulaire et l'initiation de la réaction inflammatoire (Karin, 2006 ; Sarkar et coll., 2008). Les lupulones activent NF- κ B uniquement dans les cellules métastatiques SW620. En effet, une augmentation des sous-unités p50 et p65, formant le complexe actif de NF- κ B dans le noyau (Sharma et Narayanan, 1996), est observée dans les cellules SW620. De plus, une inhibition de NF- κ B par une quinazole, entraîne une nette augmentation de la mort cellulaire.

NF- κ B est un facteur de transcription majoritairement impliqué dans l'initiation de l'inflammation et la réponse de l'immunité innée. Toutefois, un grand nombre de ses cibles, des récepteurs ou des cytokines comme le TNF- α ou IL-1 β , sont liés au développement des cancers (Karin, 2006). Des études ont démontré qu'une inflammation chronique comme un ulcère colique ou la maladie de Crohn, peut contribuer de manière importante au développement d'un cancer colorectal. Les cytokines libérées pendant la réaction inflammatoire peuvent activer entre autre NF- κ B, qui va promouvoir la croissance de la tumeur colorectale (Fantini et Pallone, 2008). Le facteur NF- κ B est capable de réguler positivement des gènes anti-apoptotiques comme celui de c-FLIP, une protéine inhibitrice de la caspase-8, les inhibiteurs naturels de l'apoptose cIAP-1 et cIAP-2 ou encore les gènes des protéines de la famille de Bcl-2, Bcl-X_L ou Bcl-2 (Karin et Lin, 2002 ; Sethi et coll., 2008). Les lupulones induisent l'activation du facteur NF- κ B de manière précoce dans les cellules métastatiques et semble activer des systèmes de survie cellulaire en réponse au stress causé par ces molécules. Ces résultats nous laisse supposer que NF- κ B régule positivement des gènes anti-apoptotiques comme ceux de Bcl-2 ou Mcl-1 entraînant la stabilisation de la mitochondrie dans les cellules métastatiques SW620.

Les voies MAP kinases sont décrites comme des voies importantes lors de la régulation de l'apoptose selon la nature du stress cellulaire (Dhillon et coll., 2007). Une inhibition de chacune des trois voies JNK, p38 et ERK a mis en évidence l'importante implication de la voie p38 dans l'induction de l'apoptose par les lupulones dans les cellules métastatiques SW620 ainsi qu'une implication de la voie ERK dans l'activation de mécanismes de survie cellulaire en réponse aux lupulones chez les cellules primaires SW480.

En conclusion :

1. Dans les cellules métastatiques SW620, les lupulones activent en premier lieu la voie p38, qui va réguler et initier la transcription et l'expression protéique des récepteurs de mort à TRAIL, DR4 et DR5 ainsi que la transcription et l'expression protéique de la p53 mutée, induisant la fragmentation d'ADN et donc l'apoptose. Une inhibition de la p38 induit une nette diminution des protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bax à la surface de la membrane mitochondriale. Tout comme la voie JNK, la voie p38 est capable de réguler l'apoptose, la progression ou encore la différenciation cellulaire (Dhillon et coll., 2007 ; Olson et Hallahan, 2004). La voie p38 est activée par des MAP kinase kinases MEKK-3 et MEKK-6, pouvant initier l'activité des caspases et donc la mort cellulaire (Zarubin et Han, 2005). De même Aesoy et coll démontre que la p38 est impliquée dans l'activation de p53, induisant l'apoptose et l'arrêt de la progression du cycle cellulaire (Aesoy et coll., 2008). Nos travaux ont démontré que les lupulones activent la voie p38 dans les cellules métastatiques SW620. Celle-ci va réguler la transcription de DR4 et DR5 ainsi que celle de p53, qui va prolonger l'effet apoptotique. Les récepteurs DR4 et DR5 vont initier la caspase-8, qui va activer la caspase-3 et induire la fragmentation de l'ADN. En parallèle les cellules SW620 activent le facteur NF- κ B en réponse aux lupulones, qui va initier des mécanismes de survie cellulaire. Il est possible que NF- κ B va entraîner l'augmentation de l'expression des protéines Bcl -2 et Mcl-1 à la surface de la membrane mitochondriale afin de la stabiliser en réponse à l'activation de la p38. Un schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose par les lupulones dans les cellules SW620 est représenté par la figure 36.

2. Concernant les cellules primaires SW480, ni la voie JNK, ni la voie p38 ne sont impliquées dans l'induction de l'apoptose par les lupulones. La voie ERK est impliquée dans l'activation de mécanismes de survie cellulaire en réponse aux lupulones. La voie ERK est souvent décrite en opposition aux deux autres voies JNK et p38. Elle est principalement activée par des facteurs de croissance tandis que les voies JNK et p38 sont activées après un stress ou une réaction inflammatoire (Brantley-Finley et coll., 2003 ; Dhillon et coll., 2007). Suite à un stimulus par les facteurs de croissance, la voie Ras/Raf est activée et initie les kinases MEK1/2, qui vont activer la voie ERK1/2. Selon la nature des cellules la voie ERK va jouer un rôle clé dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Fan et Chambers, 2001). Les cellules primaires SW480, en réponse aux lupulones, activent la voie ERK ainsi que la p53, par la phosphorylation de la sérine -15 et surtout de la sérine-392, induisant une réponse anti-apoptotique importante. Des études ont démontrés que la voie ERK pouvait réguler la p53 et induire son activation notamment par la phosphorylation de la sérine-15 (Persons et coll., 1993 ; Wu, 2004). Nous pouvons dès lors supposer que la voie ERK induite par les lupulones active la p53 entraînant les mécanismes de survie cellulaire. Pourtant une inhibition de la voie ERK, n'empêche pas l'augmentation de l'expression de la protéine p53 après un traitement aux lupulones. Dans ces cellules, les lupulones entraînent une activation des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque ainsi que différents systèmes de survie cellulaire initiés soit par la voie ERK soit par la protéine mutée p53. Un schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose par les lupulones dans les cellules primaires SW480 est représenté par la figure 37.

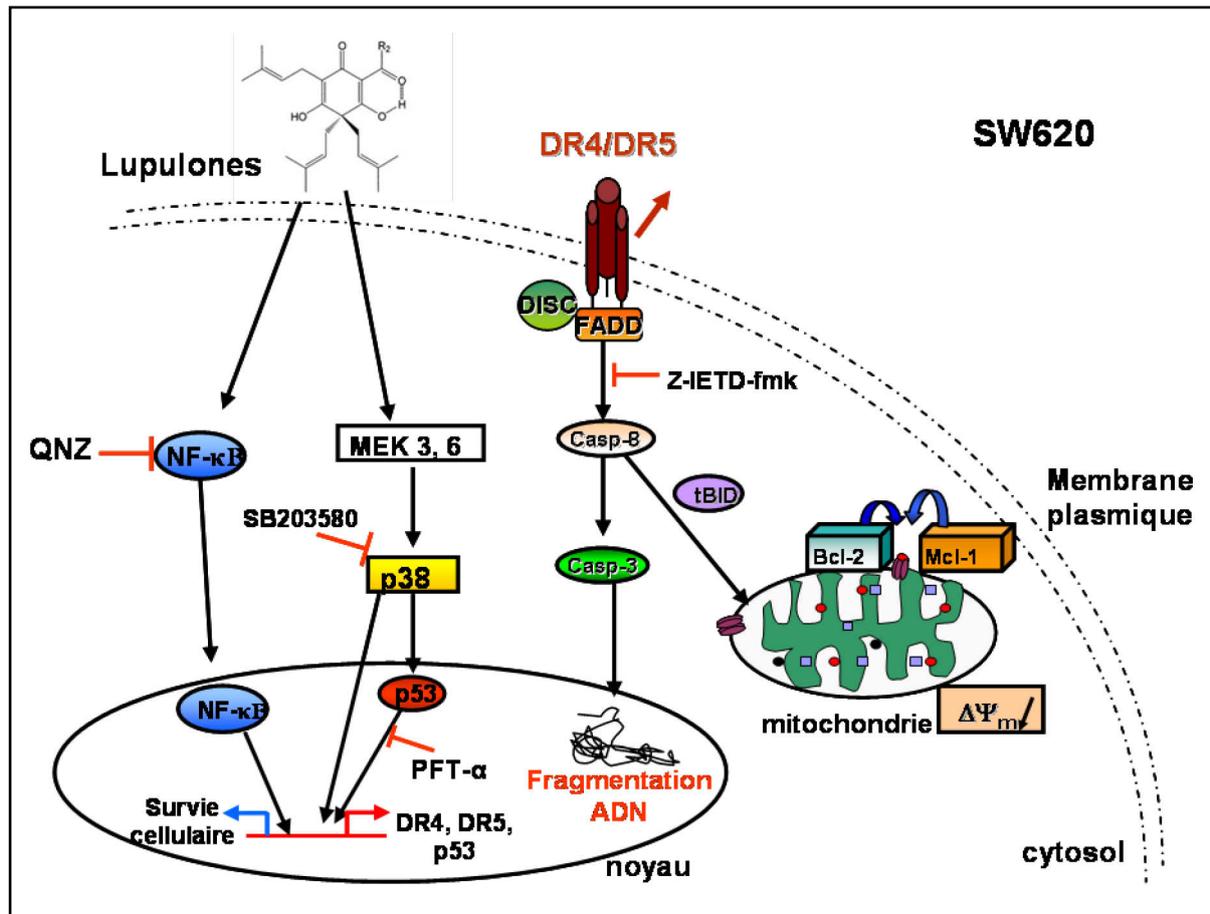


Figure 36: Les mécanismes cellulaires induits par les lupulones pour les cellules SW620. Les lupulones activent en parallèle la voie p38 MAP kinase et le facteur de survie NF- κ B. La p38 induit une augmentation de la transcription des gènes apoptotiques DR4, DR5 et p53. L'expression protéique de DR4 et DR5 est augmentée à la surface de la membrane plasmique et leur activation entraîne l'initiation de la voie extrinsèque et la fragmentation de l'ADN. En réponse à cette activation, la mitochondrie surexprime les protéines anti-apoptiques Bcl-2 et Mcl-1 entraînant sa stabilisation et le facteur NF- κ B initie la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire.

QNZ : quinazole ; *PFT- α* : pifithrin-alpha ; *DISC* : Death-Inducing Signaling Complex ; *FADD* : Fas Associated Death Domain

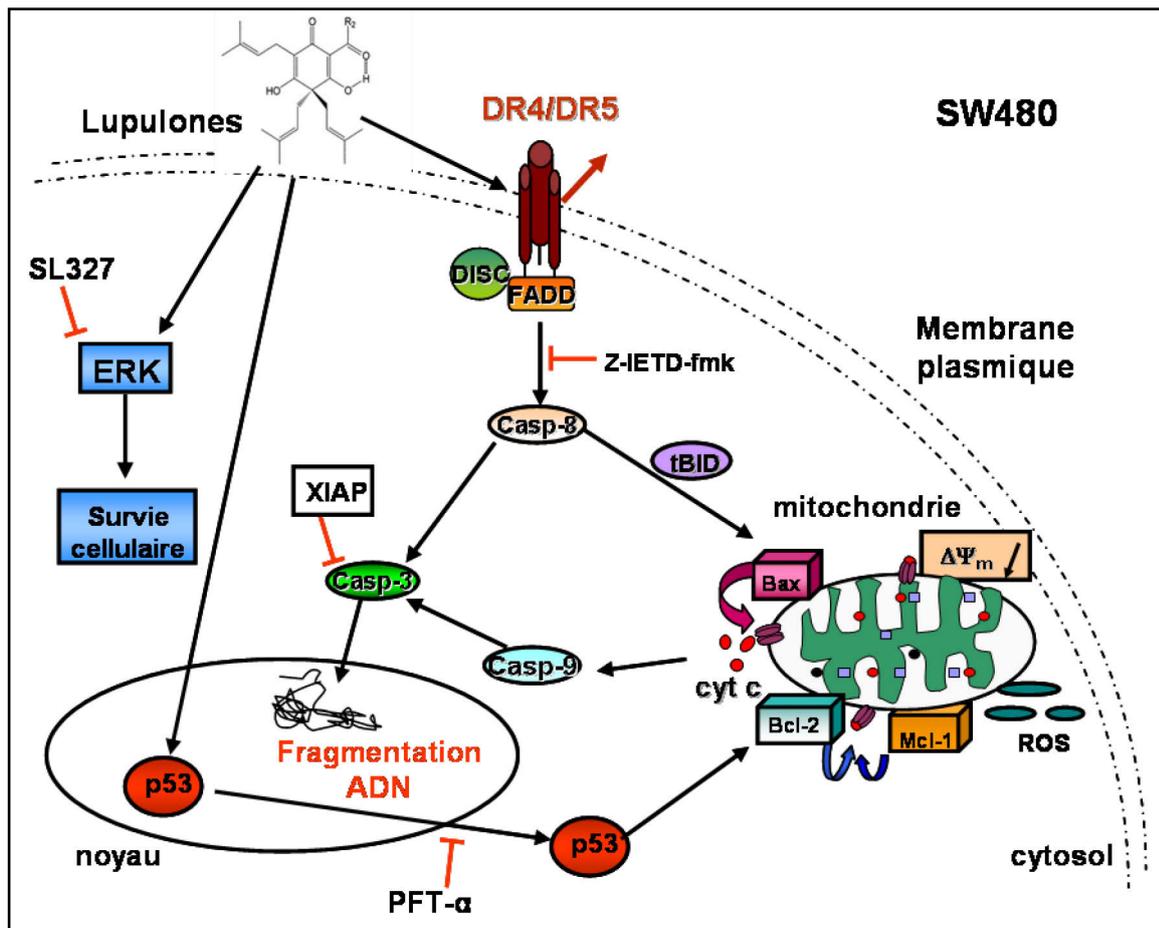


Figure 37: Les mécanismes cellulaires induits par les lupulones pour les cellules SW480. Les lupulones induisent une augmentation des récepteurs de mort DR4 et DR5, qui vont activer la voie extrinsèque et intrinsèque. La caspase-8 va activer la caspase-3, ainsi que la protéine Bid. La mitochondrie va être perturbée et surexprime majoritairement la protéine apoptotique Bax, qui va entraîner la libération du cyt c et une production de ROS, essentiellement due à cette perturbation. Le cyt c active la caspase-9, qui active la caspase-3 entraînant la fragmentation d'ADN. Une partie de la caspase-3 va être inhibée par la protéine XIAP. Les lupulones activent également la voie ERK et la protéine p53, qui vont initier des mécanismes de survie. La p53 va se transloquer du noyau vers la mitochondrie où elle semble former des complexes protéiques avec les membres de la famille Bcl-2 afin de stabiliser la mitochondrie.

PFT- α : pifithrin-alpha ; *DISC* : Death-Inducing Signaling Complex ; *FADD* : Fas Associated Death Domain ; *ROS* : Reactive Oxygen Species ; *XIAP* : X-chromosome linked IAP ; *ERK* : Extracellular signal-Regulated Kinase

III. Effets des lupulones sur un modèle pré-clinique de cancérogenèse expérimentale

Dans le but de confirmer les propriétés anti-cancéreuses des lupulones sur la progression du cancer colorectal, nous avons testé leurs effets sur un modèle pré-clinique de cancérogenèse expérimentale chez le rat Wistar avec une initiation du cancer induite par un agent carcinogène fréquemment utilisé, l'azoxyméthane (AOM) (Raju, 2008).

Les foyers de cryptes aberrantes (FCA), sont des lésions prénéoplasiques pouvant devenir pré-cancéreuses dans l'ensemble des modèles expérimentaux ainsi que chez les humains (Bird, 1987). Dans le modèle pré-clinique animal, ces foyers sont des marqueurs biologiques permettant d'identifier la capacité de molécules naturelles ou de dérivés synthétiques, à prévenir ou contrôler le processus de la cancérogenèse du côlon (Reddy, 2004). En effet, l'incidence de l'apparition des FCA est fortement corrélée avec la formation des tumeurs primaires chez les rongeurs. Les modèles de rats les plus utilisés sont les rats F344, Sprague-Dawley ou Wistar, âgés entre cinq et six semaines et pesant environ 180 à 200g. Une dose d'AOM est injectée par voie intrapéritonéale, de 15 mg/kg une fois par semaine pendant deux semaines (Pretlow et coll., 1992). Deux semaines après la dernière injection, les cellules épithéliales du côlon sont initiées et une population importante de FCA primaires apparaît. Durant la phase de promotion (12 semaines après la dernière injection), les cellules des cryptes aberrantes vont proliférer, former des clones cancéreux et adopter des caractéristiques morphologiques permettant de classer ces foyers, en lésions intermédiaires ou avancées. Les douze semaines suivantes vont représenter la phase de progression, avec une incidence de l'apparition des lésions avancées à son maximum et une apparition de micro adénomes, d'adénomes et d'adénocarcinomes (Raju, 2008). Ce modèle est vraiment très attractif, montrant ainsi les trois phases de développement du cancer colorectal en 6 à 7 mois contre 10 à 20 ans chez l'humain. Les FCA traduisent le stade le plus précoce pour l'identification d'un processus de cancérogenèse. Ces lésions pré-cancéreuses vont se développer ou non et pourront acquérir de nouveaux génotypes et phénotypes permettant une classification suivant leur taille, leur degré de dysplasie, la multiplication des foyers ainsi que la combinaison de leur dysplasie et leur multiplication. Cette classification est primordiale pour comprendre le développement de la maladie (Raju, 2008).

Les lupulones entraînent sur ce modèle pré-clinique de cancérogenèse, une nette diminution de l'apparition de FCA, présents à la surface de la muqueuse du côlon, ainsi qu'une diminution du nombre total de tumeurs. En effet, sept mois après la dernière injection d'AOM, les rats ont développé des FCA primaires ou de plus grandes tailles ainsi que des adénocarcinomes primaires. Les lupulones utilisés à des doses de 0,8 et 4 mg/kg/jour induisent alors une réduction, respectivement de 30 et 50% du nombre de FCA. De même le nombre de tumeurs primaires formées est drastiquement réduit après un traitement aux lupulones de 70 et 80%. Ces résultats montrent pour la première fois le haut potentiel des lupulones comme agent chimiopréventif et leurs propriétés anti-carcinogènes puissantes. D'autres études devront être menées sur le mécanisme d'action des lupulones dans ces conditions *in vivo*.

IV. Conclusion générale

Durant ces dernières années, il a été démontré qu'un régime alimentaire riche en fruits et en légumes peut empêcher le développement de cancers, surtout celui du cancer colorectal ainsi que le développement de maladies cardiovasculaires. La chimioprévention ou l'identification de substances naturelles biologiquement actives participant à ces effets bénéfiques a montré le grand intérêt thérapeutique de nombreux micronutriments comme les flavonoïdes ou plus généralement les polyphénols. Le houblon renferme dans les glandes de lupulines des flavonoïdes et des acides phénoliques appelés les acides amers du houblon, divisés en deux familles les humulones et les lupulones. Les activités biologiques de ces acides amers du houblon démontrent de leurs grandes propriétés anti-bactériennes. Des études préalables ont pu mettre en évidence les propriétés anti-cancéreuses et anti-angiogéniques des humulones mais les activités biologiques des lupulones restent peu ou mal connues.

Les études que nous avons menées sur un modèle *in vitro* de la progression des cellules primaires coliques humaines SW480 à leurs dérivées métastatiques SW620 ont permis de démontrer que les lupulones possèdent de grandes propriétés anti-cancéreuses en activant des voies apoptotiques impliquant les récepteurs de mort de TRAIL, DR4 et DR5.

- Les lupulones activent les récepteurs DR4 et DR5 pour les cellules SW480 initiant l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque et l'apoptose. Les lupulones entraînent

également l'activation de mécanismes de survie cellulaire qui sont initiés par deux voies différentes, la voie ERK MAP kinase et la voie de la protéine p53.

- Pour les cellules métastatiques SW620, résistantes à TRAIL, les lupulones activent principalement la voie p38 MAP kinase, induisant l'activation des récepteurs DR4 et DR5 et l'initiation de la voie extrinsèque et de l'apoptose. En parallèle une réponse de survie cellulaire est initiée précocement par le facteur NF- κ B, mais avec une faible efficacité.

Les études menées sur un modèle pré-clinique de la cancérogenèse expérimentale représenté par les rats Wistar traités à l'AOM ont également démontré les propriétés anti-cancéreuses des lupulones. En effet, après sept mois de traitement aux lupulones, les apparitions et le nombre de polypes intermédiaires ont nettement diminué de même que le nombre de tumeurs primaires.

Ce travail démontre pour la première fois le haut potentiel des lupulones, microconstituants de la plante du houblon, comme agents de chimioprévention contre le cancer colorectal. Il renforce également la nécessité d'approfondir les études pré-cliniques et de déterminer le mécanisme d'action des lupulones sur les tumeurs primaires, leur biodisponibilité ou encore l'étude de leur métabolisation au sein d'un organisme. De nouvelles études devront également être menées sur le modèle *in vitro* concernant dans un premier temps la détermination de l'origine de la réponse apoptotique dans les lignées primaires SW480 puis dans un deuxième temps l'étude de l'activation induite par les lupulones, d'autres types de mort cellulaire, comme la sénescence, la catastrophe mitotique et surtout l'autophagie qui présente beaucoup de médiateurs communs avec l'apoptose.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BLIOGRAPHIQUES**A**

- Aesoy R**, Sanchez BC, Norum JH, Lewensohn R, Viktorsson K et coll (2008) An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signalling loop confer resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **6**: 1630-1638
- Aggarwal BB**, Shishodia S (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* **71** :1397-1421
- Allen RT**, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* **37**:215-28
- Almasan A**, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:337-48
- Amundson SA**, Myers TG , Fornace AJ Jr (1998) Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**:3287-99
- Armstrong JS** (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* **28**:253-60
- Ashe PC**, Berry MD (2003) Apoptotic signaling cascades. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biolog Psych* **27**:199– 214.

B

- Banerjee J**, Ghosh S (2004) Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochem Biophys Res Commun* **323**:310-4
- Banerjee S**, Li Y, Wang Z, Sarkar FH (2008) Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* **269**:226-42
- Bayir H**, Kagan VE (2008) Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care* **12**:206
- Bellail AC**, Qi L, Mulligan P, Chhabra V, Hao C (2009) TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Rev Recent Clin Trials* **4**:34-41

Belyanskaya LL, Ziogas A, Hopkins-Donaldson S et coll (2008) TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8. *Lung Cancer* **60**:355-65

Bird RP (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* **37**: 147-151

Bonovas S, Tsantes A, Drosos T, Sitaras NM (2008) Cancer Chemoprevention: A Summary of the Current Evidence. *Anticancer Res* **28**: 1857-66

Brantley-Finley C, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall T et coll (2003) The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin and etoposide. *Biochem Pharmacol* **66**: 459-69

Brunelle JK, Letai A (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* **122**: 437-41

Bustin SA, Mueller R (2006) Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol Aspects Med* **27**: 192-223

C

Campos CB, Degasperi GR, Pacifico DS et coll (2004) Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. *Biochem Pharmacol* **68**:2197-206

Cao Y, Klionsky DJ (2007) Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* **17**:839-49

Chang F, Steelman LS, Shelton JG et coll (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* **22**:469-80

Chen J, Huang YW, Liu G et coll. (2004) The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **197**:40-8

Chen WJ, Lin JK (2004) Mechanisms of cancer chemoprevention by hop bitter acids (beer aroma) through induction of apoptosis mediated by Fas and caspase cascades. *J Agric Food Chem* **52**:55-64

Chinnaiyan AM (1999) The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**:5-15

Chong EW, Wong TY, Kreis AJ et coll (2007) Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **335**:755

Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM et coll (2007) Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett* **246**:201-9

Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**:647-56

Crescenzi E, Palumbo G, de Boer J, Brady HJ (2008) Ataxia telangiectasia mutated and p21CIP1 modulate cell survival of drug-induced senescent tumor cells: implications for chemotherapy. *Clin Cancer Res* **14**:1877-87

D

Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Güner D (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* **39**: 73-88

Davies JM, Goldberg RM (2008) First-line therapeutic strategies in metastatic colorectal cancer. *Oncogene (Williston Park)* **22**: 1470-9

Debatin KM (2004) Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**: 153-9

Debatin KM, Poncet D, Kroemer G (2002) Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* **21**: 8786-803

De Vries JE, Dinjens WN, de Buyne GK et al (1995) In vivo and in vitro invasion in relation to phenotypic characteristics of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* **71**: 271-77

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279-3290

Dietz BM, Kang YH, Liu G, Egger AL et coll (2005) Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol* **18**: 1296-305

Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG et coll (2006) Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* **25**: 2287-96

Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J (2008) IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* **7**: 1036-46

Dudkina NV, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP (2008) The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 419-24

E

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495-516

Er E, Oliver L, Cartron PF et coll (2006) Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1301-11

F

Faivre J, Dancourt V, Lejeune C et coll (2004) Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology* **126**: 1674-80

Faivre J, Lemmens VE, Quipourt V, Bouvier AM (2007) Management and survival of colorectal cancer in the elderly in population-based studies. *Eur J Cancer* **43**: 2279-84

Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H (2007) TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1462-75

Fan M, Chambers TC (2001) Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat* **5**: 253-67

Fantini MC, Pallone F (2008) Cytokines: from gut inflammation to colorectal cancer. *Curr Drug Targets* **9**: 375-80

Fernandez-Luna JL (2008) Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cell Signal* **20**: 1921-6

Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI (2008) Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* **266**: 6-11

Frenzel A, Grespi F, Chmielewskij W, Villunger A (2009) Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* **14**: 584-96

Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-811

G

- Galluzzi L**, Vicencio JM, Kepp O et coll (2008) To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med* **8**:78-91
- Gavriely Y**, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**:493-501
- Gennari L**, Russo A, Rossetti C (2007) Colorectal cancer: what has changed in diagnosis and treatment over the last 50 years? *Tumori* **93**:235-41
- Gerhäuser C** (2005a) Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* **41**:1941-54
- Gerhäuser C** (2005b) Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol Nutr Food Res* **49**:827-31
- Gerhauser C**, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A et coll (2002) Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* **1**:959-69
- Gordon GJ**, Mani M, Mukhopadhyay L et coll (2007) Inhibitor of apoptosis proteins are regulated by tumour necrosis factor-alpha in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol* **211**:439-46
- Goto K**, Asai T, Hara S, Namatame I et coll (2005) Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Lett* **219**:215-22
- Green DR**, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**:626-29
- Gyrd-Hansen M**, Darding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L et coll (2008) IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* **10**:1309-17

H

- Hagos GK**, Carroll RE, Koutznetsova T et coll (2007) Colon cancer chemoprevention by a novel NO chimera that shows anti-inflammatory and antiproliferative activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **6**:2230-9
- Hail N Jr** (2005) Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis* **10**:687-705
- Hamacher R**, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2008) Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer* **7**:64
- Harnois C**, Demers MJ, Bouchard V et coll (2004) Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol* **198**:209-22
- Henderson MC**, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML et coll (2000) In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **30**:235-51
- Herbeuval JP**, Lambert C, Sabido O et coll (2003) Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J Natl Cancer Inst* **95**: 611-621
- Hewitson P**, Glasziou P, Irwig L et coll (2007) Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* **24**:CD001216
- Hewitt RE**, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R et coll (2000) Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol* **192**: 446-454
- Hipskind RA**, Bilbe G (1998) MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci* **3**:d804-16
- Honma Y**, Tobe H, Makishima M et coll (1998) Induction of differentiation of myelogenous leukemia cells by humulone, a bitter in the hop. *Leuk Res* **22**:605-10
- Huerta S**, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, Huerta-Yeppez S et coll (2007) Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: role of Fas, Apaf-1, NF- κ B, IAPs, Smac/DIABLO and AIF. *J Surg Res* **142**: 184-194
- Hunter AM**, LaCasse EC, Korneluk RG (2007) The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**:1543-68

I

Ianzini F, Kosmacek EA, Nelson ES et coll (2009) Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe. *Cancer Res* **69**:2296-304

Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K (2007) NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* **98**:268-74

J

Jacobsen H, Poulsen M, Dragsted LO et coll (2006) Carbohydrate digestibility predicts colon carcinogenesis in azoxymethane-treated rats. *Nutr Cancer* **55**:163-70

Jiang X, Wang X (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**:87-106

Jin Z, McDonald ER 3rd, Dicker DT, El-Deiry WS (2004) Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 35829-39

Johnson CR, Jarvis WD (2004) Caspase-9 regulation: an update. *Apoptosis* **9**:423-7

K

Karin M (2006) NF-κB and Cancer: Mechanisms and Targets. *Mol Carcinog* **45**: 355-61

Karin M, Lin A (2002) NF-κB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**: 221-27

Kataoka T (2005) The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* **25**:31-58

Kaufmann SH, Hengartner MO (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* **11**:526-34

Kelley SK, Harris LA, Xie D et coll (2001) Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:31-8

Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC (2003) P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol* **14**: 265-267.

- Kim HJ**, Oh JE, Kim SW, Chun YJ, Kim MY (2008a) Ceramide induces p38 MAPK-dependent apoptosis and Bax translocation via inhibition of Akt in HL-60 cells. *Cancer Lett* **260**: 88-95.
- Kim JS**, Ahn KJ, Kim JA et coll (2008b) Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells: ROS-mediated cell death by 3-BrPA. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 607-18
- Kim KM**, Kim PK, Kwon YG et coll (2002) Regulation of apoptosis by nitrosative stress. *J Biochem Mol Biol* **35**:127-33
- Kischkel FC**, Lawrence DA, Chuntharapai A et coll (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**:611-20
- Kitada S**, Andersen J, Akar S et coll (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**: 3379-3389.
- Klamt F**, Dal-Pizzot F, Gelain DP et coll (2008) Vitamin A treatment induces apoptosis through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Cell Biol Int* **32**:100-6
- Khosravi-Far R**, Esposti MD (2004) Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* **3**: 1051-7
- Kovacsovics M**, Martinon F, Micheau O et coll (2002) Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol* **12**:838-43
- Kroemer G**, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**:99-163
- Kruyt FA** (2008) TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett* **263**: 14-25
- Kumar B**, Kumar A, Pandey BN et coll (2009) Role of mitochondrial oxidative stress in the apoptosis induced by diospyrin diethylether in human breast carcinoma (MCF-7) cells. *Moll Cell Biochem* **320**:185-95
- Kuribayashi K**, El-Deiry WS (2008) Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Adv Exp Med Biol* **615**:201-21

L

- LaCasse EC**, Baird S, Korneluk RG et coll (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**:3247-59
- Lansdorp PM** (2000) Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* **118**:23-34
- Laptenko O** et Prives C (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* **13**: 951-961
- Lavrik IN**, Golks A, Krammer PH (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**:2665-72
- Lee JC**, Kundu JK, Hwang DM et coll (2007) Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF-kappaB and AP-1: IkappaB kinase and c-Jun-N-terminal kinase as respective potential upstream targets. *Carcinogenesis* **28**:1491-8
- Lei K**, Nimnual A, Zong WX et coll (2002) The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* **22**:4929-4942
- Leibovitz A**, Stinson JC, McCombs WB 3rd et coll. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **3**:4562-9
- Leichman CG** (2006) Adjuvant therapy for colon cancer 2005: new options in the twenty-first century. *Surg Oncol Clin N Am* **15**:159-73
- Leporrier J**, Maurel J, Chiche L et coll (2006) A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* **93**:465-74
- Liu J**, Weiss A, Durrant D et coll (2004) The cardiolipin-binding domain of Bid affects mitochondrial respiration and enhances cytochrome c release. *Apoptosis* **9**:533-41
- Livak KJ**, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods* **25**:402-408
- López-Lázaro M** (2008) Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res* **52 Suppl 1**:S103-27

M

- Maddika S**, Booy EP, Johan D et coll (2005) Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell-death mediators by a Nur77-dependent pathway. *J Cell Sci* **118**:4485-93
- Maeda M**, Omata M (2008) Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci* **99**:836-42
- Manfredi S**, Lepage C, Hatem C et coll (2006) Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* **244**:254-9
- Mansilla S**, Bataller M, Portugal J (2006) Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem* **6**:589-602
- Manson MM** (2003) Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med* **9**:11-18
- Mattson MP**, Meffert MK (2006) Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* **13**:852-60
- Meek DW** (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification. *Oncogene* **18**: 7666-7675
- Meurette O**, Fontaine A, Rebillard A et coll (2006) Cytotoxicity of TRAIL/anticancer drug combinations in human normal cells. *Ann NY Acad Sci* **1090**: 209-216
- Mihara M**, Erster S, Zaika A, Petrenko O et coll (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**: 577-590.
- Milligan SR**, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V et coll (2000) The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:4912-5
- Miranda CL**, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC et coll (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* **37**:271-85
- Miranda CL**, Yang YH, Henderson MC, Stevens JF et coll (2000) Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab Dispos* **28**:1297-302

Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M et coll (2005) Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* **29**:149-61

Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* **269**:315-25

N

Nagata S (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**:12-8

Ndozangue-Touriguine O, Sebbagh M, Merino D et coll (2008) A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of colon carcinoma. *Oncogene* **27**:6012-22

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC et coll. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**:271-79

Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**:3237-45

O

Obelevicius K, Venskutonis R (2004) The crop-producing power and chemical composition of the essential oil of the cones of hop cultivars. *Medicina (Kaunas)* **40**:775-8

Olson JM, Hallahan AR (2004) p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med* **10**: 125-29

Ouaissi M, Ouaissi A (2006) Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *J Biomed Biotechnol* **2006**:13474

Ouyang X, Jessen WJ, Al-Ahmadie H, Serio AM et coll (2008) Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. *Cancer Res* **68**: 2132-2144

Overk CR, Yao P, Chadwick LR, Nikolic D, Sun Y et coll (2005) Comparison of the in vitro estrogenic activities of compounds from hops (*Humulus lupulus*) and red clover (*Trifolium pratense*). *J Agric Food Chem* **53**:6246-53

Ozören N, El-Deiry WS (2003) Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* **13**:135-47

P

- Pan L**, Becker H, Gerhäuser C (2005) Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Mol Nutr Food Res* **49**:837-43
- Parkin DM**, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108
- Passos JF**, Saretzki G, von Zglinicki T (2007) DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res* **35**: 7505-13
- Pepper MS**, Hazel SJ, Hümpel M, Schleuning WD (2004) 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* **199**: 98-107
- Persons DL**, Yazlovitskaya EM, Pelling JC (2000) Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem* **275**: 35778-85
- Pietsch EC**, Sykes SM, McMahon SB et coll (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**: 6507-21
- Pintus G**, Tadolini B, Posadino AM et coll (2002) Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI-A down regulates c-myc gene expression and endothelial cell proliferation. *Eur J Biochem* **269**: 5861-70
- Plummer R**, Attard G, Pacey S et coll (2007) Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* **13**: 6187-6194
- Pretlow TP**, O'Riordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG (1992) Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis* **13**: 1509-12
- Proskuryakov SY**, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* **283**: 1-16

Q

- Qu X**, Yu J, Bhagat G, Furuya N et coll (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**:1809-20

R

- Raju J** (2008) Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World J Gastroenterol* **14**: 6632-35
- Reed JC**, Doctor KS, Godzik A (2004) The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci STKE* **2004**: re9
- Reed JC**, Zha H, Aime-Sempe C et coll (1996) Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* **406**: 99-112
- Reddy BS** (2004) Studies with the azoxymethane-rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. *Environ Mol Mutagen* **44**: 26-35
- Resch U**, Schichl YM, Sattler S, de Martin R (2008) XIAP regulates intracellular ROS by enhancing antioxidant gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **375**:156-61
- Riccardi C**, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* **1**: 1458-1461
- Riedl SJ**, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 405-13
- Rochette PJ**, Bastien N, Lavoie J et coll (2005) SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *J Mol Biol* **352**: 44-57
- Roninson IB**, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4**: 303-13
- Royuela M**, Arenas MI, Bethencourt FR et coll (2001) Immunoections of p21, Rb, mcl-1 and bad gene products in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates. *Eur Cytokine Netw* **12**: 654-63
- Ruffolo SC**, Breckenridge DG, Nguyen M et coll (2000) BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. *Cell Death Differ* **7**: 1101-8

S

- Sandra F**, Degli Esposti M, Ndebele K et coll (2005) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alters mitochondrial membrane lipids. *Cancer Res* **65**: 8286-97
- Sarkar FH**, Li Y, Wang Z, Kong D (2008) NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol* **27**: 293-319
- Schrader AJ**, Lauber J, Lechner O et coll (2003) Application of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in urological oncology. *J Urol* **169**:1858-64

- Sethi G**, Sung B, Aggarwal BB (2008) Nuclear Factor- κ B activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**: 21-31
- Sharif S**, O'Connell MJ, Yothers G et coll (2008) FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. *Cancer Invest* **26**:956-63
- Sharma HW**, Narayanan R (1996) The NF-kappaB transcription factor in oncogenesis. *Anticancer Res* **16**: 589-96
- Shi J**, Shen HM (2008) Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol* **75**: 1729-42
- Shimamura M**, Hazato T, Ashino H et coll (2001) Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 220-4
- Siegel L**, Mitermque-Grosse A, Griffon C et coll (2008) Antiangiogenic properties of lupulone, a bitter acid of hop cones. *Anticancer Res* **28**: 289-94
- So KS**, Oh JE, Han JH (2008) Induction of apoptosis by a stilbene analog involves Bax translocation regulated by p38 MAPK and Akt. *Arch Pharm Res* **31**: 438-44
- Sporn MB** (1976) Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res* **36**: 2699-702
- Stevens JF**, Page JE (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **65**: 1317-30
- Stevens JF**, Taylor AW, Deinzer ML (1999) Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **832**: 97-107
- Sugikawa E**, Hosoi T, Yazaki N et coll (1999) Mutant p53 mediated induction of cell cycle arrest and apoptosis at G1 phase by 9-hydroxyellipticine. *Anticancer Res* **19**: 3099-3108
- Surh Y** (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**:768-80
- Swanson MS** (2006) Autophagy: eating for good health. *J Immunol* **177**:4945-51

T

- Tewari R**, Sharma V, Koul N, Sen E (2008) Involvement of miltefosine-mediated ERK activation in glioma cell apoptosis through Fas regulation. *J Neurochem* **107**: 616-627.

Thatte U, Dahanukar S (1997) Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* **54**(4):511-32

Thayaparasingham B, Kunz A, Peters N, Kulms D (2009) Sensitization of melanoma cells to TRAIL by UVB-induced and NF-kappaB-mediated downregulation of XIAP. *Oncogene* **28**:345-62

Thorburn A (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* **16** (2):139-44

Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1792**:3-13

Tol J, Koopman M, Cats A et coll (2009) Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **360**(6):563-72

U

Ubezio P, Civoli F (1994) Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* **16**:509-16

Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJ (2008) Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr Rev* **66**:445-54

V

Vaculová A, Hofmanová J, Soucek K, Kozubík A (2006) Different modulation of TRAIL-induced apoptosis by inhibition of pro-survival pathways in TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant colon cancer cells. *FEBS Lett* **580**: 6565-6569

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15**:1153-62

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J et coll (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**:1-40

Vaseva AV, Marchenko ND, Moll UM (2009) The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle* **8**: 1647-8

Vaupel P (2008) Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* **13 Suppl 3**:21-6

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2005) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* **84**:627-39

Verzele M, Potter MDE (1978) High-performance liquid chromatography of hop bitter substances. *J Chromatogr A* **166**: 320-26

Villas BH (1998) Flow cytometry: an overview. *Cell Vis* **5**:56-61

W

Wang K, Yin XM, Chao DT et coll (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* **10**: 2859-2869.

Wang S (2008) The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* **27**:6207-15

Widlak P, Garrard WT (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* **94**:1078-87

Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM (2008) p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res* **18**:733-44

Wu GS (2004) The functional interactions between the p53 and MAPK signalling pathways. *Cancer Biol Ther* **3**: 156-61

X

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331

Xue W, Zender L, Miething C et coll (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**:656-60

Y

Yamamoto K, Wang J, Yamamoto S, Tobe H (2002) Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon. *Adv Exp Med Biol* **507**:73-7

- Yan W**, Liu G, Scoumanne A et coll (2008) Suppression of inhibitor of differentiation 2, a target of mutant p53, is required for gain-of-function mutations. *Cancer Res* **68**:6789-96
- Yang HH**, Ma MH, Vescio RA, Berenson JR (2003) Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis. *J Clin Oncol* **21**:4239-47
- Yang XJ**, Grégoire S (2005) Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* **25**:2873-84
- Yang-Yen HF** (2006) Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J Biomed Sci* **13**:201-4
- Yasukawa K**, Takeuchi M, Takido M (1995) Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncogene* **52**:156-8
- Ye H**, Cande C, Stephanou NC et coll (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**:680-4

Z

- Zangemeister-Wittke U**, Simon HU (2004) An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle* **3**: 1121-3
- Zamai L**, Ponti C, Mirandola P et coll (2007) NK cells and cancer. *J Immunol* **178**: 4011-6
- Zanoli P**, Zavatti P (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus L.* *J Ethnopharmacol* **116**: 383-96
- Zarubin T**, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* **15**: 11-18
- Zhang X**, Liang X, Xiao H, Xu Q (2004) Direct characterization of bitter acids in a crude hop extract by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**: 180-7
- Zhao F**, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K et coll (2003) Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus L.*). *Biol Pharm Bull* **26**: 61-5
- Zhou P**, Qian L, Bieszczad CK et coll (1998) Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood* **92**: 3226-39

PARTICIPATIONS

PARTICIPATIONS

- **Lamy V, Roussi S, Chaabi M, Gosse F, Schall N, Lobstein A, Raul F. Lupulone, a hop phytochemical, activates TRAIL-death pathways in human colon cancer cells. European Cancer Center 14th annual meeting, May 11th 2007, Strasbourg, France (poster presentation).**

- **Lamy V, Roussi S, Chaabi M, Gosse F, Schall N, Lobstein A, Raul F. Lupulone, a hop phytochemical, activates TRAIL (TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand) -death pathways in human colon cancer cells. Cancer Therapeutics: The Road Ahead. A Nature Conference, October 8-10 2007, Capri, Italy (poster presentation).**

- **Lamy V, Chaabi M, Gosse F, Lobstein A, Raul F. Lupulone, a hop bitter acid, activates different apoptotic pathways in human colon tumor cells and in their derived metastatic cells. 2nd ISHS International *Humulus* Symposium, September 1-5 2008, Ghent, Belgium (oral communication).**

AUTRE PUBLICATION

- **Lamy V, Chaabi M, Gosse F, Lobstein A, Raul F. Lupulone, a hop phytochemical, activates different apoptotic pathways in human colon tumor cells and in their derived metastatic cells. Acta Horticulturiae 2009 (in press)**